



**UEA**  
UNIVERSIDADE  
DO ESTADO DO  
AMAZONAS



**UNIVERSIDADE DO ESTADO DO AMAZONAS – UEA  
ESCOLA SUPERIOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE – ESA  
MESTRADO EM BIOTECNOLOGIA E RECURSOS NATURAIS DA  
AMAZÔNIA– MBT**

**FUNGOS AMAZÔNICOS COM POTENCIAL PARA DEGRADAÇÃO  
DE POLIETILENO TEREFTALATO-PET**

**ELAINE PIRES SOARES**

**MANAUS**

**2012**

**ELAINE PIRES SOARES**

**FUNGOS AMAZÔNICOS COM POTENCIAL PARA  
DEGRADAÇÃO DE POLIETILENO TEREFTALATO-PET**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação da Universidade do Estado do Amazonas, para obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia e Recursos Naturais da Amazônia.

**Orientador: Prof. Dr. ADEMIR CASTRO E SILVA**

**MANAUS**

**2012**

## **PARECER**

Os membros da Banca Examinadora, designada pela Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Recursos Naturais da Amazônia da Universidade do Estado do Amazonas, reuniram-se para realizar a argüição da dissertação de MESTRADO apresentada pela candidata Elaine Pires Soares sob o título “Fungos Amazônicos com potencial para degradação de Polietileno da Amazônia.

Após análise do referido trabalho e argüição da candidata, os membros dão o parecer pela **APROVAÇÃO** da dissertação.

Manaus, 26 de Abril de 2012.

Dra. Arelis Abalos Rodriguez

Universidade Estadual do Amazonas (UEA) – Membro Titular

Dra. Milade dos Santos Carneiro Cordeiro

Universidade Estadual do Amazonas (UEA) – Membro Titular

Dr. Ademir Castro e Silva

Universidade Estadual do Amazonas (UEA) – Presidente da Banca e Orientador

*“Evoluir é reconhecer nossos erros.  
Não para consertá-los,  
Mas para não repeti-los”.*

*(Amanda Chakur)*

*“Não importa onde você parou...  
Em que momento da vida você cansou.  
O que importa é que sempre é possível recomeçar.  
Recomeçar é dar uma nova chance a si mesmo...  
É renovar as esperanças na vida e o mais importante...  
Acreditar em você de novo”.*

*(Carlos Drummond de Andrade)*

## DEDICAÇÃO

Ao meu esposo Deodato e meus filhos com muito amor:  
Júnior, Ândria e Henrique, pela compreensão e apoio  
quando ausente estive, em busca de um sonho realizar.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a **Deus** que na sua infinita bondade iluminou sempre meus caminhos e deu-me forças para seguir em frente nesta caminhada apesar das dificuldades encontradas nesta jornada.

Ao professor orientador **Ademir Castro e Silva** por todos os ensinamentos passados, incentivo e conselhos profissionais dados, pelos laços de amizade formado, atenção e confiança dedicados ao longo do trabalho.

Agradeço aos meus pais, **Vanildo e Raimunda** que torcem sempre por mim e que me dão sempre amor e carinho.

Agradecimento especial ao meu esposo **Deodato** que sempre me apoiou, compreendendo-me, amando-me, sendo meu alicerce nas horas difíceis, base primordial para o meu sucesso pessoal e profissional.

Agradeço a **minha família** que sempre me deu apoio, amor, carinho e felicidade, nada na minha vida teria graça. Eu amo muito vocês.

Agradeço aos professores **Dr. Aldo Procópio, Dra. Helena Camarão, Dra. Helen, Dr. Everson Miranda, Dr. Wilson Castro Silva, Dra. Arelis Ábalos Rodrigues, Dr. Enrique Ramon Molina Perez**, que ministraram as disciplinas do curso e pelos tantos ensinamentos repassados.

Aos amigos do Laboratório de Biologia, Química e Coordenação do Mestrado, **Joyce, Claudomiro e Priscila** pela troca de experiência e conhecimento, pelos momentos de descontração vividos nas longas horas de trabalho e pelo apoio dado nos momentos mais difíceis.

Aos novos amigos conquistados no mestrado **Adriana Nunes, Aaron Machado, Adrya Figueiredo, Izabel Cristina, Vanessa Galúcio e Paula Mara** que com muito esforço conseguimos alcançar nossos objetivos.

Aos alunos de iniciação científica **Patrícia, Esmeralda Andrade, Bruno Pantoja, Rilk Azedo, Ricardo Katak**, em especial **Aldenize Viana, João Bosco e Rafael**, pelo suporte e incentivo.

As amigas **Cláudia Ramos, Liviane Martins, Daízes Pimentel**, pela compreensão, apoio, carinho e torcida.

À minha prima e amiga **Solange Pires de Araújo**, pelo incentivo e carinho nos momentos difíceis.

À minha querida amiga **Naimy Farias Castro** que sempre ouve meus desabafos, anseios com toda “paciência” do mundo.

Ao **CNPq** pelo incentivo educacional e bolsa de estudos concedida.

À **Universidade do Estado do Amazonas, Coordenação do Mestrado e Centro de Estudo Superiores de Parintins** por fornecer todo o suporte docente e administrativo para a minha formação.

A Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP/FEA – Faculdade de Engenharia Química na pessoa do **Prof. Dr. Everson Miranda e Kelly Palma** que possibilitaram que fossem feitas as análises de Microscopia Eletrônica de Varredura das amostras de PET.

Aos amigos **Marcelino Norberto e Silvia Ferreira** do Laboratório Mateus Pena Ribeiro que abriram as portas desta instituição e possibilitaram a realização das análises em espectrofotômetro.

A Secretaria Municipal de Saúde de Parintins, em nome do Secretário de Saúde **Josimar Martins Marinho** pela liberação para os estudos, compreensão e apoio nesta jornada acadêmica.

A todos que contribuíram direta e indiretamente em minha jornada

## SUMÁRIO

	Página
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	1
<b>3 OBJETIVOS</b> .....	3
3.1 Objetivo Geral .....	3
3.2 Objetivos Específicos .....	3
<b>3 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	4
3.1 Polímeros Sintéticos.....	4
3.2 Polietileno Tereftalato.....	7
3.2.1 Produção da Resina.....	8
3.2.2 Aditivação do PET.....	9
3.3 Resíduos Agroindustriais.....	9
3.3.1 <i>Astrocaryum aculeatum</i> Meyer-Tucumã da Amazônia.....	11
3.4 Utilização de microorganismos na degradação de plásticos	13
3.4.1 Consórcio de microorganismos fúngicos.....	14
3.5 Fungos Amazônicos com potencial para biodegradação de compostos xenobióticos.....	14
3.6 O complexo oxidativo lignolítico de fungos Basidiomycetos.....	16
3.7 Degradação de Polímeros.....	17
3.7.1 Técnicas para avaliação de alterações estruturais de polímeros.....	19
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	21
4.1 Coleta de fungos.....	21
4.2 Isolamento fúngico e preparo do inóculo.....	22
4.3 Capacidade enzimática oxidativa.....	22
4.4 Preparo dos polímeros.....	23
4.4.1 Desinfecção das amostras.....	23
4.5 Substrato utilizado para o meio de cultivo.....	24
4.6 Controle abiótico e biótico.....	25

4.7 Fermentação submersa.....	25
4.8 Tratamento com consórcio de fungos.....	26
4.9 Polietileno Tereftalato sob pré-tratamento com temperatura 35° C e 50°C.....	26
4.10 Determinação da perda de massa do polímero.....	27
4.11 Microscopia Eletrônica de Varredura.....	28
4.11.1 Preparo das amostras.....	28
4.11.2 Análise morfológica do PET-MEV.....	29
4.12 Determinação Enzimática.....	29
4.12.1 Atividade de Lacase (Lac).....	30
4.12.2 Atividade de Manganês – Peroxidase (MnP) .....	30
4.12.3 Atividade de Lignina – Peroxidase (LiP).....	30
4.13 Análise Estatística.....	31
<b>5 RESULTADOS .....</b>	<b>32</b>
5.1 Seleção de fungos.....	32
5.2 Degradação de PET por Fungos Amazônicos.....	33
5.3 Degradação de PET por Consórcio de Fungos.....	38
5.4 Microscopia Eletrônica de Varredura.....	42
5.5 Atividade enzimática.....	52
5.5.1 Atividade de Lacase (Lac).....	52
5.5.2 Atividade de Lignina - Peroxidase (LiP).....	55
5.5.3 Atividade Manganês-Peroxidase.....	59
<b>6 DISCUSSÃO .....</b>	<b>62</b>
<b>7 CONCLUSÃO.....</b>	<b>66</b>

<b>8</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>67</b>
	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>68</b>
	<b>ANEXOS.....</b>	<b>81</b>

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 01:</b> Composição química do Tucumã da Amazônia ( <i>Astrocaryum aculeatum</i> Meyer) oriundos de Manaus e Rio Preto da Eva, AM.....	13
<b>Tabela 02:</b> Fungos produtores de fenoloxidasas em períodos de 24, 48 e 72 horas.....	32
<b>Tabela 03:</b> Percentagens médias de perda de massa das amostras de PET em diferentes meio de cultivo, PET sem tratamento físico, por um período de 90 dias.....	34
<b>Tabela 04:</b> Percentagens médias de perda de massa das amostras de PET em diferentes meio de cultivo, PET submetido ao pré-tratamento com temperatura 35°C e 50°C, por um período de 90 dias.....	35
<b>Tabela 05:</b> Percentagens médias de perda de massa das amostras de PET em diferentes meio de cultivo e temperaturas, por um período de 90 dias.....	39
<b>Tabela 06:</b> Valor médio da atividade enzimática de lacase, em diferentes meio de cultura e amostras de PET com e sem tratamento físico de temperatura, em 90 dias de incubação.....	52
<b>Tabela 07:</b> Valor médio da atividade enzimática de lignina peroxidase, em diferentes meio de cultura e amostras de PET com e sem tratamento físico de temperatura, em 90 dias de incubação.....	56
<b>Tabela 08:</b> Valor médio da atividade enzimática de manganês peroxidase, em diferentes meio de cultura e amostras de PET com e sem tratamento físico de temperatura, em 90 dias de incubação.....	59

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b>	Estrutura química do Polietileno Tereftalato – PET.....	9
<b>Figura 2:</b>	Mapa de Parintins- Local de coleta dos carpóforos fúngicos .....	21
<b>Figura 3:</b>	Teste de Bavendamm. A. Ácido tânico; B. Meio de cultura BDA homogeneizado com ácido tânico; C. Meio vertido em placas de Petri; D. Fragmento fúngico inoculado no meio teste. ....	23
<b>Figura 4:</b>	A.Fungo <i>P. sanguineus</i> ; B. Fungo FBL; C. Fungo FV12.....	33
<b>Figura 5:</b>	A. Fungo <i>P. sanguineus</i> ; B. Fungo FBL e C. Fungo FV12 em 24 de incubação em presença do ácido tânico.....	33
<b>Figura 6:</b>	Perda de massa do PET sem tratamento físico, com as linhagens fúngicas <i>P. sanguineus</i> , FBL, FV12, em fermentação submersa estacionária no período de 15, 30 60 e 90 dias de incubação. A. Meio sem suplementação-M1; B. Meio suplementado com farinha de tucumã - MFT.....	35
<b>Figura 7:</b>	Perda de massa do PET submetido à temperatura 35°C, com as linhagens fúngicas <i>P. sanguineus</i> , FBL, FV12, em fermentação submersa estacionária no período de 15, 30 60 e 90 dias de incubação. A. Meio sem suplementação-M1; B. Meio suplementado com farinha de tucumã - MFT .....	36
<b>Figura 8:</b>	Perda de massa do PET submetido à temperatura 50°C, com as linhagens fúngicas <i>P. sanguineus</i> , FBL, FV12, em fermentação submersa estacionária no período de 15, 30 60 e 90 dias de incubação. A. Meio sem suplementação-M1; B. Meio suplementado com farinha de tucumã - MFT.....	37
<b>Figura 9:</b>	Perda de massa do PET sem tratamento físico, com os consórcios fúngicos C1, C2 e C3, em fermentação submersa estacionária no período de 15, 30, 60 e 90 dias de incubação. A. Meio sem suplementação -M1; B. Meio suplementado com farinha de tucumã - MFT.....	39
<b>Figura 10:</b>	Perda de massa do PET submetido ao pré-tratamento com temperatura 35°C, com os consórcios fúngicos C1, C2 e C3, em fermentação submersa estacionária no período de 15, 30 60 e 90 dias de incubação. A. Meio sem suplementação-M1; B. Meio suplementado com farinha de tucumã – MFT.....	40

- Figura 11:** Perda de massa do PET submetido ao pré-tratamento com temperatura 35°C, com os consórcios fúngicos C1, C2 e C3, em fermentação submersa estacionária no período de 15, 30 60 e 90 dias de incubação. A. Meio sem suplementação-M1; B. Meio suplementado com farinha de tucumã – MFT..... 41
- Figura 12:** Fotomicrografias de amostras do PET sem tratamento físico e linhagens fúngicas *P. sanguineus*, FBL e FV12 por MEV em 90 dias de incubação. A. controle abiótico; B. PYC em meio M1; C. PYC em meio MFT; D. controle abiótico; E. FBL em meio M1; F. FBL em meio MFT; G. controle abiótico; H. FV12 em meio M1; I. FV12 em meio MFT – 3000X..... 44
- Figura 13:** Fotomicrografias de amostras do PET submetidas ao pré-tratamento com temperatura 35° C e linhagens fúngicas *P. sanguineus*, FBL e FV12 por MEV em 90 dias de incubação. A. controle abiótico; B. PYC em meio M1; C. PYC em meio MFT; D. controle abiótico; E. FBL em meio M1; F. FBL em meio MFT; G. controle abiótico; H. FV12 em meio M1; I. FV12 em meio MFT – 3000X..... 45
- Figura 14:** Fotomicrografias de amostras do PET submetidas ao pré-tratamento com temperatura 50° C e linhagens fúngicas *P. sanguineus*, FBL e FV12 por MEV em 90 dias de incubação. A. controle abiótico; B. PYC em meio M1; C. PYC em meio MFT; D. controle abiótico; E. FBL em meio M1; F. FBL em meio MFT; G. controle abiótico; H. FV12 em meio M1; I. FV12 em meio MFT – 3000X..... 46
- Figura 15:** Fotomicrografias ampliadas de amostras do PET submetidas ao pré-tratamento com temperatura 50° C e linhagens fúngicas A. FBL e B. FV12 por MEV em 30 dias de incubação em MFT. Modificações na superfície do PET após retirada da massa celular dos fungos. 3000X..... 47
- Figura 16:** Fotomicrografias de amostras de PET sem tratamento físico e consórcio de fungos, MEV em 90 dias de incubação. A. controle abiótico; B. Consórcio C1 em meio M1; C. Consórcio C1 em meio MFT; D. controle abiótico; E. Consórcio C2 em meio M1; F. Consórcio C2 em meio MFT; G. controle abiótico; H. Consórcio C3 em meio M1; I. Consórcio C3 em meio MFT – 3000X..... 48

- Figura 17:** Fotomicrografias de amostras de PET submetidas ao pré-tratamento com temperatura 35°C e consórcio de fungos, MEV em 90 dias de incubação. A. controle abiótico; B. Consórcio C1 em meio M1; C. Consórcio C1 em meio MFT; D. controle abiótico; E. Consórcio C2 em meio M1; F. Consórcio C2 em meio MFT; G. controle abiótico; H. Consórcio C3 em meio M1; I. Consórcio C3 em meio MFT – 3000X..... 49
- Figura 18:** Fotomicrografias de amostras de PET submetidas ao pré-tratamento com temperatura 35°C e consórcio de fungos, MEV em 90 dias de incubação. A. controle abiótico; B. Consórcio C1 em meio M1; C. Consórcio C1 em meio MFT; D. controle abiótico; E. Consórcio C2 em meio M1; F. Consórcio C2 em meio MFT; G. controle abiótico; H. Consórcio C3 em meio M1; I. Consórcio C3 em meio MFT – 3000X..... 50
- Figura 19:** Fotomicrografias ampliadas de amostras do PET submetidas ao pré-tratamento com temperatura 50° C e consórcios de fungos A. C1 e B. C3 por MEV em 90 dias de incubação em MFT. Modificações na superfície do PET após retirada da massa celular dos fungos. 3000X..... 51
- Figura 20:** Atividade enzimática de Lac, PET sem tratamento físico com as linhagens fúngicas *P. sanguineus*, FBL e FV12, em fermentação submersa estacionária, durante 15, 30, 60 e 90 de incubação. A. Meio sem suplementação-M1; B. Meio suplementado com farinha de tucumã - MFT..... 53
- Figura 21:** Atividade enzimática de Lac, PET submetido ao pré-tratamento com temperatura 35°C, com as linhagens fúngicas *P. sanguineus*, FBL e FV12, em fermentação submersa estacionária, durante 15, 30, 60 e 90 de incubação. A. Meio sem suplementação-M1; B. Meio suplementado com farinha de tucumã - MFT..... 54
- Figura 22:** Atividade enzimática de Lac, PET submetido ao pré-tratamento com temperatura 50°C, com as linhagens fúngicas *P. sanguineus*, FBL e FV12, em fermentação submersa estacionária, durante 15, 30, 60 e 90 de incubação. A. Meio sem suplementação-M1; B. Meio suplementado com farinha de tucumã - MFT..... 55

- Figura 23:** Atividade enzimática de LiP, PET sem tratamento físico com as linhagens fúngicas *P. sanguineus*, FBL e FV12, em fermentação submersa estacionária, durante 15, 30, 60 e 90 de incubação. A. Meio sem suplementação-M1; B. Meio suplementado com farinha de tucumã - MFT..... 57
- Figura 24:** Atividade enzimática de LiP, PET submetido ao pré-tratamento com temperatura 35°C, com as linhagens fúngicas *P. sanguineus*, FBL e FV12, em fermentação submersa estacionária, durante 15, 30, 60 e 90 de incubação. A. Meio sem suplementação-M1; B. Meio suplementado com farinha de tucumã - MFT..... 58
- Figura 25:** Atividade enzimática de LiP, PET submetido ao pré-tratamento com temperatura 35°C, com as linhagens fúngicas *P. sanguineus*, FBL e FV12, em fermentação submersa estacionária, durante 15, 30, 60 e 90 de incubação. A. Meio sem suplementação-M1; B. Meio suplementado com farinha de tucumã - MFT..... 58
- Figura 26:** Atividade enzimática de MnP, PET sem tratamento físico com as linhagens fúngicas *P. sanguineus*, FBL e FV12, em fermentação submersa estacionária, durante 15, 30, 60 e 90 de incubação. A. Meio sem suplementação-M1; B. Meio suplementado com farinha de tucumã - MFT..... 60
- Figura 27:** Atividade enzimática de MnP, PET submetido ao pré-tratamento com temperatura 35°C, com as linhagens fúngicas *P. sanguineus*, FBL e FV12, em fermentação submersa estacionária, durante 15, 30, 60 e 90 de incubação. A. Meio sem suplementação-M1; B. Meio suplementado com farinha de tucumã - MFT..... 61
- Figura 28:** Atividade enzimática de MnP, PET submetido ao pré-tratamento com temperatura 50°C, com as linhagens fúngicas *P. sanguineus*, FBL e FV12, em fermentação submersa estacionária, durante 15, 30, 60 e 90 de incubação. A. Meio sem suplementação-M1; B. Meio suplementado com farinha de tucumã - MFT..... 61

## ABREVIATURAS E SIGLAS

- **AAO** - Álcool aril oxidase
- **ABIQUIM** – Associação Brasileira da Indústria Química
- **ABTS** - 2,2 – azino – bis – (3 – ethilbenzothialine – 6 – sulphonic acid)
- **AM** – Amazonas
- **ASTM G22-76** - American Society for Testing Materials. Standart Practice for Determinig Resistence of Plastics to bacteria.
- **ASTM G21-90** – American Society for Testing Materials. Standart Practice for Determinig Resistence of Plastics to fungi.
- **ASTM D5210-92** – American Society for Testing Materials. Standart Test Method for Determining the Anaerobic Biodegradation of Rastic Materials in the presence of Municipal Sewage Sludge.
- **ASTM D5247- 92** – American Society for Testing Materials Standart method for aerobic biodegradability of degradable plastics by specific microorganisms.
- **BAL-TEC** - Preparation Technology for Electron Microscopy
- **BTU** – Unidade Térmica Britânica
- **C1**-Consórcio fúngico constituído por *P. sanguineus*, FBL e FV12.
- **C2**- Consórcio fúngico constituído por *P. sanguineus* e FBL.
- **C3**- Consórcio fúngico constituído por *P. sanguineus* e FV12.
- **CESP** – Centro de Estudos Superiores de Parintins
- **DMT** – Dimetiltereftalato cristalizado
- **DHET** - Dihidroxietileno Tereftalato
- **ER** - Resina epoxídica
- **FAO** - Food and Agriculture Organization
- **FT** - Farinha da casca de tucumã
- **HDPE** - Polietileno de alta densidade
- **INSTITUTO GEA** – Instituto Ética e Meio Ambiente
- **INPA** – Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia
- **Lac** – Lacase
- **LabEF** - Laboratório de Estudos Fúngicos
- **LiP** – Lignina Peroxidase

- **LDPE** - Polietileno de baixa densidade
- **M1**- Meio sem suplementação de farinha da casca do tucumã
- **MFT**- Meio suplementado com a farinha da casca do tucumã
- **MEG** – Monoetilenoglicol
- **MEV** – Microscopia Eletrônica de Varredura
- **MnP** – Manganês Peroxidase
- **OSE-COC** - Organização Sorocabana de Ensino
- **PET** – Polietileno tereftalato
- **PVC** - Policloreto vinila
- **PU** – Poliuretano
- **POM** – Polioximetileno
- **pop.** - População
- **PP** – Polipropileno
- **PC** - Policarbonato
- **PMMA** – Polimetacrilato de metila
- **PR** – Resina fenólica
- **PS** – Poliestireno
- **PEAD's** – Polietileno de alta densidade
- **PEBD** – Polietileno de baixa densidade
- **UEA** - Universidade do Estado do Amazonas
- **UV** – Ultravioleta
- **UI/L** – Unidades Internacionais por Litro

## LISTA DE SÍMBOLOS

- **CH<sub>4</sub>** - Metano
- **cm** - Centímetro
- **H<sub>2</sub>O** - Água
- **Kg** - Kilograma
- **Mn<sup>+2</sup>** - Cátion manganês
- **m** - Metro
- **mm** - Milímetro
- **mg** - Miligrama
- **ml** - Mililitros
- **μmol** - Micromol
- **M** - Molar
- **MnSO<sub>4</sub>** - Sulfato de manganês
- **NaOH 5 mol.L<sup>-1</sup>** - Solução aquosa de Hidróxido de sódio
- **(Na (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub> AsO<sub>2</sub>) 0,1 M** - Tampão cacodilato de sódio
- **nd** - não detectado
- **nm** - Nanometro
- **° C** - Grau Celsius
- **O<sub>8</sub>O<sub>4</sub>** - Tetróxido de Ósmio

## RESUMO

### FUNGOS AMAZONICOS COM POTENCIAL PARA DEGRADAÇÃO DO POLIETILENO TEREFALATO-PET

SOARES, Elaine Pires<sup>1</sup> (sarkiselaine\_love@hotmail.com); CASTRO E SILVA, Ademir <sup>1</sup>

<sup>1</sup> Universidade Estadual do Amazonas, Centro de Estudos Superiores de Parintins – CESP/AM

Este trabalho tem como objetivo o estudo da ação degradativa do polímero sintético Polietileno Tereftalato - PET por fungos basidiomicetos amazônicos. Foram testados três linhagens fúngicas (*P. sanguineus*, FBL, FV12) e o consórcio entre os mesmos em meio de cultivo líquido estacionário, com e sem suplementação com farinha da casca do tucumã nos períodos de 15, 30, 60 e 90 dias de crescimento a  $27^{\circ}\text{C}^{\pm 1}$ . Amostras de PET foram submetidas ao pré-tratamento com temperatura  $35^{\circ}\text{C}$  e  $50^{\circ}\text{C}$ . Após incubação foram avaliados a perda de massa polimérica, a determinação de enzimas lignolíticas e análises das amostras de PET através de Microscopia Eletrônica de Varredura para verificar a ocorrência de modificações morfológicas e/ou estruturais da superfície polimérica. Todas as linhagens promoveram perda de massa do PET, destacaram-se os fungos FBL e FV12 e o consórcio C1-PYC+FBL+FV12 em 90 dias de cultivo, com PET submetido ao pré-tratamento com temperatura  $50^{\circ}\text{C}$ , com a maior perda de massa do plástico. Todos os fungos testados apresentaram atividade enzimática lignolítica. A manganês peroxidase (MnP) foi a enzima que apresentou os maiores valores de atividade dentre as três enzimas estudadas. A linhagem FV12 com PET submetido à temperatura  $50^{\circ}\text{C}$ , em 90 dias de incubação foi a que apresentou maior valor médio desta enzima. Ressalta-se que os melhores resultados foram obtidos com meio de cultura suplementado com a farinha da casca do tucumã. MEV evidencia que o PET submetido à temperatura  $50^{\circ}\text{C}$ , sofreu severo desgaste da superfície polimérica, com descamações, rupturas e aspecto quebradiço em toda superfície, assim como clareamento da amostra. Conclui-se que os fungos amazônicos estudados possuem potencial para degradar o Polietileno Tereftalato.

**Palavras-chave:** Fungos amazônicos, Polietileno tereftalato, enzimas oxidativas, biodegradação.

## ABSTRACT

### FUNGI AMAZON WITH POTENTIAL FOR DEGRADATION OF POLYETHYLENE TEREPHTHALATE-PET

SOARES, Elaine Pires<sup>1</sup> (sarkiselaine\_love@hotmail.com); CASTRO E SILVA, Ademir<sup>1</sup>

<sup>1</sup> University of Amazonas, Centre for Advanced Studies in Parintins - CESP / AM.

This work aims to study the degradative action of the synthetic polymer polyethylene terephthalate - PET by basidiomycetous fungi Amazon. Three different fungal strains (*P. sanguineus*, FBL, FV12) and the consortium between them in stationary liquid culture medium, with or without supplementation with flour bark tucumã at 15, 30, 60 and 90 days of growth at 27 ° C  $\pm$ 1. Samples of PET were subjected to pre-treatment temperature 35 ° C and 50 ° C. After incubation were evaluated polymer mass loss, the determination of ligninolytic enzymes and analysis of samples using PET scanning electron microscopy to verify the occurrence of morphological and / or structural polymeric surface. All the strains resulted in loss of mass of PET, the highlights were the fungi FBL and FV12 and the consortium C1-PYC + FBL + FV12 within 90 days of cultivation, with PET subjected to the pretreatment temperature 50 ° C, with greater weight loss plastic. All fungi tested showed enzyme activity lignolítica. The manganese peroxidase (MnP) was the enzyme that showed the highest activity among the three enzymes studied. The strain FV12 PET subjected to temperature 50 ° C in 90 days of incubation showed the highest mean value of this enzyme. It should be noted that the best results were obtained with a culture medium supplemented with tucumã shell flour. shows that PET subjected to temperature 50 ° C, suffered severe wear of the polymeric surface with flaking, ruptures and cracked appearance across the surface, as well as bleaching of the sample. It follows that the Amazon fungi studied have potential to degrade the Polyethylene Terephthalate.

Keywords: Fungi Amazon, Polyethylene Terephthalate, oxidative enzymes, biodegradation.

# 1 INTRODUÇÃO

O uso intenso de material descartado tem ocasionado um aumento na 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 (JARA, 2007).

Neste contexto, evidencia-se o plástico que é um material proveniente de resinas geralmente sintéticas e derivadas do petróleo. O uso do plástico é considerado problemático para o meio ambiente pela sua alta durabilidade e grande volume na composição total do lixo (OSE-COC, 2010). Com uma produção imensa, a indústria de embalagens é a grande responsável pelo aumento da poluição por plásticos. Este é o caso, por exemplo, do polietileno tereftalado (PET) que vem sendo extremamente utilizado como embalagens carbonatadas e que podem resistir por décadas na natureza (MÜLLER *et. al.*, 2001). O PET é um polímero considerado não degradável, resistente a hidrólise, inócuo para humanos, e visto como material acumulativo em grandes volumes, com alta resistência na atmosfera aos agentes biológicos (JARA, 2007).

Existem várias opções de tecnologias descarte/tratamento dos resíduos plásticos: através de deposição em aterros sanitários, reciclagem, compostagem (em biorreatores), incineração e biodegradação (COSTA, 2001; JARA, 2007). Assim, a biodegradação tem sido descrita como um processo fundamental para reduzir o acúmulo dos polímeros contaminantes ambientais.

A existência de microorganismos capazes de metabolizar compostos xenobióticos é de grande interesse para processos de biorremediação (CHANDRA e RUSTGI, 1998), e os fungos de decomposição branca, ou seja, os degradadores de lignina têm apresentando êxito em pesquisas relacionadas à biodegradação de poluentes (O' SULLIVAN, 1994). Estes microorganismos são capazes de transformar e mineralizar contaminantes ambientais como hidrocarbonetos aromáticos policíclicos,

corantes azo, herbicidas e outros compostos tóxicos através da ação de suas enzimas extracelulares.

Desta forma, surge o potencial fúngico ainda inexplorado da região do Baixo Amazonas no Estado do Amazonas, como alternativa para a degradação do PET. Essa região, sem ação antrópica mais contundente guarda ainda espécies fúngicas com potencial enzimático capaz de participar em vários processos industriais. Urge, portanto, a necessidade de prospecção dessa biodiversidade na busca de microorganismos capazes de produzir enzimas específicas com potencial para uso em aplicações biotecnológicas, como por exemplo, em biotransformações e tecnológicas como biorremediação, na indústria papelreira, têxtil e farmacêutica (CASTRO E SILVA *et. al.*, 2002). Lacase é uma das enzimas pertencentes ao sistema enzimático oxidativo dos fungos Basidiomicetos. Esta enzima em conjunto com a lignina peroxidase (LiP) e manganês peroxidase (MnP), são responsáveis pela degradação da lignina, polímero aromático encontrado na parede celular dos vegetais, através de um processo definido como combustão enzimática (KIRK; FARREL, 1987).

Diante do exposto, a relevância desta pesquisa para o desenvolvimento do Estado do Amazonas contempla-se no benefício refletido primeiramente sobre a população do município de Parintins, AM, no sentido de ser produzida uma ferramenta ambiental, que poderá no futuro contribuir para a produção de um produto inovador e biodegradável composto por um conjunto de enzimas com potencial para degradar compostos recalcitrantes oriundo de fungos do Baixo Amazonas.

Portanto, o presente projeto objetiva a avaliação de linhagens fúngicas da região do Baixo Amazonas capazes de promover o processo de biodegradação do PET, seguido de detecção de enzimas envolvidas com a degradação desse polímero.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 GERAL:

Investigar o potencial de fungos da classe dos Basidiomycetes coletados na região do Baixo Amazonas-AM para biodegradação de Polietileno Tereftalato (PET).

### 2.2 ESPECÍFICOS:

- Selecionar cepas fúngicas com potencial para degradar o Polietileno Tereftalato- PET;
- Avaliar o potencial da fermentação submersa na deterioração do Polietileno Tereftalato utilizando meio nutricional suplementado com matéria prima regional;
- Mensurar a perda da massa do polímero, com ou sem tratamento físico, em diferentes períodos de incubação.
- Investigar através de Microscopia Eletrônica de Varredura as alterações morfológicas e/ou estruturais dos polímeros após biodegradação.
- Determinar a atividade enzimática oxidativa (Lac, LiP e MnP) durante o período de degradação do PET.

## REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 3.1 POLÍMERO SINTÉTICO

Os primeiros materiais plásticos empregados na indústria foram obtidos de produtos naturais, por modificação química, como nitrato de celulose, proveniente da celulose do algodão, a galalite originária da caseína do leite e a ebonite, da borracha natural. Staudinger (1920) *Apud* Mano e Mendes (1999) 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. Porém, somente em 1928 foi definitivamente reconhecido pelos cientistas que os polímeros eram substância de elevado peso molecular.

A palavra “polímero” foi criada por Berzelius em 1832, para designar compostos de peso moleculares múltiplos (MANO e MENDES, 1999). Tem origem no vocábulo grego *polumeres*, composto por *polu* (πολυ) que pode ser traduzido como muitas e *meres* (μέρος) que significa partes. Polímeros são, portanto, substâncias químicas formadas por muitas partes. A estrutura molecular de um polímero consiste na repetição de pequenas unidades, ligadas por covalência, originando uma molécula bastante longa, de alta massa molar, ou seja, uma macromolécula. Estas pequenas unidades são chamadas de monômeros (do grego, uma parte). A reação que promove a união dos monômeros para formar um polímero é chamada de polimerização (LOPES, 2007).

A baquelita, uma resina fenólica (PR) foi um dos primeiros plásticos sintéticos comercializados sob a forma de artefatos, e mais tarde o policloreto vinila (PVC), o polimetacrilato de metila (PMMA) e o poliestireno (PS). Surgiram o polietileno de baixa densidade (LDPE), o poliuretano (PU) e a resina epoxídica (ER) na década de 40. E, na década de 50 foram introduzidos o polioximetileno (POM), o polietileno de alta

densidade (HDPE), o polipropileno (PP) e o policarbonato (PC) (MANO e MENDES, 1999).

Com o passar dos anos, o uso dos polímeros tem se tornado cada vez mais freqüente na sociedade e grande quantidade de artefatos estão sendo produzidos pelo homem onde os polímeros são usados como matéria-prima para suas diferentes elaborações (ROSA; CHUI, 2002). Milhões de toneladas de polímeros sintéticos são produzidos no mundo, no entanto, praticamente metade de toda esta produção é descartada rapidamente, permanecendo em depósitos de lixo e aterros sanitários por décadas (AHN *et. al.*, 2001; REDIFF, 2010), e com a popularização dos polímeros sintéticos 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. O consumo mundial de matérias plásticas foi de aproximadamente 114 milhões de toneladas em 1999 com o Brasil ocupando a sexta posição, com 3,2% do mercado consumidor mundial (PLÁSTICOS, 2010).

A expansão de uso e o grande consumo de polímeros sintéticos têm contribuído para a poluição ambiental, uma vez que podem demorar séculos para se degradar e conseqüentemente, interferir de forma negativa nos processos de compostagem e 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 (SPINACÉ; DE PAOLI, 2005).

Na realidade, sob o ponto de vista ambiental, o uso do plástico é considerado problemático pela sua alta durabilidade e grande volume na composição do lixo (OSE-COC, 2010). Estima-se que seriam necessários de 100 a 150 anos para que os polímeros sejam degradados na natureza (JARA, 2007).

Quando depositados no ambiente, os plásticos chegam aos sistemas de coleta de esgoto resultando no seu entupimento e, conseqüentemente, em inundações locais. Por outro lado, quando depositados em lixões, os plásticos apresentam risco pela queima indevida e sem controle, que pode resultar em descargas de gases tóxicos na atmosfera

(REDIFF, 2010), além do fato de dificultar a decomposição dos elementos biologicamente degradáveis (INSTITUTO GEA, 2010), prejudicando os processos fermentativos e impedindo a circulação de líquidos e gases, necessários à biodegradação dos materiais (FORLIN & FARIA, 2002).

Ressalta-se que o PET é altamente combustível, com valor aproximado de 20.000 BTU/kg e libera gases residuais quando incinerado como monóxido e dióxido de carbono, acetaldeído, benzoato de vinila e ácido benzóico (VILLAIN *et. al.*, 1994).

O acúmulo indevido de polímeros sintéticos também atinge ambientes marinhos, causando inúmeros problemas, como a ingestão de sacos plásticos por tartarugas marinhas e baleias, ingestão de bolas de polietileno por aves marinhas, mortes de focas por ingestão de plásticos provenientes de embalagens, dentre outros (CONTATO *et. al.*, 2003).

A despeito de tudo isso, os polímeros sintéticos têm sido largamente utilizados nos diversos campos industriais e domésticos com inúmeras aplicações, principalmente como materiais de embalagem, poliuretanos, poliestirenos (MUSTAFA, 1993). Suas propriedades dependem de diversos fatores, como natureza química, estrutura, massa molar, polidispersão, etc. Durante sua produção o processo de polimerização conduz à formação de cadeias poliméricas de diferentes tamanhos, e conseqüentemente de massa molares diferentes. Assim, os polímeros possuem propriedades físicas e químicas muito distintas das que têm os corpos formados por moléculas simples (GOMES, 2006). Em função disso, 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 (JARA, 2007).

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 várias aplicações, como por exemplo, lentes de óculos (em acrílico ou policarbonato), faróis de automóveis (policarbonato), janelas de trens (policarbonato) etc. (ANON, 1997).

Há diversas maneiras de se classificar os polímeros. De uma maneira geral os polímeros podem ser divididos em termoplásticos, termorrígidos (termofixos) e elastômeros (borrachas) (MANO, 1985; CANEVAROLO, 2002).

Os polímeros são formados pela união de monômeros durante o processo de polimerização (ABIQUIM, 2010). São materiais compostos por macromoléculas que são cadeias compostas pela repetição de uma unidade básica, chamada *mero*. Desta forma, origina-se o nome: *poli* (muitos) + *mero*. Os *meros* estão dispostos um após o outro, analogicamente as pérolas num colar, ou seja, uma macromolécula que assume formato muito semelhante ao de um cordão (MICHAELI, 1995).

A matéria-prima que dá origem ao polímero chama-s monômero. No caso do polietileno (PE) é o etileno, que é obtido a partir do petróleo ou gás natural, pois é a rota mais barata. O polietileno é o plástico mais conhecido e utilizado no Brasil que está presente nas sacolas de embalagens 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, os PEAD's e os PEBD's que se diferenciam entre si pelo tamanho das cadeias e arranjos moleculares (LIMA, 2001).

### **3.2 POLIETILENO TEREFALATO– PET**

O polietileno tereftalato (PET) é um termoplástico da família do poliéster formado pela reação entre o ácido tereftálico e o etileno glicol que teve suas origens nas primeiras décadas do século passado na Universidade de Harvard (KAPLAN, 1998). Estes componentes reúnem as características ideais para uma reação gradual de policondensação produzindo o mero denominado ácido tereftalato de etileno (CANEVAROLO, 2002).

Por possuir propriedades termoplásticas, isto é, pode ser reprocessado diversas vezes pelo mesmo ou por outro processo de transformação. Quando aquecidos a temperaturas adequadas, esses plásticos amolecem, fundem e podem ser novamente moldados. Em 1962, surgiu o primeiro poliéster pneumático. As garrafas produzidas com este polímero só começaram a ser fabricadas na década de 70, após cuidadosa

revisão dos aspectos de segurança e meio ambiente. Aparte de então, o PET começou a ser utilizado pela indústria de embalagens (GOMES, 2006).

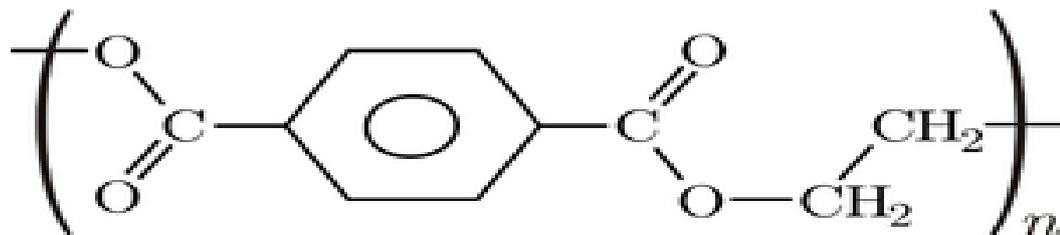
As macromoléculas de PET puro constituem-se de repetições da molécula mais simples (mero) de tereftalato de etileno. Nos polímeros comerciais, 130 a 155 repetições desse mero constituem a macromolécula típica de PET (CANEVAROLO, 2002). Por outro lado, o PET homopolímero, constituído pela repetição de um só mero (molécula simples), cristaliza-se com facilidade, prejudicando a transparência do polímero. Para se evitar esse problema as condições de processamento têm de ser muito precisas, o que atrapalha a vida do transformador. Por isso, o PET homopolímero não é muito usado. Prefere-se usar copolímeros de PET, os quais se cristalizam mais lentamente, facilitando as condições de transformação para se obter um produto com boa transparência (ANON, 1997).

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 reagirem, possibilitam longas cadeias macromoleculares, de elevada massa molar. Em cada ligação que é estabelecida, liberta-se uma molécula simples do tipo H<sub>2</sub>O ou CH<sub>4</sub> o que leva a designar o processo como condensação, diferenciando-o da polimerização por adição. 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 (SPINACÉ, 2000).

### **3.2.1 Produção da resina**

O Polietileno Tereftalato (PET) forma-se a partir dos monômeros dimetiltereftalato cristalizado (DMT) e monoetilenoglicol (MEG), através de transesterificação, para formar o Dihidroxi-etileno Tereftalato (DHET) que é um monômero do PET. A reação ocorre na presença de um catalisador com liberação de metanol. No monômero puro (DHET) tem-se  $n$  igual a 1, o qual é aumentado em aproximadamente 80 vezes para se obter a cadeia final do PET. O fator  $n$  é referido como grau de polimerização. A reação continua até que a massa molecular ideal seja

alcançada e o polímero PET seja totalmente formado (SILVA, 2009). Após sua fabricação, o polímero segue para a extrusão. Depois é resfriado e enviado para produção de grãos (*pellets*), forma mais comum de comercialização do PET pronto. Os pellets são então levados a um processo de secagem para reduzir o teor de umidade e por fim ensacados (PEREIRA *et al.*, 2002). A Figura 1. ilustra uma representação da molécula de PET.



Fonte: GOMES (2006)

**Figura 1.** Estrutura química do monômero ácido tereftalato de etileno.

### 3.2.2 Aditivação do PET

O PET normalmente não necessita de adições de plastificante ou outros aditivos para seu processamento. Mesmo no caso em que precise o uso de aditivos, a formulação é feita pelo próprio produtor da resina e não pelo transformador, que já compra o produto pronto. Normalmente nas resinas de PET são usados como agentes de reforço, fibras de aramida, esferas de vidro, carbonato de cálcio (por exemplo, em fitas magnéticas, pois melhora o coeficiente de fricção da fita), asbestos e wollastonita (CANEVAROLO, 2002).

O PET também pode ser usado na forma expandida, requerendo neste caso a adição de agentes de expansão. 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 (JARA, 2007).

### **3.3 UTILIZAÇÃO DE MICROORGANISMOS NA DEGRADAÇÃO DE PLÁSTICOS**

A busca de microorganismos capazes de degradar compostos xenobióticos é de grande interesse para os processos de biorremediação, principalmente na remoção de plásticos (CHANDRA; RUSTGI, 1998). Pesquisas intensas com este objetivo vêm sendo realizadas com a finalidade de degradar os plásticos sintéticos (ALBERTSSON; HUANG, 1995).

Um número significativo de espécies fúngicas produz substâncias de grande interesse industrial, entre as quais podemos destacar antibióticos como a penicilina ou a cefalosporina, vitaminas como a riboflavina, esteróides, ácido cítrico, etanol, enzimas tipo celulasas, proteases, amilases e muitas outras de valor industrial. Os fungos têm grande importância agrícola e ecológica, decompondo restos vegetais, degradando substâncias tóxicas e na simbiose com as plantas. Devido a sua versatilidade, os fungos vêm sendo estudados, principalmente quanto à sua aplicabilidade biotecnológica (AZEVEDO, 2003; ESPOSITO & AZEVEDO, 2004).

Bactérias e fungos são capazes de degradar a madeira, em ecossistemas terrestres naturais, sendo que fungos superiores, especialmente os da classe Basidiomycetes, são os mais eficientes degradadores (BLANCHETE, 1991; ERIKSSON *et. al.*, 1990).

#### **3.3.1 Consórcios de microorganismos fúngicos**

Os consórcios microbianos podem ser utilizados como inóculos em tratamentos biológicos, visando a redução do tempo de degradação dos resíduos. São constituídos por uma complexa população de espécies que, em sinergismo, são potencialmente aplicados na biodegradação de poluentes derivados do petróleo (COSTA *et. al.*, 2007).

Os consórcios de microorganismos apresentam atividades enzimáticas relacionadas à degradação de substâncias xenobióticas, usualmente presentes em águas industriais oleosas. Nos processos aeróbicos, o oxigênio é requerido para o processo de biodegradação, envolvendo catabolismo dos hidrocarbonetos por ação de oxidases

(GHAZALI *et. al.*, 2004). As bactérias, fungos filamentosos e leveduras são agentes transformadores eficazes, face à sua habilidade em degradar ampla gama de substância orgânicas, utilizando-as como fonte de carbono e energia durante seu crescimento. Devido à complexidade dos processos metabólicos necessários à degradação do petróleo, apenas consórcios de microorganismos com diferentes gêneros e espécies conseguem degradar as frações e derivados deste óleo (TIBURTIUS *et. al.*, 2004).

Gallego e seus colaboradores (2007) confirmaram experimentalmente que a biodegradação pelo consórcio de microorganismos, em especial o consórcio fúngico, apresenta-se como uma poderosa alternativa biotecnológica, técnica e economicamente viável nos processos de biodegradação de derivados do petróleo.

### **3.4 FUNGOS AMAZONICOS COM POTENCIAL PARA BIODEGRADAÇÃO DE XENOBIÓTICOS**

A grandeza da biodiversidade Amazônica é bem conhecida, e dentre os microorganismos que contribuem para a nossa megadiversidade estão os fungos. Com o avanço dos estudos na área biotecnológica os organismos fúngicos tornaram-se de grande interesse e vêm contribuindo com produtos e processos de importância industrial (FERREIRA, 2005).

Apesar do seu papel nos ecossistemas e suas aplicações na biotecnologia, o conhecimento sobre os fungos ainda permanece num nível incipiente, onde estima-se que somente cerca de 5% das espécies é conhecida, e que muito pouco é conhecido sobre a sua biologia (CASTRO E SILVA *et.al.*; 2002).

Para a Amazônia, as estimativas estão longe de significar o seu real potencial micológico tendo em vista as grandes áreas e diferentes ecossistemas que ainda não foram devidamente estudados, e que com toda certeza contém uma flora micológica que poderá nos revelar grande incidência de microorganismos ainda desconhecidos da ciência ou mesmo de ocorrência não citada para determinada área na Amazônia (CASTRO E SILVA, *et. al.*; 2002). Souza (2002), por exemplo, realizando estudos taxonômicos de representantes da Ordem Agaricales Clements (Hymenomycetes, Basidiomycotina) na Reserva Biológica Walter Egler – INPA (Manaus/AM) cita a ocorrência de 38 espécies, distribuídas em 13 gêneros e 6 famílias citadas pela primeira vez para a Reserva. Essa

Ordem tem grande importância ecológica e várias espécies tem valor econômico como comestíveis (MAU *et al.*, 1991; SONG *et al.*, 1991) e no uso em processos biotecnológicos devido ao "pool" enzimático, que é importante na bioconversão de resíduos lignocelulósicos, e que pode ser usado na biorremediação de solos contaminados e no tratamento de efluentes da indústria papelreira e têxtil ( MATHEUS & OKINO, 1998).

Castro e Silva *et al.*, (1993) trabalhando com cepas de fungo de podridão branca proveniente da Amazônia concluíram que o "pool" enzimático do *P. sanguineus* o indica como potencial na descoloração de efluente Kraft de indústria papelreira, uma vez que a presença de lignase ou lacase, juntamente com manganês peroxidase (MnP) na presença de  $\beta$ -glucosidase, são importantes para a degradação de compostos cloroligninos (ESPOSITO *et al.*, 1991; DURÁN, 1992).

Pesquisas científicas estão sendo realizadas, visando descobrir novas alternativas de uso das enzimas de estirpes fúngicas amazônicas através da biotecnologia para gerar uma ferramenta ambiental na forma de um produto oriundo de fungos amazônicos voltada para beneficiar a sociedade os ecossistemas terrestres e aquáticos da Amazônia. Vislumbra-se produzir uma tecnologia que não produzirá novas formas de poluição, as enzimas, ou seja, proteínas biodegradáveis na forma de um produto, que será formado por um conjunto de enzimas que tem potencial para degradar compostos que são recalcitrantes (ERIKSSON *et al.*, 1990). Portanto, o que se busca é obtenção de um produto inovador e biodegradável onde através de seu uso se estará colaborando para minimizar os impactos ambientais negativos decorrentes do resíduo sólido PET e de sua liberação no ambiente. Um produto que atue para minimizar a bioacumulação de substâncias tóxicas nos seres vivos expostos a agentes tóxicos, bem como também para minimizar a biomagnificação que atinge a cadeia alimentar aquática e terrestre, podendo chegar ao topo da cadeia alimentar.

Neste contexto, a região do Baixo Amazonas apresenta-se como um grande laboratório, com uma biodiversidade fúngica em sua magnitude ainda inexplorada que apresenta possibilidades de aplicações nos mais diversos setores industriais.

### 3.5 O COMPLEXO OXIDATIVO LIGNOLÍTICO DE FUNGOS BASIDIOMICETOS.

Alguns fungos são capazes de degradar lignina, o polímero existente na parede celular das plantas, a partir de um sistema enzimático produzido durante o metabolismo secundário (REYES, 2003). A mineralização completa da lignina pelos microorganismos requer dois processos importantes: a hidrólise do polímero e clivagem do anel do núcleo aromático (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. Diferentes fungos de decomposição branca produzem diferentes combinações de enzimas: existem o 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).

Lacase é uma das enzimas pertencentes ao esse sistema enzimático dos fungos lignolíticos que em conjunto com a lignina peroxidase (LiP) e manganês peroxidase (MnP), são responsáveis pela degradação da lignina, através de um processo definido como combustão enzimática (KIRK; FARREL, 1987).

Lacases são geralmente as primeiras enzimas lignolíticas a serem secretadas para o meio pelos fungos. Normalmente, oxidam somente aqueles compostos de lignina com um grupo fenólico livre, formando radicais fenoxis (GIANFREDA *et. al.*, 1999). Muitas aplicações da lacase requerem o uso de mediadores redox, ou seja, grupo de compostos orgânicos de baixo peso molecular que podem ser oxidados pela lacase (GOCHEV; KRASTANOV, 2007). ABTS [2,2 – azino – bis – (3 – ethilbenzothialine – 6 – sulphonic acid)] foi um dos primeiros mediadores para lacase (CALL; MUCCKE, 1997). Essas enzimas são amplamente estudadas pelo grande potencial biotecnológico como produção de celulose e papel, na indústria têxtil, biorremediação e na síntese de produtos químicos/medicinais (DURAN; ESPOSITO, 2002).

A Lignina Peroxidase (LiP), uma glicoproteína contendo um grupo heme é responsável pela degradação da lignina na presença de peróxido de hidrogênio e tem capacidade para oxidar um grande número de substâncias aromáticas, incluindo compostos altamente poluentes e pesticidas. Estas propriedades fazem a LiP potencialmente útil em produções que utilizam matéria-prima lignocelulósica tais como a indústria de papel e de polpas, e na conversão da lignina em sub-produtos tais como combustível e ração animal (MACEDO *et. al.*, 1999).

A Manganês Peroxidase (MnP) que também contém grupo heme, oxida o  $Mn^{+2}$  a  $Mn^{+3}$  que então oxida os anéis fenólicos a radicais fenoxi na presença de peróxido de hidrogênio levando à decomposição dos compostos. O papel crucial da MnP na biodegradação da lignina está relacionado a despolimerização e desametilação da lignina e clorolignina, no branqueamento de polpas e na mediação das etapas iniciais de degradação da lignina de alto peso molecular (HATAKA, 1994).

### **3.6 DEGRADAÇÃO DE POLÍMEROS**

A maioria dos polímeros sintéticos são considerados resistentes ao ataque microbiano. Esse fenômeno começou a gerar um grave problema econômico e ambiental quando os aterros sanitários começaram a ficar saturados, constituindo o plástico, uma parcela importante nesta problemática, visto que permanece inalterado no ambiente por um longo período de tempo (MUSTAFA, 1993).

A biodegradabilidade dos polímeros depende de várias propriedades físicas e químicas (SILVA, 2009), cujos procedimentos para a determinação da resistência de polímeros sintéticos a degradação fúngica consistem na seleção de espécimes plásticos adequados para determinação de propriedades convenientes de resistência ao ataque microbiano, inoculação dos espécimes plásticos com microorganismos selecionados, exposição dos espécimes plásticos inoculados a condições favoráveis ao crescimento microbiano e avaliação do crescimento visual (ASTM G21-90, 1990).

O polietileno maciço de baixo peso molar facilita o crescimento fúngico a um determinado grau (AGARWAL *et. al.*, 1971). Embora diversos microorganismos facilitem a biodegradação dos hidrocarbonetos, a biodegradação do polietileno é um processo muito lento (ALBERTSSON; RANBY, 1976).

Silva (2009) refere que a deterioração do PET pode ocorrer por duas rotas: pela fotoclivagem direta do polímero e por subsequente fotoxidação dos grupos glicol. Quando expostos à luz solar a foto oxidação não é uniforme sendo degradado, preferencialmente, na superfície orientada pela luz. Em relação à degradação hidrolítica todos os poliésteres aromáticos podem ser degradados a temperaturas máximas de utilização em torno de 105° C (MARK *et al.*, 1986). Embora sua estabilidade térmica seja relativamente alta, substâncias voláteis tóxicas são emitidas à temperaturas de 200-300° , durante a produção, processamento e reciclagem do material, produzindo principalmente acetaldeído, formaldeído, monóxido de carbono e benzeno. As reações de degradação termo-oxidativas são mais complicadas com a participação do O<sub>2</sub> formando hidroperóxido seguido pela ruptura da cadeia (DZIECIOL & TRZESZCZYNSKI, 1998).

A decomposição de compostos orgânicos por microorganismos é um fenômeno comum e muito desses materiais orgânicos, como alimentos, produtos de madeira ou demais matérias orgânicas, são decompostos e retornam ao ambiente na forma de compostos simples, como dióxido de carbono, água ou amônia. Muitos desses materiais contém, polímeros naturais, como celulose, amido, lignina e proteínas e assim, a biodegradação de alguns compostos orgânicos se torna um processo conhecido na natureza (MUSTAFA, 1993).

A biodegradação é um processo natural, onde compostos químicos presentes no ambiente são convertidos a componentes mais simples, mineralizados e redistribuídos através do ciclo do carbono, nitrogênio e enxofre (CHANDRA e RUSTGI, 1998). A biodegradação foi definida por GÖPFERICH (1996) como um processo de quebra da cadeia durante a qual a cadeia polimérica é clivada para formar oligômeros e finalmente monômeros.

O estudo de microorganismos, como os fungos de decomposição branca, capazes de degradar polímeros sintéticos faz-se necessário, uma vez que a incineração não adequada de compostos plásticos emite gases tóxicos ao homem e a reciclagem de materiais plásticos não é amplamente utilizada (REYES, 2003). O manejo adequado de polímeros sintéticos requer combinações complementares de incineração, reciclagem e

biodegradação, sendo esta última a solução mais eficaz a longo prazo, requerendo, portanto intensa pesquisa e desenvolvimento.

### **3.6.1 Técnicas para avaliação de alterações estruturais de polímeros**

Um dos métodos analíticos mais simples utilizados para avaliação de alterações decorrentes de biodegradação polimérica é a pesagem dos espécimes plásticos antes e após os ensaios de incubação com os microorganismos, para controle de perda de massa dos polímeros com a biodegradação (ASTM D5210-92, 1992).

As análises de superfícies mais empregadas no campo da ciência de polímeros para investigações morfológicas são as de Microscopia Eletrônica. O Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV) é uma das ferramentas mais indispensáveis utilizadas por várias empresas para analisar os constituintes e estruturas de novos materiais desenvolvidos, até mesmo como técnica de rotina (SCOTT e GILEAD, 1995).

Observar a degradação de um polímero é de extrema dificuldade, pois este fenômeno pode ocorrer sem que haja necessariamente a perda de massa do polímero, mas alterações na molécula do polímero podem ser observadas (SCHNABEL, 1981; SCOTT & GILEAD, 1995).

Desta forma, a Microscopia Eletrônica de Varredura demonstra ser uma ferramenta eficaz no estudo de superfícies e morfologia dos polímeros e de grande importância como instrumento complementar para avaliação da degradação (BASSET, 1981; ALLEN & BEVINGTON, 1989; SCOTT & GILEAD, 1995).

## **3.7 RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS**

O termo resíduo é utilizado em sentido amplo englobando não somente sólidos como também os efluentes líquidos e os materiais presentes nas emissões atmosféricas. Assim como os plásticos, o acúmulo de resíduos agroindustriais causa um grande impacto ambiental já que a maioria desses materiais é parcialmente ou completamente desperdiçados (TIMOFIECSYK & PAWLOWSKY, 2000).

A busca da utilização dos resíduos agroindustriais, devido à incessante demanda das atividades agrícolas, vem também em função do acúmulo destes resíduos que gera a deterioração do meio ambiente e perda de recursos, com contribuição significativa para o problema da reciclagem e conservação da biomassa. Diversos processos são desenvolvidos para utilização desses materiais, transformando-os em compostos químicos e produtos com alto valor agregado como álcool, enzimas, ácidos orgânicos, aminoácidos, etc. O resíduo da agroindústria brasileira pode ser potencial para diferentes alternativas de substratos para a fermentação, e pode contribuir para minimizar o problema da poluição ambiental (PANDEY *et al.*, 2000).

Ampla variedade e quantidade de resíduos orgânicos são gerados anualmente pela atividade agroindustrial (CHANG, 1997). Os resíduos agrícolas, florestais e agroindustriais, sendo, na sua maioria, biomassa lignocelulósica, representam uma fonte abundante e renovável de substratos que podem ser biologicamente convertidos em biomassa microbiana de elevado valor nutricional (SILVA, 2009). Estes resíduos agroindustriais são, em sua maioria, de natureza lignocelulósica (KEREM *et al.*, 1992), e a utilização de material lignocelulósico são uma grande alternativa para a geração de energia, devido a sua grande disponibilidade na natureza. Atualmente, os maiores usos da lignocelulose concentram-se na indústria de celulose e papel, proteína para ração alimentar, além de poderem gerar energia através da produção de etanol (BALLESTEROS, 2001).

De uma forma geral os resíduos agrícolas contêm de 20 a 60% de celulose, 20 a 30% de hemicelulose e 15 a 30% de lignina (COWLING e KIRK, 1976).

De acordo com Sermanni; Porri (1989), a utilização desse material lignocelulósico para a obtenção de compostos de alto valor econômico, por biotransformação, é um dos mais interessantes campos da pesquisa biotecnológica. Segundo Doelle (1996), uma tecnologia de fermentação desenvolvida a partir de materiais lignocelulósicos resultando em múltiplos produtos, sem efluentes poluentes no solo, na água e no ar, é caracterizada como uma “tecnologia integrada”.

### 3.7.1 *Astrocaryum aculeatum* Meyer – Tucumã da Amazônia

A Amazônia apresenta inúmeras espécies nativas de plantas frutíferas que apresentam potencial econômico, tecnológico e nutricional, que vem despertando o interesse de estudos científicos em diversificadas áreas, tais como: alimentícia, farmacêutica, cosmética, aromatizante e essências (CLEMENT *et.al.*, 2005; YUYAMA *et.al.*, 1998). Dentre eles verifica-se o tucumã (*Astrocaryum aculeatum* Meyer), fruto da árvore tucumãzeiro, encontrada em ecossistema de terra firme da Amazônia central e ocidental, em ambientes degradados e de vegetação secundária (FAO, 1987).

O tucumã é considerado nativo do norte da América do Sul, onde tem seu centro de dispersão até a Guiana Francesa e Suriname. O gênero *Astrocaryum* apresenta diversas variações de espécimes, tais como: *Astrocaryum vulgare* Mart., *A. aculeatum* Meyer., *A. segregatum* Dr., *A. princeps* Bard., *A. giganteum* Bar., *A. tucumã* Mart., *A. acaule* Mart., *A. cantensis*, *A. chonta* Mart., *A. leisphota* Bard., *A. undata* Mart. No entanto, nos estados do Pará e Amapá, a espécie comumente encontrada é o *A. vulgare* Mart (VILLACHICA, 1996).

O fruto é uma drupa globosa ou ovóide, cujo mesocarpo é fibroso e de coloração amarelo-alaranjada, contendo alto teor de pró-vitamina A (AGUIAR *et al.*, 1980; MARINHO; CASTRO, 2002), lipídios e energia (AGUIAR, 1996; YUYAMA *et al.*, 2005). A polpa é apreciada e consumida pela população na forma in natura ou como recheio de sanduíches, tapioca, cremes e sorvetes. O sub aproveitamento do fruto e sua importância econômica estão atrelados à exploração tecnológica da polpa, possibilitando assim, aumento da vida-de-prateleira e sua disponibilidade no período da entressafra (YUYAMA *et al.*, 2008).

Os frutos e sementes são utilizados na alimentação humana e de animais, as folhas e estipes construção de casas pelas populações do interior da Amazônia (MIRANDA, 2001). Esta espécie comumente encontrada na região amazônica pode alcançar de 10 a 15 m de altura, 15 a 20 cm de diâmetro (CLEMENTE *et. al.*, 2005; CAVALCANTE, 1991). Cresce próximo de rios, em áreas não cobertas com água, em terra firme, cobertura vegetal baixa e em campo limpo. Tem característica de florescer e frutificar durante quase todo o ano. Os frutos normalmente elipsóides, alaranjados, quando maduros apresentam de 3 a 5 cm de comprimento e possuem um odor

característico. A polpa alaranjada de 2 a 4 mm de espessura, de consistência pastoso-oleosa apresenta uma característica fibrosa (FERREIRA, *et. al.*, 2008).

O mesocarpo (polpa) é considerado uma fonte alimentícia altamente calórica, (MORAIS; DIAS, 2001) devido ao elevado conteúdo de lipídios, apresenta elevado potencial de pró-vitamina A (caroteno), (MARINHO; CASTRO, 2002; YUYAMA *et.al.*, 1998) teores satisfatórios de fibra (RIBEIRO; SOARES, 1995) e vitamina E (LUBRANO *et. al.*, 1994; BROCHIER, 2000). O óleo de cor amarela extraído do mesocarpo possui características organolépticas e nutritivas de alto valor para a indústria de alimentos e cosmética. Poucos estudos têm sido realizados a fim de contribuir para a sua domesticação e aproveitamento sendo sua comercialização ainda caracterizada por um mercado meramente local (FERREIRA *et. al.*, 2008).

Considerando a escassez de informações em relação aos constituintes nutricionais da polpa do tucumã e o percentual expressivo de desperdício do mesocarpo aderido ao epicarpo do fruto, quantificou-se os teores  $\pm$  de elementos minerais e a composição centesimal do fruto e casca do tucumã (YUYAMA *et. al.*, 2005) (Tabela 1).

Trabalhos anteriores já demonstraram que na sua composição química do fruto do tucumã encontra-se, em média, 46% umidade, 5% de proteínas, 30% de lipídios, 9% de fibras e 3% de minerais (GUEDES, *et. al.*, 2005; MORAIS; DIAS, 2001; YUYAMA *et. al.*, 1998; RIBEIRO; SOARES, 1995).

Estudos realizados com frutos do tucumã oriundos do Puraquequara (Manaus, AM), doravante denominado de (pop.1) e Rio Preto da Eva (AM), (pop. 2) demonstraram que o percentual da parte comestível do tucumã na ordem de 22% é pouco representativo quando comparado ao caroço em torno de 61% do fruto e a casca 17% (Tabela 1).

Os resultados demonstram o potencial do tucumã (polpa e casca) como fonte de potássio, cálcio, e selênio e a polpa com teores expressivos de lipídios e conseqüentemente energia, assim como fibra alimentar, predominantemente na casca, demonstrando a viabilidade de utilização da mesma (YUYAMA, *et. al.*, 2005).

**Tabela 1.** Composição química do Tucumã da Amazônia (*Astrocaryum aculeatum* Meyer) oriundos de Manaus e Rio Preto da Eva, AM.

Composição química do Tucumã	Puraquequara/Manaus-AM (Pop.1)		Rio Preto da Eva/Am (Pop.2)	
	Polpa	Casca	Polpa	Casca
<b>Teor de lipídeos</b>	37.50%	nd	33.90%	nd
<b>Fibra alimentar</b>	6%	17.90%	7.10%	17.70%
<b>Cálcio</b>	87.4±2.2 mg%	61.4±6.2 mg%	57.9±4.8 mg%	58.2±13.5 mg%
<b>Sódio</b>	1.4±0.2mg%	2.6±0.3 mg%	1.0±0.2 mg%	3.6±0.2 mg%
<b>Potássio</b>	431.5±31.7 mg%	795.3±20.2 mg%	517.6±21.2 mg%	1113.6±51.8 mg%
<b>Ferro</b>	0.6±0.1 mg%	1.4±0.2 mg%	2.0±0.2 mg%	2.4±0.2mg%
<b>Zinco</b>	0.5±0.01 mg%	0.5±0.05 mg%	0.5±0.01mg%	0.6±0.01 mg%
<b>Selênio</b>	nd	4.±00.9 [g%	7.6±1.0 [g%	13.9±2.4 [g%
<b>Bromo</b>	453.32±7 [%	642.1±1.8 [%	90.6±0.4 [g%	236.2±5.7 [g%

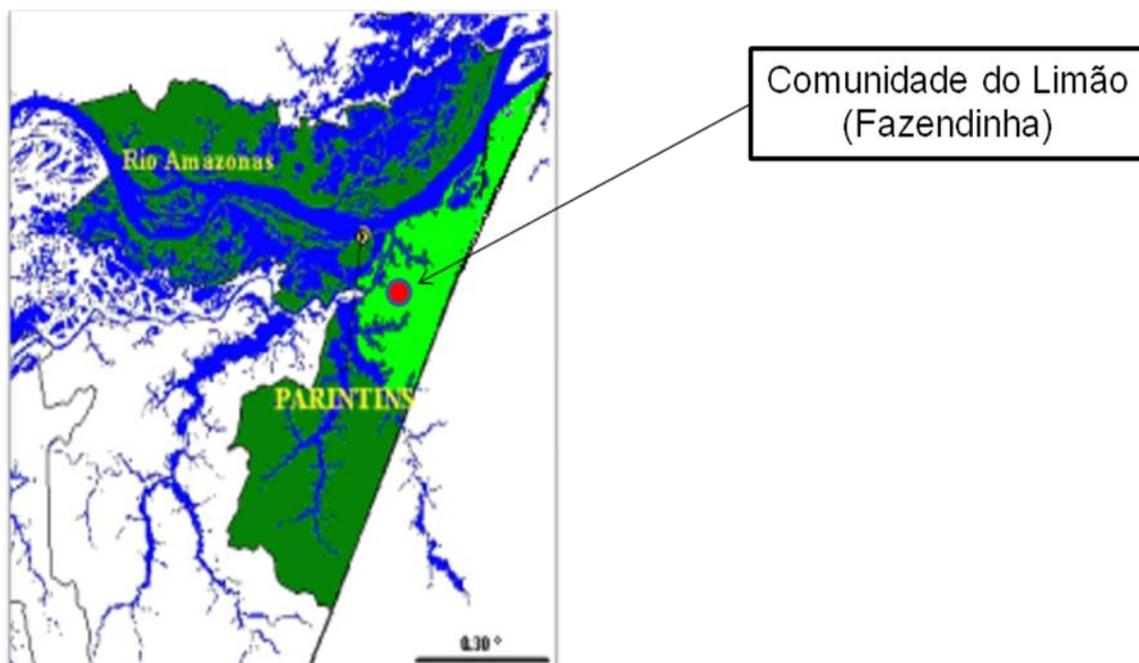
Fonte: YUYAMA, *et. al.*, (2005)

nd- não detectado

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 COLETA DE FUNGOS

Carpóforos de 12 fungos pertencentes à classe dos Basidiomicetos degradadores de madeira foram coletados na zona rural região da comunidade do Limão, especificamente na propriedade particular Fazendinha, interior do município de Parintins-AM, região do Baixo Amazonas (Figura 2). As amostras foram acondicionadas em sacos de papel poroso e transportados para o Laboratório de Estudos Fúngicos – LabEF, do Centro de Estudos Superiores de Parintins-CESP, onde foi realizado o isolamento para obtenção das culturas axênicas e posterior uso nos testes experimentais.



Fonte: Projeto de Assentamento da Gleba Vila Amazônia, 2009.

**Figura 2.** Mapa de Parintins- Local de coleta dos carpóforos fúngicos.

Dentre as linhagens fúngicas coletadas, somente o fungo *P. sanguineus* foi identificado, os demais foram devidamente codificados para posterior identificação taxonômica.

## 4.2 ISOLAMENTO FÚNGICO E PREPARO DO INÓCULO

As amostras dos fungos foram submetidas à assepsia, retirando fragmentos do basidiocarpo e mergulhando-os em soluções de álcool a 70% com a finalidade de quebrar a tensão superficial, o hipoclorito de sódio a 20 % para eliminar microorganismos agregados e água destilada para retirar o excesso das soluções e evitar oxidação, por um período de 1-2 minutos em cada solução.

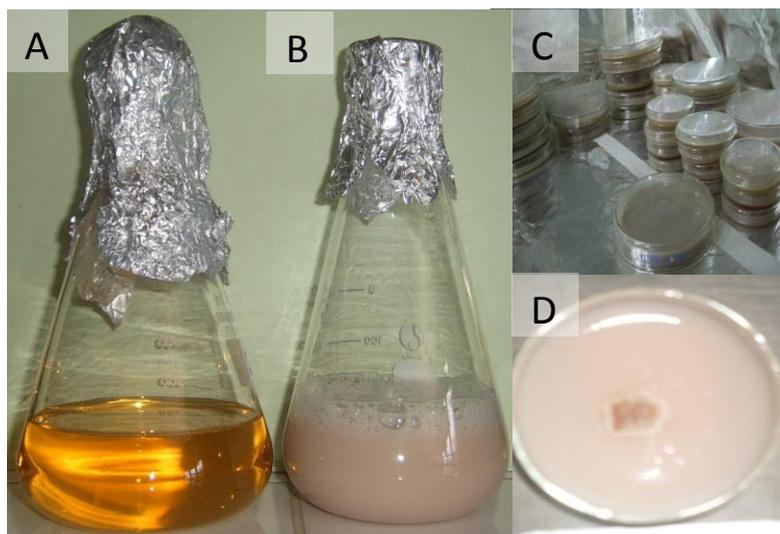
O preparo do inóculo foi feito em placas de Petri contendo o meio de cultura semi- sólido BDA (Batata, Dextrose Agar), nas proporções 39g de Agar BDA e 1000 ml de água destilada. As linhagens foram incubadas em temperatura ambiente ( $27 \pm 1^\circ\text{C}$ ) por um período de 5 dias. O processo de repicagem ocorreu no meio BDA, procedimento este executado em ambiente estéril (interior da Câmara de Fluxo Laminar), para a obtenção de culturas puras. As placas de Petri foram identificadas, lacradas com fita plástica (Parafilm "M"). As culturas foram armazenadas em temperatura de  $4^\circ\text{C}$ , para posterior utilização.

Após o crescimento homogêneo nas placas, os microorganismos em estudo foram transferidos para o meio de crescimento líquido.

## 4.3 CAPACIDADE ENZIMÁTICA OXIDATIVA

A capacidade de distinguir isolados capazes de produzir fenoxidase foi determinada pelo teste de Bavendamm (DAVIDSON, *et.al.*, 1938). Para isso discos de micélio com 5mm de diâmetro foram retirados das bordas de colônias com 5 dias de crescimento e transferidos para placas de Petri contendo meio BDA e ácido tânico ( $5\text{gL}^{-1}$ ). Para o preparo do meio utilizou-se 500 ml do meio de cultura BDA com 50 ml a menos de água destilada, que foi esterilizada separadamente em autoclave. Após esterilização e resfriada a água acrescentou-se em condições assépticas 2,5g de ácido tânico e agitou-se até a formação da mistura homogênea. Após esse procedimento

adicionou-se esta solução ao meio de cultura BDA levemente morno. Os fragmentos fúngicos previamente miceliados foram inoculados no centro da placa e incubados em estufa BOD a 30°C para observação dos aspectos de indicação de fenoloxidasas. Após 24 horas de incubação, realizou-se a avaliação visual quanto à formação de um halo marrom considerado como reação positiva para produção de fenoloxidasas. Os fungos que apresentaram reação positiva em menor tempo foram utilizados para teste biológicos com PET.



**Figura 3:** Teste de Bavendamm. A- Ácido tânico; B- Meio de cultura BDA homogeneizado com ácido tânico; C- Meio vertido em placas de Petri; D- Fragmento fúngico inoculado no meio teste.

#### 4.4 PREPARO DOS POLÍMEROS SINTÉTICOS

As amostras utilizadas nos ensaios foram confeccionados a partir de garrafas Polietileno Tereftalato - PET pós uso. As amostras foram constituídas na forma de quadrados (1x1 cm e com espessura de 0,35 mm). Nesta etapa realizou-se também a pesagem das amostras.

##### 4.4.1 Desinfecção das amostras de PET

Após pesagem, as amostras dos plásticos foram desinfetadas para eliminação de contaminantes microbianos. Este procedimento foi realizado de acordo com o protocolo desenvolvido e validado pela American Society for Testing Materials (ASTM G22-76, 1990) e constituídos dos seguintes passos:

1) Para o preparo da solução desinfetante universal (LEE *et. al.*, 1991), foi utilizado um litro de água estéril e foram adicionados 14 ml do detergente Tween 80, que foi esterilizada por filtração com membrana de éster de celulose de porosidade 0,22 µm (Millipore GSW04700) com bomba de vácuo. Após filtração foi adicionada 20 ml de hipoclorito de sódio.

2) Os espécimes plásticos previamente pesados foram colocados em “saquinhos” confeccionados com gaze e identificados com o peso inicial e em seguida adicionados à solução desinfetante universal por 60 minutos e deixados em temperatura ambiente, agitando-se ocasionalmente com um bastão de vidro estéril (REYES, 2003). Com o auxílio de uma pinça estéril, cada plástico imerso na solução desinfetante universal foi removido e transferido para outro frasco contendo apenas água estéril à temperatura ambiente, também misturando-se ocasionalmente para ocorrer uma lavagem efetiva, por no mínimo 1 hora.

3) Os plásticos foram novamente removidos e mergulhados em um béquer contendo uma solução de etanol a 70%, sempre mantendo o frasco coberto e à temperatura ambiente por 30 minutos. Por fim, as amostras plásticas desinfetadas foram acondicionadas em frascos estéreis fechados em local arejado e à temperatura ambiente para propiciar a evaporação de resíduos de etanol das amostras por um período de 12 dias.

#### **4.5 SUBSTRATO UTILIZADO PARA O MEIO DE CULTIVO**

O meio de cultivo utilizado como substrato para o crescimento fúngico foi composto de matéria prima regional a partir da casca do tucumã (*Astrocaryum aculeatum* Meyer). Frutos do tucumã foram coletados na Feira Municipal, descascados e desidratados, em seguida triturados em moinho de facas, formando-se desta forma a farinha da casca de tucumã (MFT). Foram utilizados 20g da farinha de tucumã e 500 ml de água destilada. Foram realizados também tratamentos com o meio sem suplementação deste resíduo (M1), ambos devidamente autoclavados a 121° C por 20 minutos.

## **4.6 CONTROLE ABIÓTICO E BIÓTICO**

### **4.6.1 Controle Abiótico**

Foram utilizados erlenmeyers contendo apenas os substratos submetidos à fermentação submersa inoculados com os polímeros, ou seja, não foram inoculados com os microrganismos. Desta forma, eliminou-se a interferência das características dos microrganismos. Este controle foi realizado em triplicata, sendo três frascos para cada período de incubação.

### **4.6.2 Controle Biótico**

Foram utilizados erlenmeyers contendo apenas os substratos submetidos à fermentação submersa inoculados com os microrganismos, ou seja, não foram inoculados com os polímeros. Desta forma, eliminou-se a interferência das características dos polímeros. Este controle foi realizado em triplicata, sendo três frascos para cada período de incubação.

## **4.7 FERMENTAÇÃO SUBMERSA – FS**

Para os testes de perda de massa do PET em fermentação submersa, foi utilizado o meio de cultivo contendo resíduo agroindustrial à base de farinha da casaca de tucumã - MFT e meio sem suplemento deste resíduo - M1, foram realizados 288 ensaios sendo tratamentos individuais, com consórcio de fungos (com amostras de PET submetidas ao pré-tratamento com temperatura 35° e 50°C e o controle). Erlenmeyers de 125 ml foram utilizados nos quais foram adicionados 50 ml do meio de cultivo, devidamente autoclavados a 121°C por 20 minutos. Em câmara de fluxo laminar adicionou-se 05 amostras do polímero previamente desinfetado.

Os fungos previamente crescidos em placa de Petri contendo BDA foram inoculados em fermentação submersa em câmara de fluxo laminar na proporção de 1cm<sup>2</sup> para cada 50 ml de meio de cultura líquido (CLEMENTE, 2002; PAVARINA, 2002).

A incubação foi feita em estufas à 30° C em condição estacionária durante 15, 30, 60 e 90 dias. Após os períodos determinados de fermentação, as amostras foram filtradas e uma alíquota do caldo obtido foi transferida para tubos de ensaios de 10 ml que foram armazenados em freezer à -10°C e os polímeros utilizados também foram reservados, para posteriores análises (REYES, 2003).

#### **4.8 TRATAMENTO COM CONSÓRCIO DE FUNGOS**

Esta etapa consistiu em realizar crescimento dos fungos concomitantemente obedecendo aos tratamentos seguintes:

1) A partir do 5º dia de crescimento, foram retiradas amostras do fungo *P. sanguineus* de cerca de 1cm<sup>2</sup> e inoculados para cada 50 ml de meio de cultura líquido. Após 48 horas foram inoculados amostras do fungo FBL e 72 horas depois foi realizado a inoculação do fungo FV12, obtendo-se desta forma o consórcio C1-PYC+FBL+FV12;

2) Este tratamento é constituído pela inoculação inicial de *P. sanguineus* e após 48 horas ocorreu a inoculação do segundo fungo FBL, formando-se o consórcio C2- PYC+FBL;

3) Para o terceiro tratamento inoculou-se primeiramente *P. sanguineus* e após 48 horas foi inoculado o fungo FV12, constituindo-se o consorcio C3-PYC+FV12.

A incubação foi feita em estufas à 30° C em condição estacionária durante 15, 30, 60 e 90 dias. Após os períodos determinados de fermentação, as amostras foram filtradas e uma alíquota do caldo obtido foi transferida para tubos de ensaios de 10 mL que foram armazenados à -10°C e os polímeros utilizados também foram reservados, para posteriores análises (REYES, 2003).

#### **4.9 POLIETILENO TEREFALATO SOB PRÉ-TRATAMENTO COM TEMPERATURA 35°C E 50°C**

Os polímeros plásticos cortados em partículas, correspondentes ao tamanho de 1x1 cm, com espessura de 0,35 mm, previamente pesados e desinfetados, foram

submetidos ao pré-tratamento com temperatura 35°C e 50°C durante 72 horas em estufa. (JARA, 2007).

Os ensaios foram realizados em fermentação submersa utilizando Erlenmeyers de 125 ml contendo 50 ml do meio, uma amostra dos microrganismos em estudos e 05 amostras do PET, que foram incubados durante 15, 30, 60 e 90 dias em estufas em condição estacionária à 30° C. Após os períodos determinados de fermentação, as amostras foram filtradas e uma alíquota do caldo obtido foi transferida para tubos de ensaios de 10 ml que foram armazenados à - 10°C e os polímeros utilizados também foram reservados, para posteriores análises (REYES, 2003).

#### **4.10 DETERMINAÇÃO DA PERDA DE MASSA DOS POLÍMEROS**

As amostras dos plásticos cortados na forma de quadrados (1x1 cm) foram previamente pesados em balança analítica. Após os períodos de incubação, os polímeros foram colocados em pesa-filtros e deixados em estufas de secagem a 50° C por 12 horas. A determinação da perda de massa dos polímeros foi baseada na metodologia ASTM D5247-92 (1992) que consiste em colocar as amostras em solução de NaOH 5 mol.L-1 por aproximadamente 8 horas para retirada da massa microbiana e em seguida lava-se em água corrente e mantém em repouso durante 8 horas em água destilada.

Após este período, as amostras condicionadas em pesa-filtros, foram novamente colocadas em estufas de secagem a 50° C por 12 horas para determinação da perda de massa dos polímeros. O percentual de perda de massa dos polímeros foi calculado através da seguinte equação:

$$P_M (\%) = \frac{P_i - P_f}{P_i} \times 100$$

P = peso do PET, em porcentagem.

Pf = peso final

Pi = peso inicial

## 4.11 MICROSCOPIA ELETRONICA DE VARREDURA

### 4.11.1 Preparação das Amostras

O protocolo utilizado foi uma adaptação a partir de dados de literatura para processamento de amostras biológicas (BAL-TEC, 1999). A metodologia de processamento das amostras de polímeros contendo células microbianas foi composta das seguintes etapas:

1) Com o auxílio de um bisturi e pinça, os plásticos foram cortados em dimensões bem reduzidas e pouca espessura, em seguida foi realizada a primeira fixação, onde os plásticos foram mergulhados em solução de glutaraldeído 2% preparado em tampão cacodilato de sódio ( $\text{Na}(\text{CH}_3)_2\text{AsO}_2$ ) 0,1 M, e 0,2% de ácido tânico, por 3 horas. Para a segunda fixação os plásticos foram novamente mergulhados em solução glutaraldeído 2% em tampão cacodilato de sódio 0,1 M, porém com 2% de ácido tânico, por 3 horas.

2) Em seguida as amostras foram lavadas três vezes em tampão cacodilato de sódio 0,1 M, por 10 minutos com 3 repetições. Ocorreu uma etapa de pós-fixação, na qual os plásticos foram imersos em solução de tetróxido de ósmio ( $\text{OsO}_4$ ) a 1% diluído em tampão cacodilato de sódio 0,1 M por 1 hora. Logo após, foi realizada a segunda lavagem onde as amostras foram mergulhadas em água destilada por 10 minutos com 3 repetições.

3) A desidratação ocorreu em soluções com concentrações crescentes de etanol absoluto, nas concentrações de 30%, 50%, 70%, 90% e 100%, durante 10 minutos em cada solução. As amostras serão passadas na solução a 100% por 3 vezes. Posteriormente, a secagem foi realizada no equipamento denominado ponto crítico, colocadas em suportes específicos (stubs), e presas com uma cola de prata, em seguida metalizadas com ouro e mantidas em dessecadores para a visualização no MEV.

#### 4.11.2 Análise Morfológica do PET- MEV

As amostras de PET foram preparadas para visualização morfológica por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) de sua superfície, ausente de microrganismos, segundo adaptações do protocolo da BAL-TEC (1999).

Os polímeros foram fixados em suportes específicos (stubs) onde permaneceram em repouso durante aproximadamente 4 horas para fixação e posteriormente foram metalizadas com ouro (Sputter) e mantidas em dessecadores para visualização no MEV.

Após todas as etapas de preparo relacionadas anteriormente, os espécimes foram adaptados em um porta-amostras e elétron-micrografadas em Microscópio Eletrônico de Varredura (Jeol – JSM 5800 LV). As imagens obtidas foram capturadas pelo computador, acoplado ao MEV, e armazenadas para posterior análise.

#### 4.12 DETERMINAÇÃO ENZIMÁTICA

Todas as determinações das atividades enzimáticas foram realizadas em triplicata. As leituras da absorvância foram realizadas em espectrofotômetro UV – 1201 – Shimadzu e as atividades enzimáticas foram expressas em UI/L, onde UI é a quantidade de enzima necessária para causar perda de 1 $\mu$ mol de substrato por minuto sob condições específicas. Os valores foram obtidos através de cálculos utilizando-se a fórmula abaixo.

**Equação para determinação enzimática (U/Litro), (LEONIWICZ e GRZYWNOWICZ, 1981).**

•

$$U/L = \frac{\Delta \text{ Abs. } \times 10^6}{\epsilon \times R \times t}$$

$\Delta$  Abs. = absorvância (final-inicial)

$\epsilon$  = absorvância molar

R = qtde. de caldo enzimático utilizado

t = tempo de reação utilizado

#### 4.12.1 Atividade de Lacase-Lac

O substrato seringaldazina (SYR) foi utilizado para determinação da enzima lacase, utilizando-se o método proposto por SCKLARZ *et. al.* (1989), que baseia-se na oxidação do substrato enzimático de seringaldazina para sua forma de quinona. A mistura reacional será composta de 50 µL da amostra filtrada; 0,95 ml tampão tartarato de sódio pH 4,5; 1ml seringaldazina (produção estoque de 5mg/ 1ml de etanol) e 1ml de água destilada, sendo monitorado o aumento da absorvância em 525 nm durante 60 segundos, utilizando-se o coeficiente de extinção  $\varepsilon = 6,5 \times 10^4 \text{ cm}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}$ .

Uma unidade de atividade enzimática corresponde à quantidade de produto (µmol) liberada em um minuto por mL de amostra ( $U = \mu\text{mol} \cdot \text{mim}^{-1}$ ).

#### 4.12.2 Atividade de Lignina Peroxidase -Li-P

A atividade de Li-P na solução enzimática bruta foi determinada a 30 °C numa mistura de reação composta de 0,8 ml de tampão tartarato dissódico a 0,05 M (pH 3,0), ou tampão fitalato ácido de potássico – HCl a 0,05 M (pH 3,0), 0,1 ml de solução álcool veratrílico a 40Mm e 0,1 ml de solução de enzima bruta. A reação foi iniciada com a adição de peróxido de hidrogênio (0,2 mM) e o aumento da absorvância, devido à oxidação do álcool veratrílico, medido à 310 nm. Uma unidade de atividade de enzima é definida como a quantidade de enzima necessária para formar 1 µmol de veratraldeído por minuto, utilizando o coeficiente de extinção molar de  $9,3 \times 10^3 / \text{mol} / \text{cm}$ . (TIEN & KIRK, 1988).

#### 4.12.3 Atividade de Manganês Peroxidase-Mn-P

A atividade de MnP na solução enzimática bruta foi determinada a 30 °C numa mistura reacional composta de 0,8 ml de tampão lactato de sódio a 0,05 M (pH 4,5), 0,1ml de  $\text{MnSO}_4$  a 0,4M e 0,1ml da solução de enzima bruta. A reação foi iniciada com a adição de peróxido de hidrogênio (40 µM) e a absorvância medida a 270 nm. Uma unidade de atividade de enzima será definida como a quantidade de enzima necessária para formar 1 µmol de  $\text{Mn}^{+3}$  por minuto, utilizando o coeficiente de extinção molar de  $8,1 \times 10^3 / \text{mol} / \text{cm}$  (GLENN *et. al.* , 1986; AITKEN & IRVINE, 1990).

#### **4.13 ANÁLISE ESTATÍSTICA**

Para análise estatística dos dados coletados foi usado o software Bioestat 5.0 para obter os parâmetros descritivos (média, desvio padrão, variância) e correlação entre as variáveis. Para a inferência sobre a relação entre as variáveis a serem mensuradas foi utilizado o teste ANOVA e para contraste das médias o Teste de Tukey.

## 5 RESULTADOS

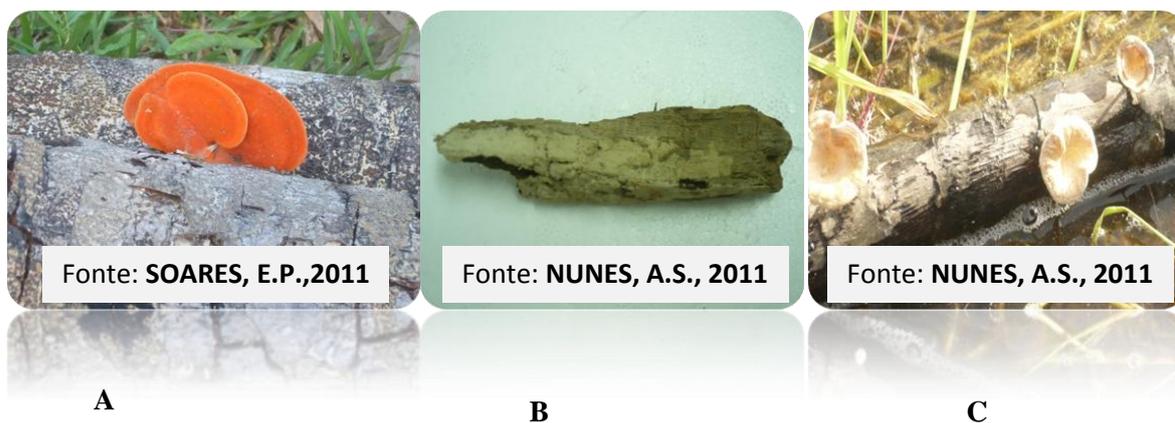
### 5.1 SELEÇÃO DE FUNGOS

Dos doze fungos testados, oito apresentaram-se positivos para enzimas oxidativas, através do aparecimento do halo marrom ao redor da colônia na presença do ácido tânico (DAVIDSON, *et.al.*, 1938) (Tabela 2). Os fungos *Pycnoporus sanguineus*, FBL e FV12 foram selecionados para os testes.

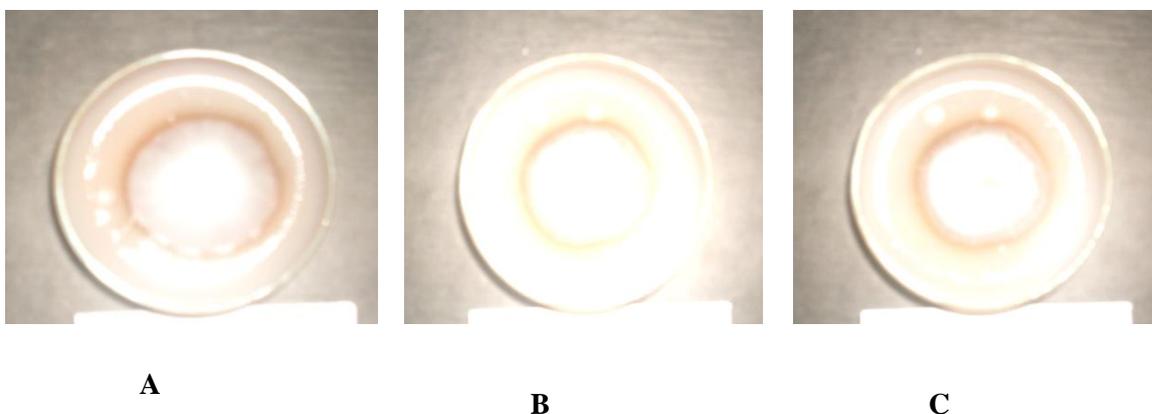
**Tabela 2:** Fungos produtores de fenoloxidasas em períodos de 24, 48 e 72 horas.

nº	Fungos	24h	48h	72h
1	<b>FBL</b>	+		
2	FI-02		+	
3	<b>FV-12</b>	+		
4	FI-11			+
5	<i>P.sanguineus</i>	+		
6	FV-06	-	-	-
7	FI-09	-	-	-
8	FI-03		+	
9	CV-50	-	-	-
10	CV-24	-	-	-
11	CV-25			+
12	CV-29			+

Os fungos *P.sanguineus*, FBL e FV-12 destacaram-se pelas características de crescimento rápido e detecção de fenoloxidasas em menor tempo de cultivo na presença do ácido tânico.



**Figura 4:** A. Fungo *P. sanguineus*, B. Fungo FBL e C. Fungo FV12.



**Figura 5:** A. Fungo *P. sanguineus*; B. Fungo FBL e C. Fungo FV12 em 24 de incubação em presença do ácido tânico com a formação de um halo marrom considerado como reação positiva para produção de fenoloxidasas.

## 5.2 DEGRADAÇÃO DE PET POR FUNGOS AMAZÔNICOS

As amostras de PET que não sofreram tratamento de temperatura e foram incubadas em diferentes meio de cultura, apresentaram diferenças na perda de massa (Tabela 3). A perda de massa no meio MFT mostrou-se maior quando comparado com o meio M1 para todos os fungos testados.

No meio MFT a maior perda de massa ocorreu para o fungo FBL. Ressalta-se, entretanto, que não há diferença estatística ao nível de 95% de significância de perda de massa do PET entre o fungo FBL e FV12. Por outro lado, a perda de massa do PET para *P. sanguineus* foi 79,7% menor em relação aos outros fungos testados (Tabela 3).

**TABELA 3:** Média de perda de massa das amostras de PET em diferentes meio de cultivo, PET sem pré-tratamento com temperatura, por um período de 90 dias.

MEIO DE CULTIVO	LINHAGENS FUNGICAS		
	<i>P. sanguineus</i>	FBL	FV12
M1	7.1 <sup>(a)</sup>	5.2 <sup>(a)</sup>	9.8 <sup>(a)</sup>
MFT	13.3 <sup>(a)</sup>	23.9 <sup>(b)</sup>	21.3 <sup>(b)</sup>

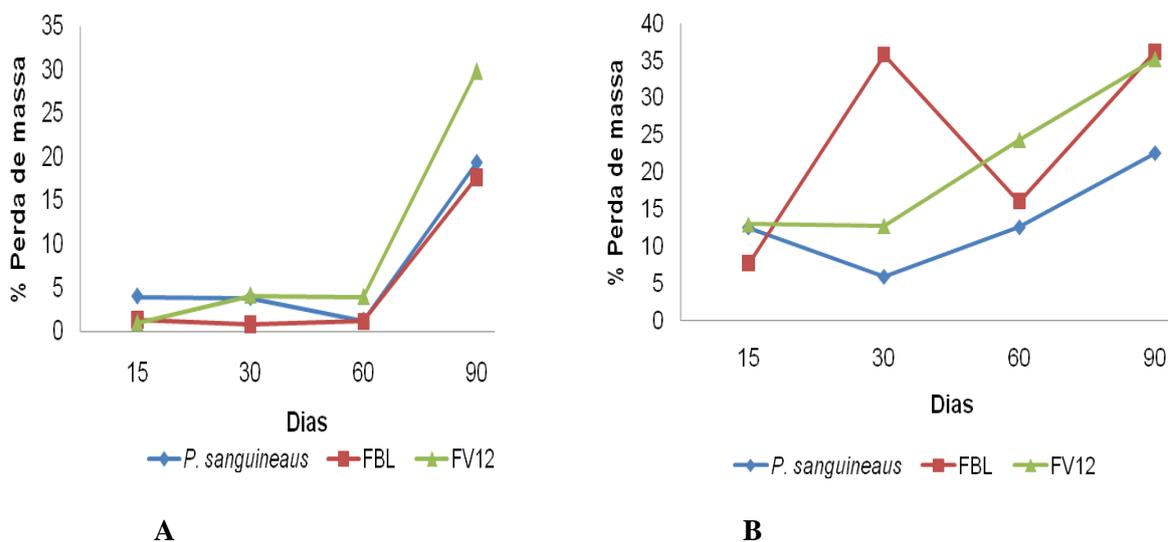
Letras iguais na horizontal não apresentam diferença estatística ao nível de 95% de probabilidade ( $p < 0,05$ ).

No meio M1, o fungo FV12 apresentou o maior valor absoluto de perda de massa do polímero. Porém, análise estatística evidenciou que não há diferença ao nível de 95% de significância entre os valores de perda de massa realizados pelos fungos incubados neste meio (Tabela 3).

Todas as amostras de PET sem tratamento físico de temperatura apresentaram decréscimo em sua massa após incubação com as linhagens fúngicas nos diferentes períodos testados em fermentação submersa estacionária.

De forma geral, as maiores perdas de massa ocorreram em 90 dias de incubação, com PET sem tratamento físico, em meio MFT, para a linhagem FBL (Figura 6B). A menor perda de massa alcançada neste meio de cultivo foi de 5,90% para o fungo *P. sanguineus* em 30 dias de incubação.

Todas as amostras de PET que foram submetidas ao pré-tratamento com temperatura 35°C e 50°C apresentaram perda de massa inicial do polímero após incubação com os fungos amazônicos em fermentação submersa.



**Figura 6:** Perda de massa do PET sem tratamento físico, com as linhagens fúngicas *P. sanguineus*, FBL, FV12, em fermentação submersa estacionária no período de 15, 30 60 e 90 dias de incubação. A. Meio sem suplementação (M1); B. Meio suplementado com farinha de tucumã (MFT).

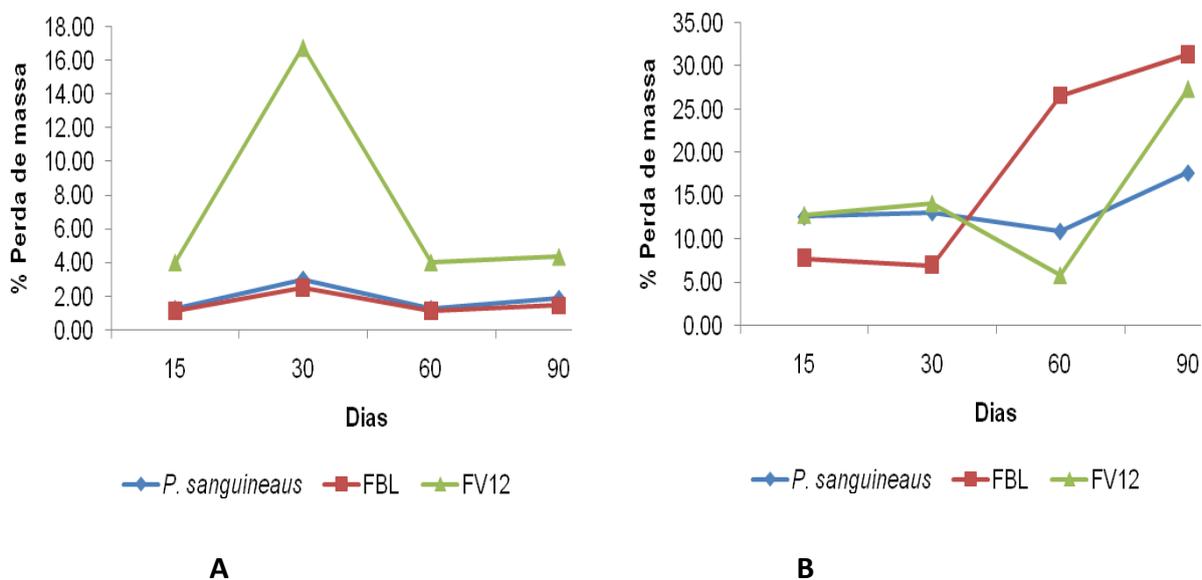
O percentual da perda de massa das amostras de PET para ambas as temperaturas testadas foi maior para o meio MFT para todas as linhagens (Tabela 3). O percentual de perda de massa do PET submetido ao pré-tratamento com temperatura de 50°C foi maior em relação àquelas que receberam pré-tratamento com temperatura 35°C nesse meio para todas as linhagens testadas. Para o fungo FV12, por exemplo, a perda de massa do PET foi 100% maior nos ensaios com pré-tratamento com temperatura 50°C, enquanto que, para o *P. sanguineus* e FBL essa diferença foi de 64% e 65,7%, respectivamente.

**TABELA 4:** Percentagens médias de perda de massa das amostras de PET em diferentes meio de cultivo, PET submetido ao pré-tratamento com temperatura 35°C e 50°C, por um período de 90 dias.

MEIO DE CULTIVO	TEMPERATURA 35°C			TEMPERATURA 50°C		
	<i>P. sanguineus</i>	FBL	FV12	<i>P. sanguineus</i>	FBL	FV12
M1	2.8 <sup>(a)</sup>	1.8 <sup>(a)</sup>	5.3 <sup>(a)</sup>	1.8 <sup>(a)</sup>	1.6 <sup>(a)</sup>	7.3 <sup>(b)</sup>
MFT	13.5 <sup>(a)</sup>	18.1 <sup>(a)</sup>	15 <sup>(a)</sup>	22.2 <sup>(a)</sup>	30 <sup>(a)</sup>	30 <sup>(a)</sup>

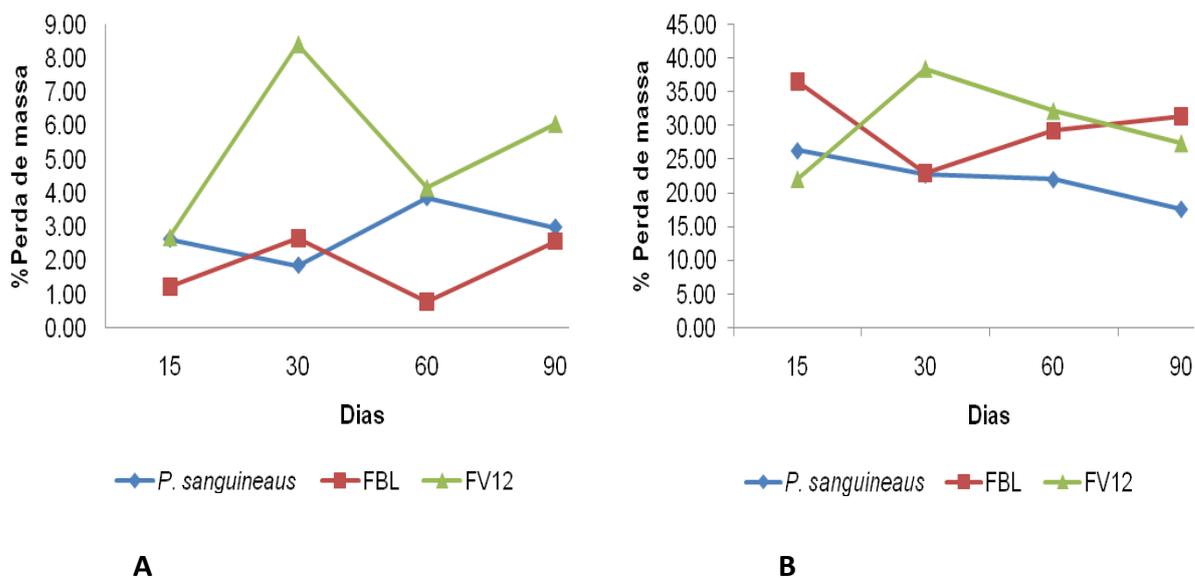
Letras iguais na horizontal não apresentam diferença estatística ao nível de 95% de probabilidade ( $p < 0,05$ ).

Com as amostras de PET submetidas ao pré-tratamento com temperatura 35°C, o maior percentual de perda de massa foi obtido pelo fungo FBL, alcançando a média de 31,3% de decréscimo na massa do PET durante 90 dias de incubação em meio MFT. Neste meio de cultivo a menor média do percentual de perda de massa foi para FV12 (5,80%) em 15 dias (Figura 7B).



**Figura 7:** Perda de massa do PET submetido à temperatura 35°C, com as linhagens fúngicas *P. sanguineus*, FBL, FV12, em fermentação submersa estacionária no período de 15, 30 60 e 90 dias de incubação. A. Meio sem suplementação (M1); B. Meio suplementado com farinha de tucumã (MFT).

De modo geral, o padrão da perda de massa, mostrou-se crescente até os trinta dias de incubação para todos os fungos no meio M1 (Figura 7A). No meio MFT, o fungo FBL mostrou um padrão crescente no percentual da perda de massa até o período total do experimento. Para este fungo a perda de massa entre os quinze primeiros dias até o final do experimento foi de 300%. Padrão decrescente no percentual da perda de massa do PET até os sessenta dias de incubação foi apresentado pelos fungos *P. sanguineus* e FV12. Ressalta-se que para todos os fungos o maior percentual de perda de massa ocorreu aos noventa dias de incubação no meio MFT (Figura 7B).



**Figura 8:** Perda de massa do PET submetido à temperatura 50°C, com as linhagens fúngicas *P. sanguineus*, FBL, FV12, em fermentação submersa estacionária no período de 15, 30 60 e 90 dias de incubação. A. Meio sem suplementação (M1); B. Meio suplementado com farinha de tucumã (MFT).

O padrão de perda de massa do PET pré-tratado à 50°C em diferentes períodos de incubação mostrou-se similar para os fungos FBL e FV12 no meio M1, onde a tendência de aumento de perda de massa do PET nos trinta primeiros dias de incubação, enquanto que para o *P. sanguineus* no mesmo período observa-se um padrão contrário no percentual de perda de massa (Figura 8A).

Por outro lado, no meio acrescido do meio MFT foi onde ocorreu o maior percentual de massa do PET para todos os fungos. *P. sanguineus* apresentou um padrão decrescente no percentual de perda de massa no período de 90 dias de incubação. Padrão contrário foi observado para FV12 onde ocorreu um percentual crescente de perda de massa do PET até 30 dias de incubação (Figura 8B).

Teste de ANOVA realizado para verificar diferenças estatísticas entre as perdas de massa das amostras de PET submetidas aos pré-tratamentos com diferentes temperaturas dentre os tratamentos evidenciaram que não há diferenças ao nível de 95% de probabilidade no pré- tratamento à 50°C entre os fungos incubados em meio MFT. Por outro lado, no meio M1 nesse mesmo pré-tratamento de temperatura ficou evidenciado a maior perda de massa, ao nível de 95% de probabilidade ( $p < 0,05$ ) ocorreu

para o fungo FV12, enquanto que para o *P. sanguineus* e FBL a perda de massa foi igual estatisticamente. Resultado similar foi observado no pré-tratamento com temperatura 35°C e meio M1. A diferença entre tratamentos nos diferentes meios de cultura com pré-tratamentos em diferentes temperaturas evidenciou diferença estatística ( $p < 0,05$ ) entre eles, confirmando que perda de massa de todos os fungos incubados no meio MFT é maior (Tabela 4).

### 5.3 DEGRADAÇÃO DO PET POR CONSÓRCIO DE FUNGOS

Através das análises realizadas para determinar a perda de massa do PET verificou-se que as amostras de PET apresentaram diminuição em sua massa após incubação com os consórcios de fungos nos períodos de 15, 30, 60 e 90 dias em fermentação submersa estacionária.

O maior valor médio da perda de massa nas amostras de PET foi obtido nos ensaios com consórcio C3, submetidas à temperatura 50°C e meio MFT, enquanto que o menor percentual de perda de massa ocorreu nas amostras submetidas ao tratamento com o consórcio C1 na mesma temperatura, porém, em meio M1. Ressalta-se por outro lado, que o percentual de perda de massa foi sempre maior nas amostras incubadas em meio MFT, para todas as amostras pré-tratadas com diferentes temperaturas e tipos de consórcios fúngicos testados (Tabela 5).

Em valores absolutos, os maiores percentuais médios de perda de massa ocorreram nas amostras pré-tratadas com temperatura 50°C e em meio MFT, para todos os consórcios fúngicos.

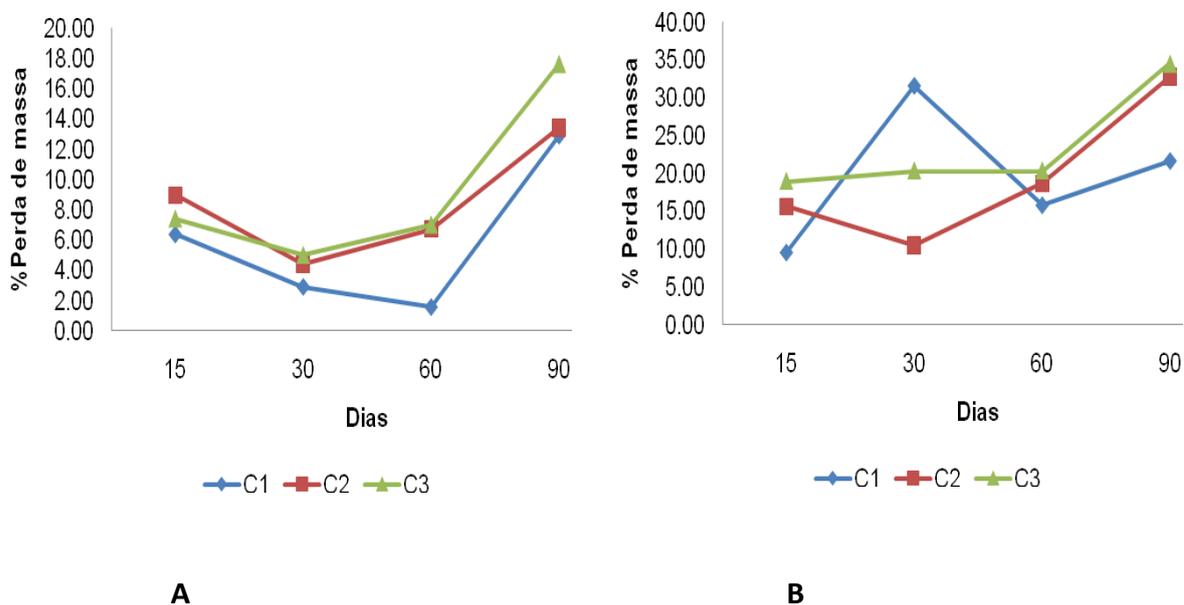
O padrão da perda de massa em diferentes períodos de crescimento mostrou-se similar para alguns dos tratamentos com consórcios. Para os consórcios C1, C2 e C3 e amostras de PET sem tratamento físico e em meio M1, o padrão de perda de massa apresenta-se crescente durante os períodos de tratamentos (Figura 9A). Exceção ocorreu para o consórcio C2 em 60 dias de crescimento que apresentou um decréscimo no percentual de perda de massa.

**TABELA 5.** Percentagens médias de perda de massa das amostras de PET em diferentes meio de cultivo e temperaturas, por um período de 90 dias.

MEIO DE CULTIVO	PET SEM TRATAMENTO FÍSICO			PET-TEMP. 35°C			PET-TEMP. 50°C		
	C1	C2	C3	C1	C2	C3	C1	C2	C3
M1	5.9 <sup>(a)</sup>	8.4 <sup>(a)</sup>	9.2 <sup>(a)</sup>	2.6 <sup>(a)</sup>	3.4 <sup>(a)</sup>	6.7 <sup>(a)</sup>	1.6 <sup>(a)</sup>	6.9 <sup>(a)</sup>	6.8 <sup>(a)</sup>
MFT	19.62 <sup>(a)</sup>	19.31.3 <sup>(a)</sup>	23.5 <sup>(a)</sup>	13.7 <sup>(a)</sup>	15.6 <sup>(a)</sup>	23.6 <sup>(b)</sup>	36.4 <sup>(b)</sup>	17.2 <sup>(a)</sup>	27.3 <sup>(a)</sup>

Letras iguais na horizontal não apresentam diferença estatística ao nível de 95% de probabilidade ( $p < 0,05$ ).

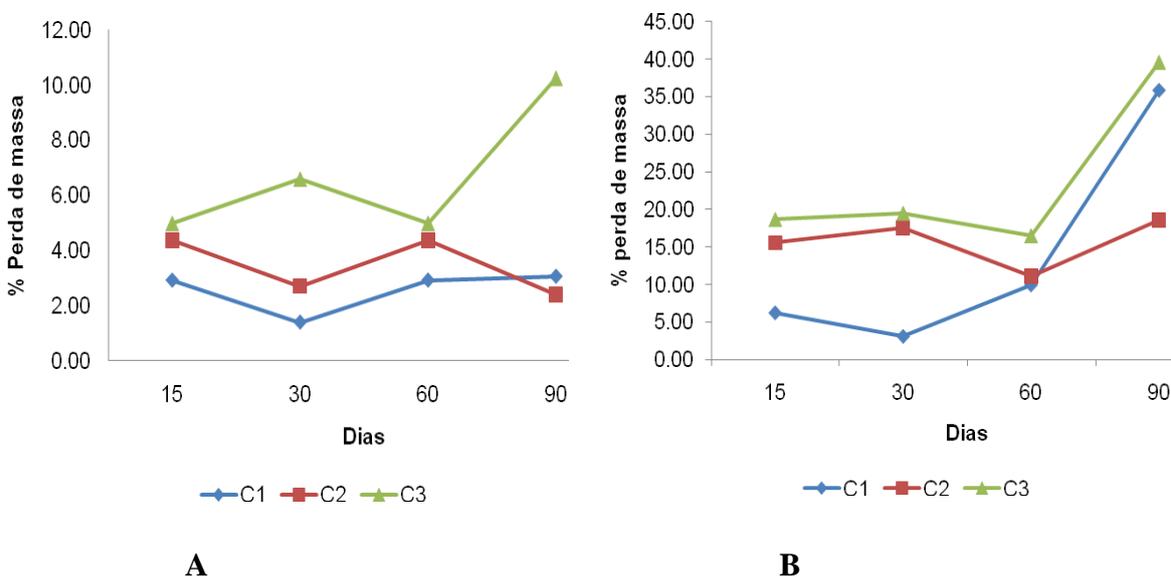
Para os consórcios fúngicos no meio MFT e amostras de PET sem tratamento físico, o padrão de perda de massa apresentou-se também crescente durante o período de teste. O consórcio C1 apresentou maior perda de massa em 30 dias de incubação, enquanto que para os demais consórcios a maior perda ocorreu no fim do experimento, aos 90 dias de incubação (Figura 9B).



**Figura 9:** Perda de massa do PET sem tratamento físico, com os consórcios fúngicos C1, C2 e C3, em fermentação submersa estacionária no período de 15, 30, 60 e 90 dias de incubação. A. Meio sem suplementação -M1; B. Meio suplementado com farinha de tucumã - MFT.

Para as amostras de PET pré-tratadas com temperatura 35°C e incubadas no meio M1, o padrão da perda de massa para os consórcios C1 e C2 apresentou comportamento similar com maior perda em 60 dias de incubação (Figura 10A). Exceção para o consórcio C3 que, mostrou maior percentual de perda de massa após 90 dias de incubação.

Amostras de PET com mesmo pré-tratamento de temperatura, mas em meio MFT, verifica-se que todos os consórcios testados mostraram maior percentual de perda de massa após 90 dias de incubação (Figura 10B). Neste caso, foi onde se observou o maior valor de perda de massa (~37%) entre os consórcios testados.

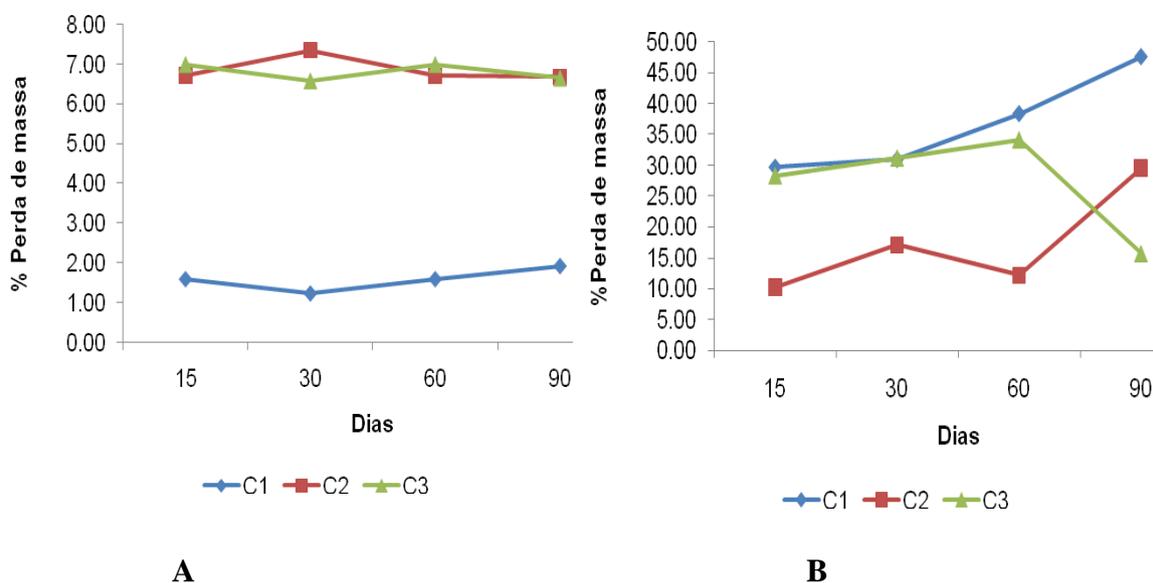


**Figura 10:** Perda de massa do PET submetido ao pré-tratamento com temperatura 35°C, com os consórcios fúngicos C1, C2 e C3, em fermentação submersa estacionária no período de 15, 30, 60 e 90 dias de incubação. A. Meio sem suplementação-M1; B. Meio suplementado com farinha de tucumã - MFT.

O percentual de perda de massa para as amostras de PET pré-tratadas com temperatura 50°C e meio M1 mostrou padrão crescente ao longo do período de 90 dias de incubação (Figura 11A).

Comportamento contrário apresentou o padrão da perda de massa das amostras de PET para o meio MFT dos consórcios C2 e C3. O consórcio C2 apresentou padrão de perda de massa crescente em 60 dias, enquanto que C3 nas mesmas condições mostrou decrescente no mesmo período. Exceção ocorreu para o consórcio C1, que apresentou comportamento crescente a partir dos primeiros 15 dias de incubação, onde

observou-se o maior valor da porcentagem da perda de massa das amostras no período final do experimento (Figura 11B).



**Figura 11:** Perda de massa do PET submetido ao pré-tratamento com temperatura 50°C, com os consórcios fúngicos C1, C2 e C3, em fermentação submersa estacionária no período de 15, 30, 60 e 90 dias de incubação. A. Meio sem suplementação -M1; B. Meio suplementado com farinha de tucumã -MFT.

Teste de ANOVA realizado para verificar diferenças estatísticas entre as perdas de massa das amostras de PET que não foram submetidas ao tratamento com temperatura demonstraram que não existe diferença estatística ao nível de 95% de probabilidade dentre os tratamentos (Tabela 5).

As amostras de PET submetidas aos pré-tratamentos com diferentes temperaturas dentre os tratamentos evidenciaram que não há diferenças ao nível de 95% de probabilidade no pré- tratamento à 35°C entre os fungos incubados em meio M1. Por outro lado, no meio MFT nesse mesmo pré-tratamento de temperatura ficou evidenciado a maior perda de massa, ao nível de 95% de probabilidade ( $p < 0,05$ ) ocorreu para o consórcio fúngico C3, enquanto que para o consórcio C1 e C2 a perda de massa foi igual estatisticamente (Tabela 5).

Amostras de PET submetidas ao pré-tratamento com temperatura 50°C em meio M1 não apresentaram diferença estatística ao nível de 95% de probabilidade dentre os tratamentos. Porém, no meio MFT nesse mesmo pré-tratamento de temperatura ficou evidenciado que a perda de massa dos consórcios C2 e C3 foram iguais estatisticamente. Exceção para o consórcio C1, que apresentou diferença estatística ao nível de 95% de probabilidade ( $p < 0,01$ ) (Tabela 5).

A diferença entre tratamentos nos diferentes meios de cultura com amostras de PET sem tratamento físico e submetidas aos pré-tratamentos em diferentes temperaturas evidenciou diferença estatística ( $p < 0,05$ ) entre eles, confirmando que perda de massa de todos os fungos incubados no meio MFT é maior (Tabela 5).

#### **5.4 MICROSCOPIA ELETRONICA DE VARREDURA**

Observações no MEV mostram alterações na superfície das amostras analisadas. As amostras de PET submetidas à incubação durante 90 dias com as linhagens fúngicas em meio M1 e MFT apresentaram morfologias distintas (Figuras 12, 13 e 14).

Verifica-se na Figura 14F e 14I, modificações na superfície do PET após retirada da massa celular do fungos FBL e FV12 respectivamente, em 30 dias de incubação, sob temperatura 50°C, em meio tucumã. Na Figura 15B ampliada observa-se que o PET sofreu severo desgaste da superfície polimérica, com descamações, rupturas e aspecto quebradiço em toda superfície, assim como clareamento da amostra.

Nas Figuras 12F e 12I observa-se modificações na superfície do PET em relação ao controle, no meio tucumã incubados durante 90 dias. Após a retirada da massa celular do fungo FBL o PET apresentou aspecto da superfície polimérica com rupturas e descamações.

As amostras de PET submetidas ao tratamento com temperatura 35°C, incubados com o fungo FBL em meio tucumã, durante 90 dias revela rupturas na superfície do PET (Figura 13F). Contudo, quando se observa a Figura 12I, verifica-se que a superfície do PET apresenta rupturas, descamação e fendas.

Para efeito comparativo das características da ação dos consórcios fúngicos nas amostras, utilizou-se àquelas oriundas do último período do experimento, ou seja, após 90 dias de incubação, para ilustrar a superfície das amostras de PET vista ao MEV.

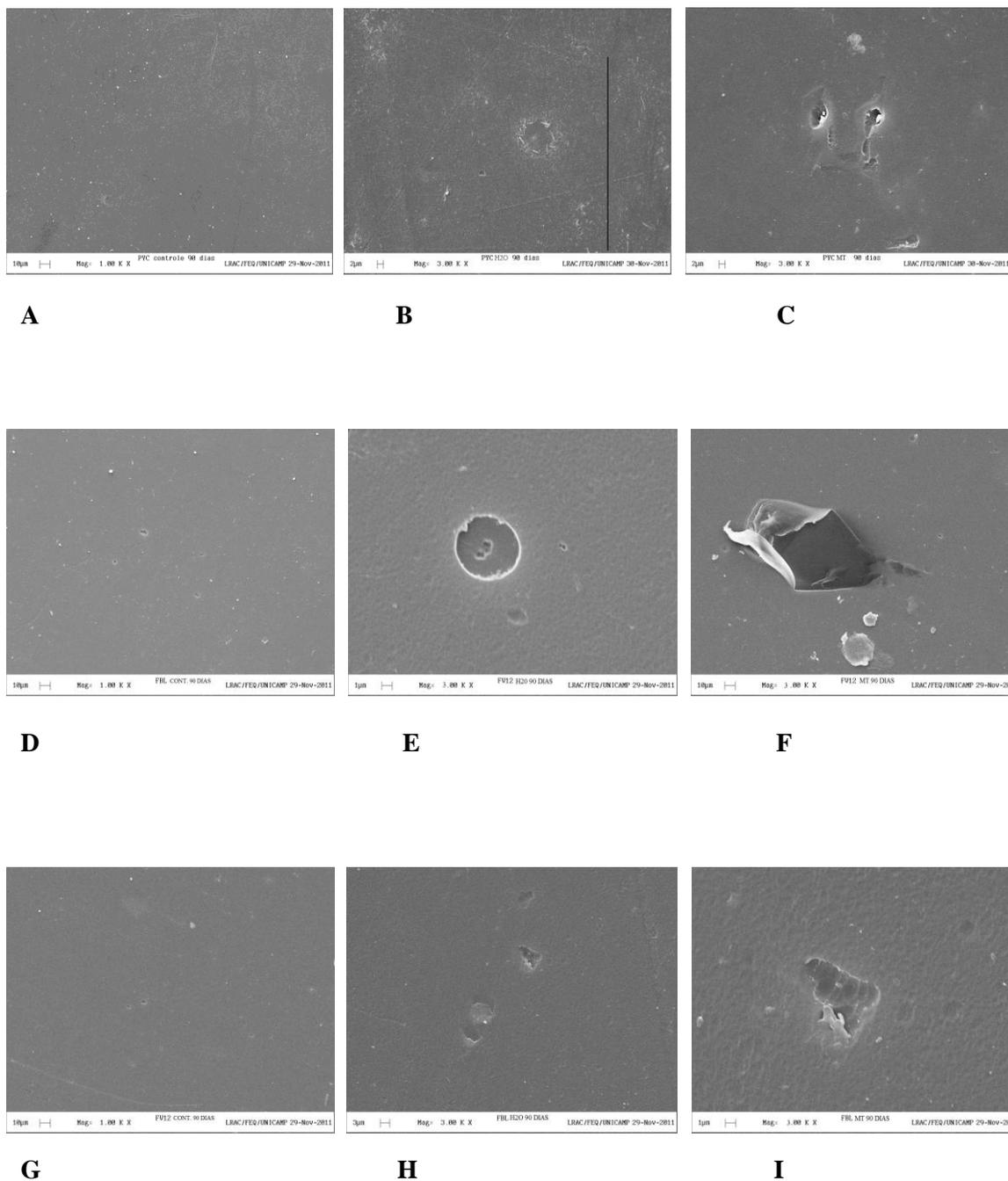
Comparando-se as fotomicrografias das amostras do controle com aquelas que sofreram a ação dos fungos, verifica-se que estas apresentam rupturas, escavações, descamações e aspecto quebradiço (Figura 16, 17 e 18).

As amostras oriundas do meio MFT e com pré-tratamento com temperatura 50°C para o consórcio C1 foram as que apresentaram as maiores modificações na superfície, concordando com os valores obtidos para a perda de massa, onde neste tratamento foi maior (Figura 18C). Após a retirada da massa celular observa-se rupturas de uma primeira camada do polímero e o aparecimento de um “buraco” possivelmente proporcionado por ataque enzimático ou mecânico na superfície do polímero sob o tratamento com temperatura de 35°C (Figura 17C), características peculiares das Figuras 18C e 18I.

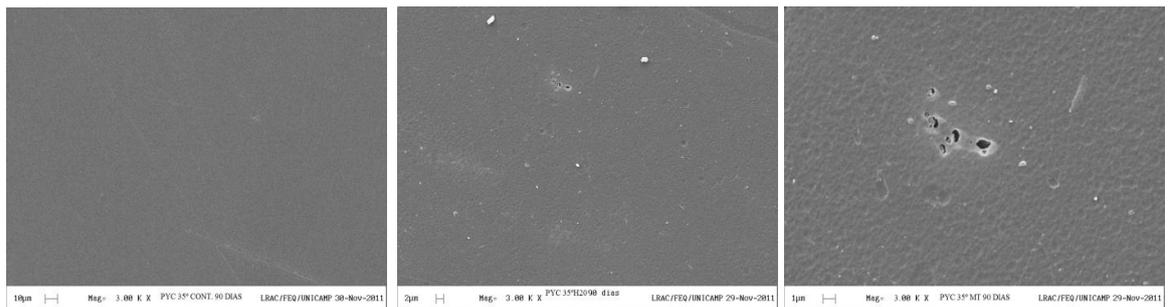
De modo geral, essa parece ser a característica comum a toda superfície independente do tratamento utilizado. O ataque inicia-se pela formação de um orifício deixando exposta uma segunda camada do polímero, que posteriormente sofre a ação similar com formação de um novo orifício nessa camada exposta.

Independente dos pré-tratamentos com diferentes temperaturas esse padrão de ataque diferencia-se apenas na intensidade, reflexo do meio de cultura que é utilizado.

Nas amostras desse mesmo C1, oriundas do meio sem acréscimo de FT e nas mesmas condições de incubação e pré-tratamentos com diferentes temperaturas, observa-se a formação inicial de orifício com mais claras (Figura 18B).



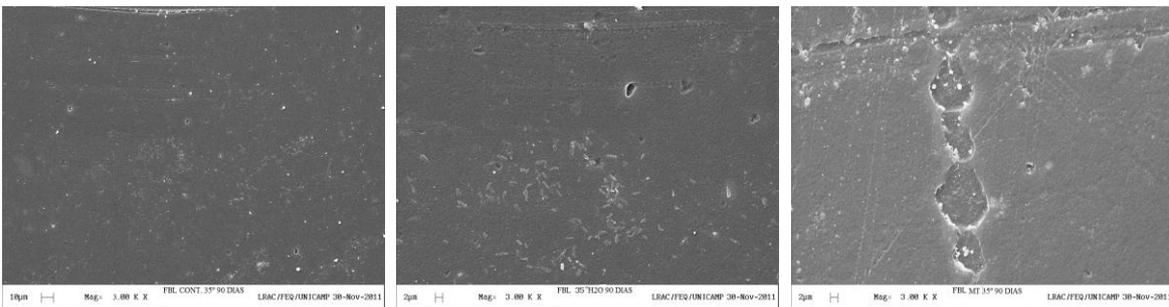
**Figura 12:** Fotomicrografias de amostras do PET sem tratamento físico e linhagens fúngicas *P. sanguineus*, FBL e FV12 por MEV em 90 dias de incubação. A. controle abiótico; B. PYC em meio M1; C. PYC em meio MFT; D. controle abiótico; E. FBL em meio M1; F. FBL em meio MFT; G. controle abiótico; H. FV12 em meio M1; I. FV12 em meio MFT – 3000X.



A

B

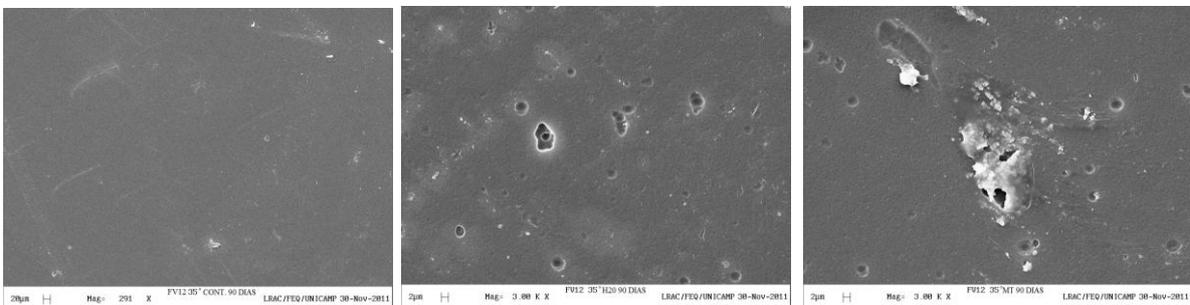
C



D

E

F

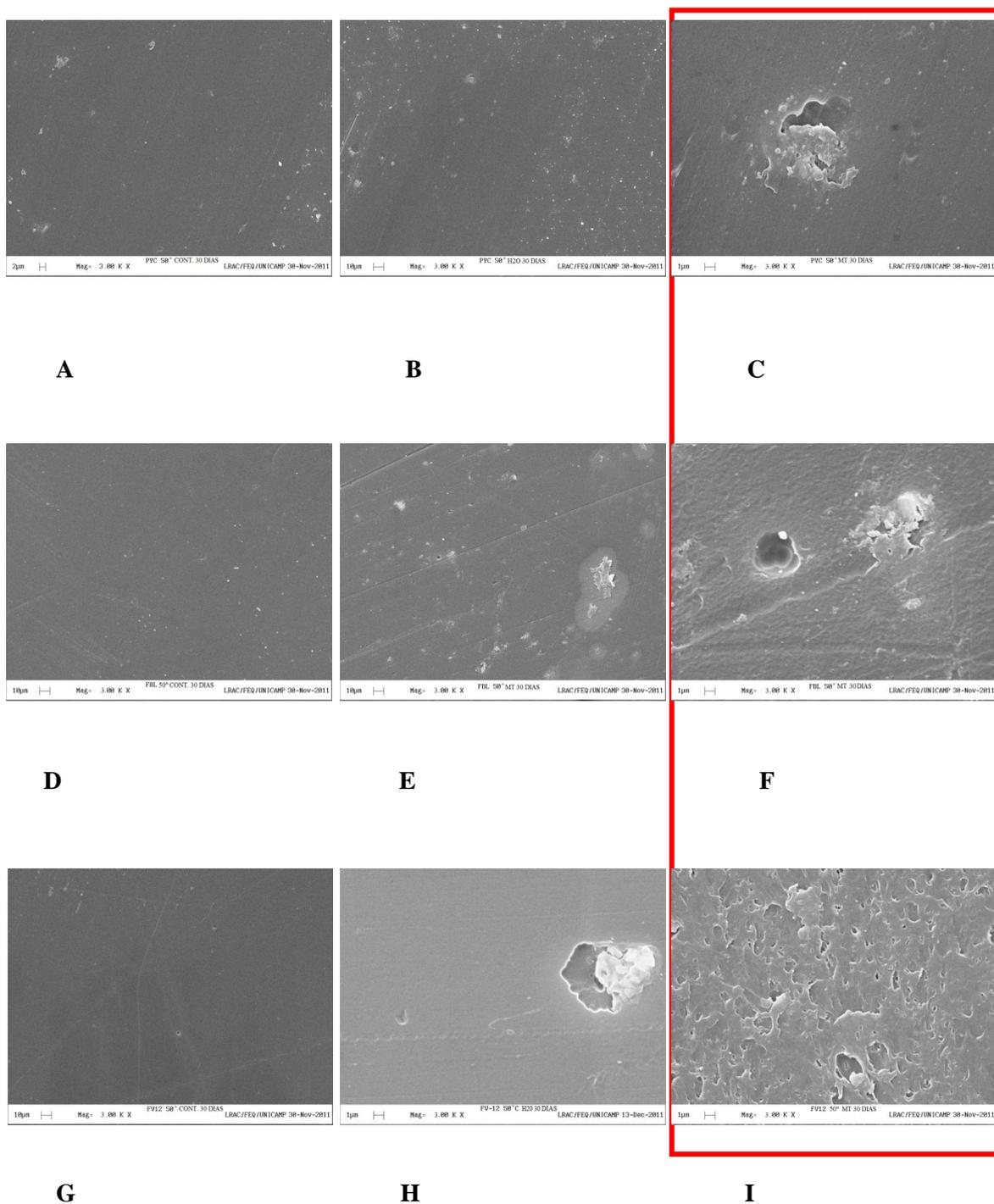


G

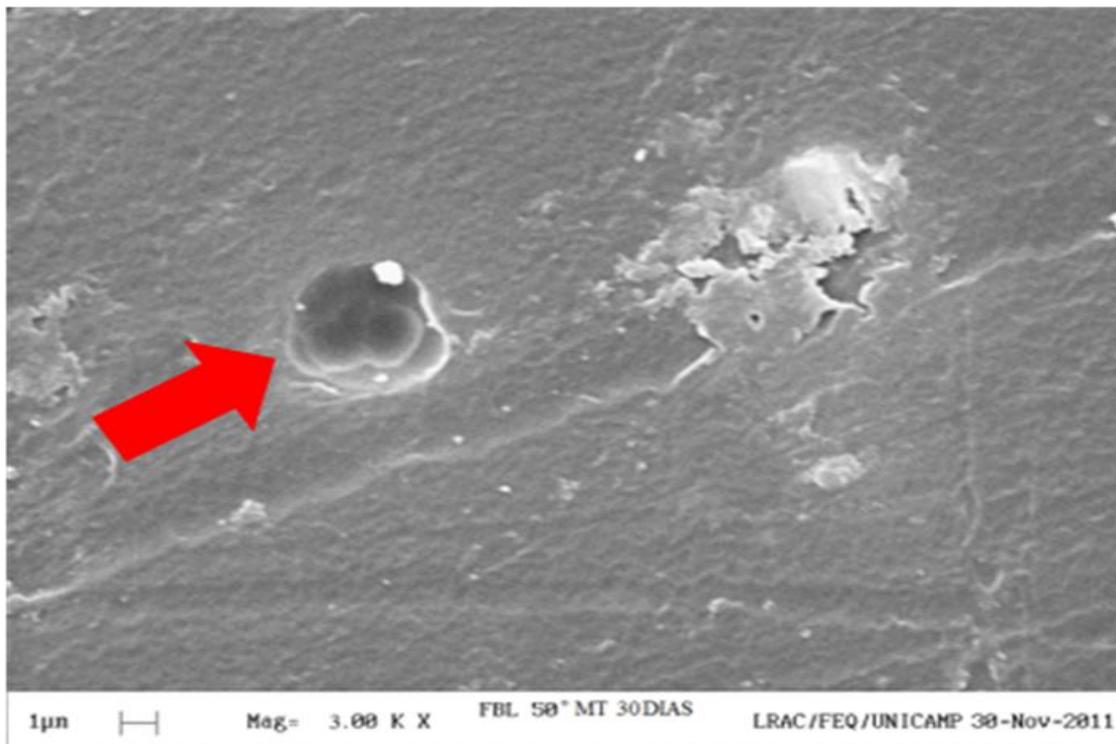
H

I

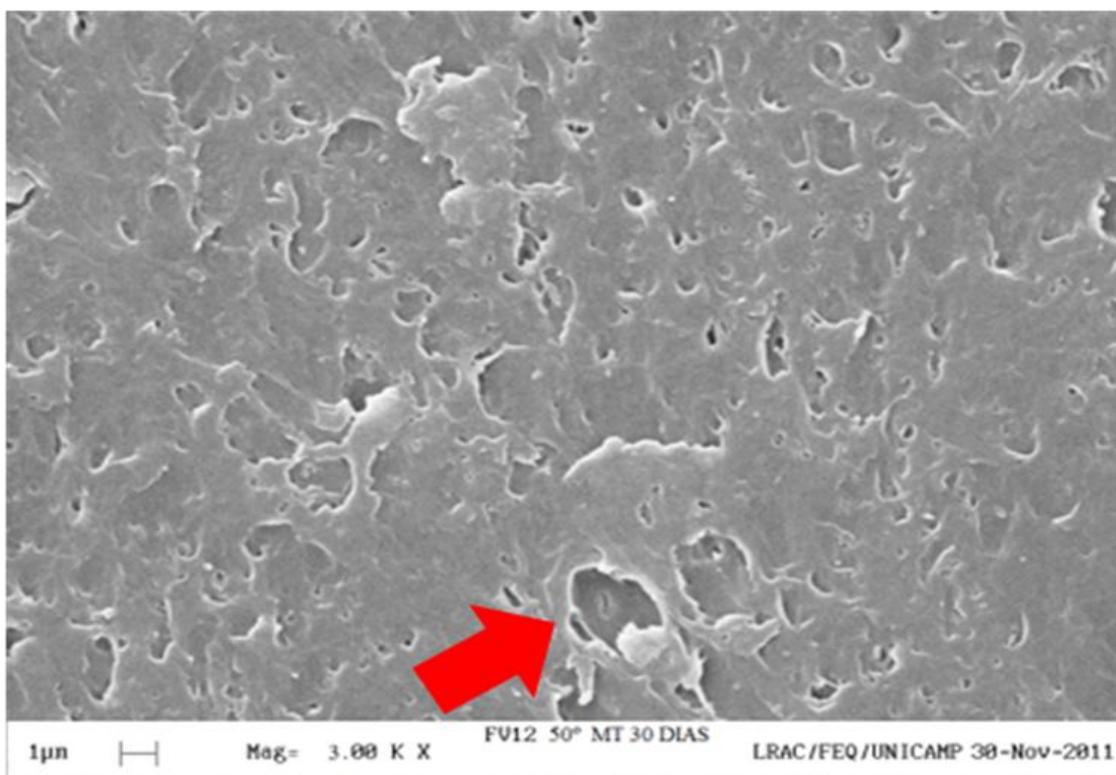
**Figura 13:** Fotomicrografias de amostras do PET submetidas ao pré-tratamento com temperatura 35° C e linhagens fúngicas *P. sanguineus*, FBL e FV12 por MEV em 90 dias de incubação. A. controle abiótico; B. PYC em meio M1; C. PYC em meio MFT; D. controle abiótico; E. FBL em meio M1; F. FBL em meio MFT; G. controle abiótico; H. FV12 em meio M1; I. FV12 em meio MFT – 3000X.



**Figura 14:** Fotomicrografias de amostras do PET submetidas ao pré-tratamento com temperatura 50° C e linhagens fúngicas *P. sanguineus*, FBL e FV12 por MEV em 30 dias de incubação. A. controle abiótico; B. PYC em meio M1; C. PYC em meio MFT; D. controle abiótico; E. FBL em meio M1; F. FBL em meio MFT; G. controle abiótico; H. FV12 em meio M1; I. FV12 em meio MFT – 3000X.

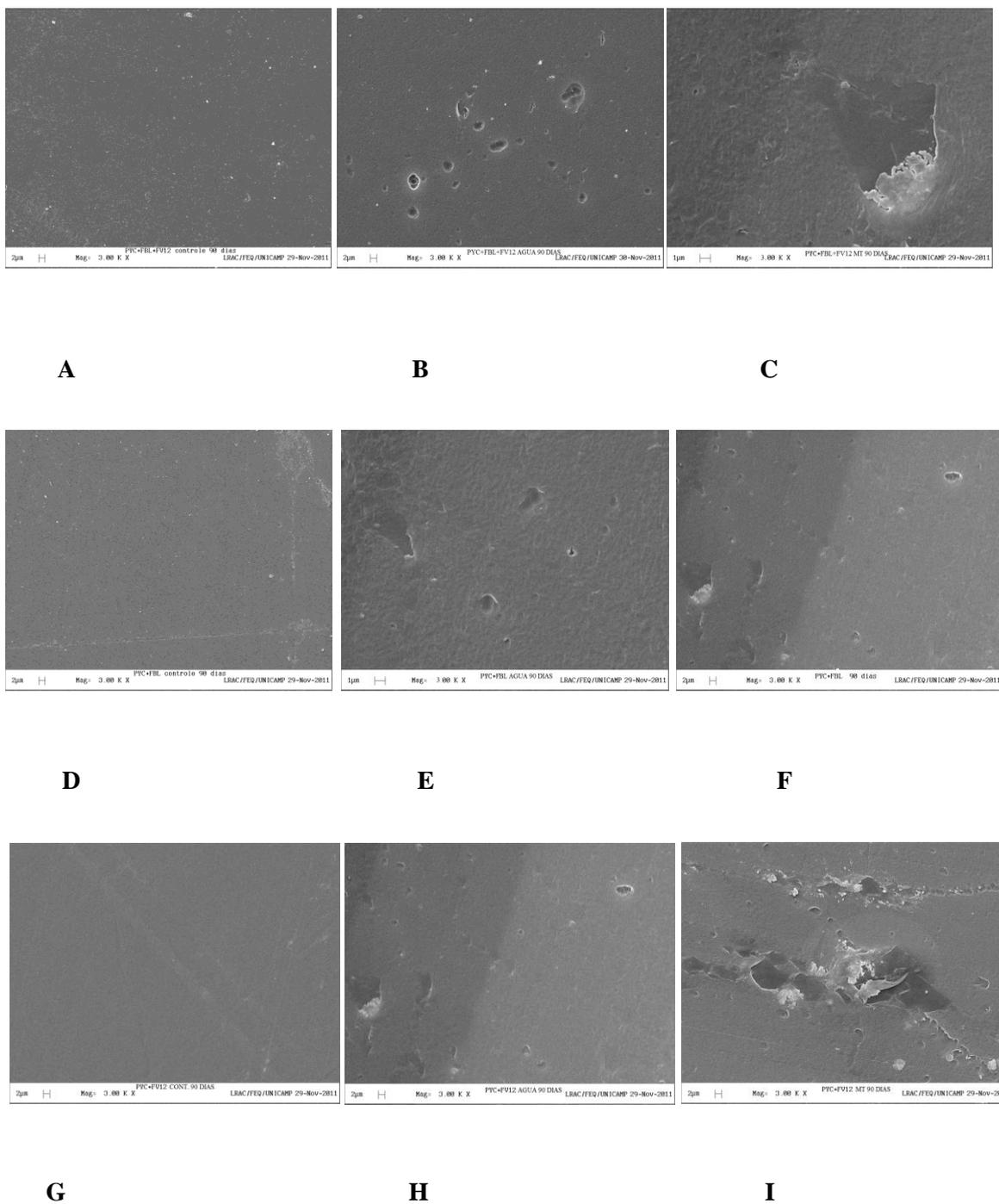


A

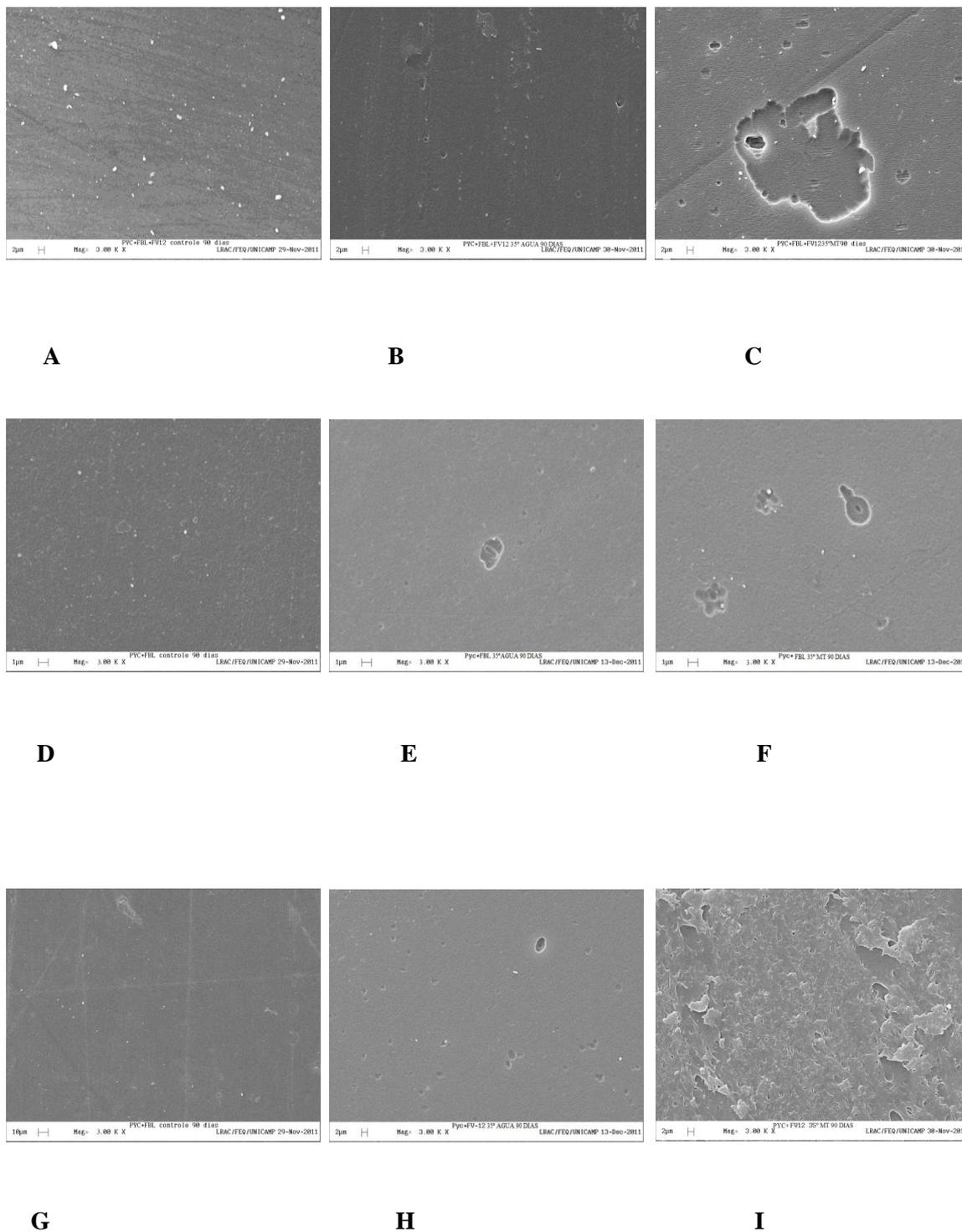


B

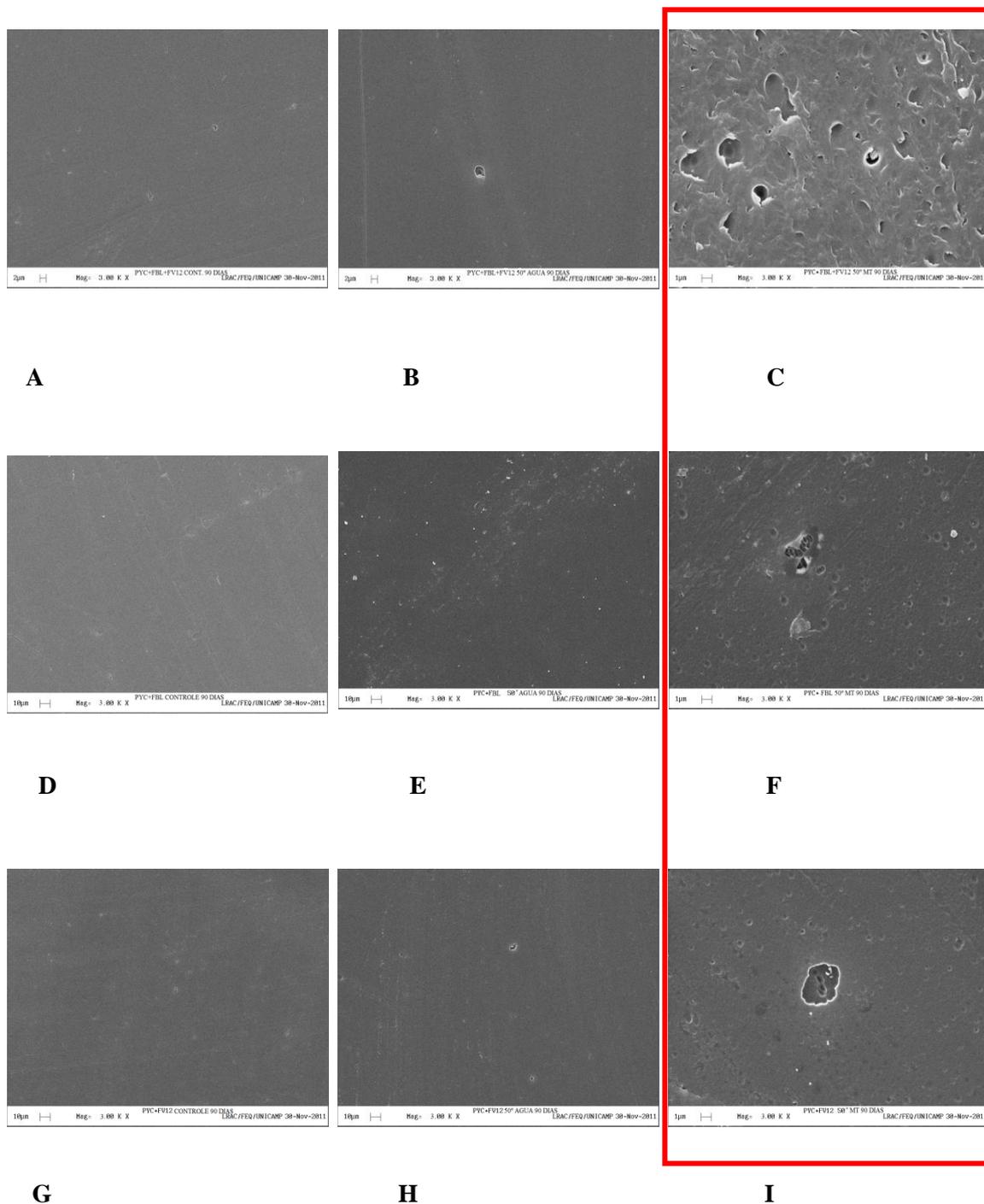
**Figura 15:** Fotomicrografias ampliada de amostras do PET submetidas ao pré-tratamento com temperatura 50° C e linhagens fúngicas A. FBL e B. FV12 por MEV em 30 dias de incubação em MFT. Modificações na superfície do PET após retirada da massa celular dos fungos. 3000X.



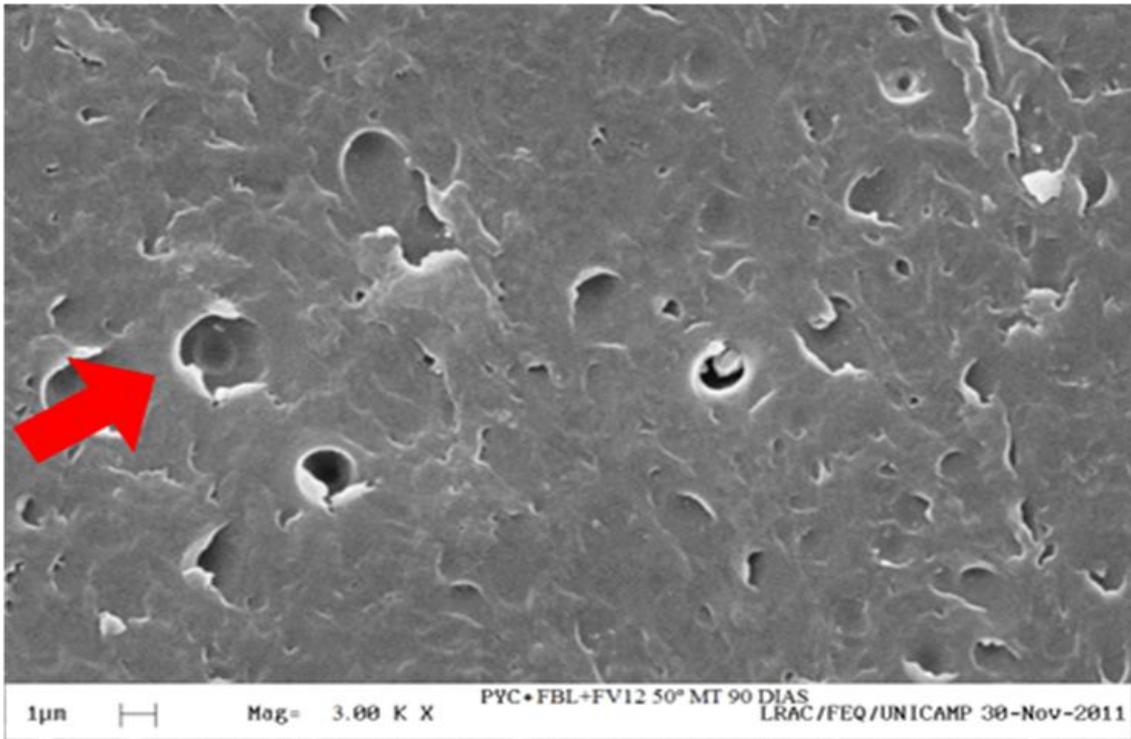
**Figura 16:** Fotomicrografias de amostras de PET sem tratamento físico e consórcio de fungos, MEV em 90 dias de incubação. A. controle abiótico; B. Consórcio C1 em meio M1; C. Consórcio C1 em meio MFT; D. controle abiótico; E. Consórcio C2 em meio M1; F. Consórcio C2 em meio MFT; G. controle abiótico; H. Consórcio C3 em meio M1; I. Consórcio C3 em meio MFT – 3000X.



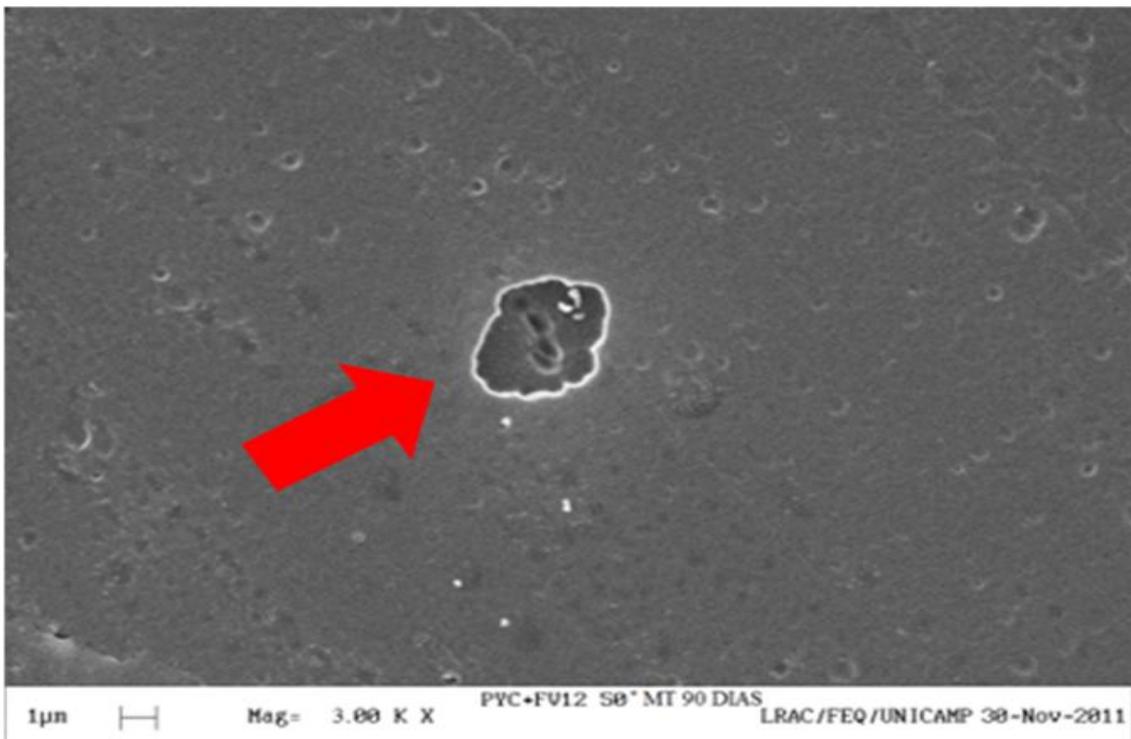
**Figura 17:** Fotomicrografias de amostras de PET submetidas ao pré-tratamento com temperatura 35°C e consórcio de fungos, MEV em 90 dias de incubação. A. controle abiótico; B. Consórcio C1 em meio M1; C. Consórcio C1 em meio MFT; D. controle abiótico; E. Consórcio C2 em meio M1; F. Consórcio C2 em meio MFT; G. controle abiótico; H. Consórcio C3 em meio M1; I. Consórcio C3 em meio MFT – 3000X.



**Figura 18:** Fotomicrografias de amostras de PET submetidas ao pré-tratamento com temperatura 50°C e consórcio de fungos, MEV em 90 dias de incubação. A. controle abiótico; B. Consórcio C1 em meio M1; C. Consórcio C1 em meio MFT; D. controle abiótico; E. Consórcio C2 em meio M1; F. Consórcio C2 em meio MFT; G. controle abiótico; H. Consórcio C3 em meio M1; I. Consórcio C3 em meio MFT – 3000X.



A



B

**Figura 19:** Fotomicrografias ampliada de amostras do PET submetidas ao pré-tratamento com temperatura 50° C e consórcios de fungos A. C1 e B. C3 por MEV em 90 dias de incubação em MFT. Modificações na superfície do PET após retirada da massa celular dos fungos. 3000X.

## 5.5 ATIVIDADE ENZIMÁTICA

### 5.5.1 Atividade de Lacase-Lac

A Tabela 6 mostra a atividade enzimática média dos fungos com amostras de PET sem tratamento físico com temperatura em diferentes meios de cultivo.

A atividade de lacase (Lac) no meio MFT para todos os fungos testados foi ~2,2 vezes maior do que no meio M1. No meio MFT os valores médios da atividade de Lac foram similares entre as linhagens fúngicas, enquanto que, no meio M1 os valores médios de atividade enzimática mostram-se diferenciado entre os fungos.

**Tabela 6.** Valor médio da atividade enzimática de lacase, em diferentes meio de cultura e amostras de PET com e sem tratamento físico de temperatura, em 90 dias de incubação.

MEIO DE CULTIVO	PET SEM TRATAMENTO FÍSICO			PET - TEMP. 35°C			PET-TEMP. 50°C		
	PYC*	FBL	FV12	PYC*	FBL	FV12	PYC*	FBL	FV12
M1	6.78 <sup>(a)</sup>	5.97 <sup>(a)</sup>	9.27 <sup>(b)</sup>	7.81 <sup>(a)</sup>	7.92 <sup>(a)</sup>	8.05 <sup>(a)</sup>	5.30 <sup>(a)</sup>	6.01 <sup>(a)</sup>	7.66 <sup>(a)</sup>
MFT	15.83 <sup>(a)</sup>	15.00 <sup>(a)</sup>	16.09 <sup>(a)</sup>	10.72 <sup>(a)</sup>	9,96 <sup>(a)</sup>	9.48 <sup>(a)</sup>	14.43 <sup>(a,b)(1)</sup>	14.79 <sup>(a,b)(1)</sup>	15.05 <sup>(a,b)(1)</sup>

Letras iguais na horizontal não apresentam diferença estatística ao nível de 95% de probabilidade ( $p < 0,05$ ).

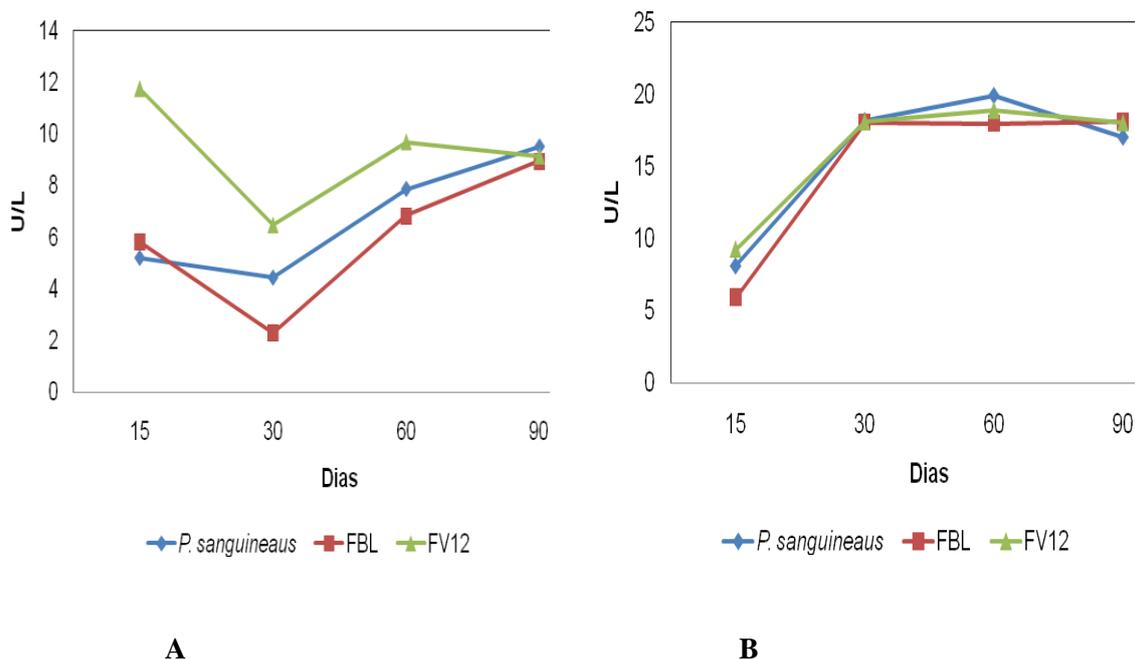
<sup>(1)</sup> Diferença estatística ao nível de 99% de significância.

\*PYC-*P. sanguineus*

Nesse contexto, o fungo FV12 foi o que apresentou maior atividade enzimática e diferença estatística ao nível de 95% de significância ( $p < 0,05$ ) no meio M1 (Tabela 5). Observa-se diferença também na atividade enzimática de FBL entre os meios de incubação.

O padrão da atividade enzimática no meio M1 mostrou-se crescente com atividade máxima para *P. sanguineus* e FBL em 90 dias de incubação (Figura 20A). No meio MFT a atividade enzimática máxima para *P. sanguineus* e FV12 ocorreu nos 60

dias de incubação, enquanto que, para FBL a máxima atividade de Lac ocorreu nos 90 dias (Figura 20B).

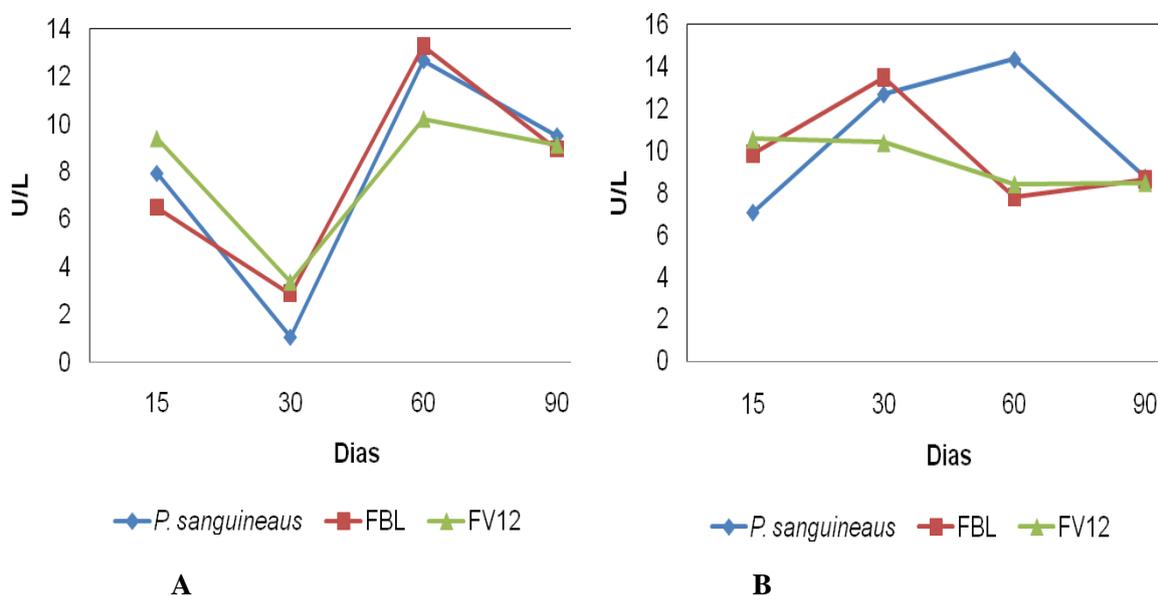


**Figura 20:** Atividade enzimática de Lac, PET sem tratamento físico com as linhagens fúngicas *P. sanguineus*, FBL e FV12, em fermentação submersa estacionária, durante 15, 30, 60 e 90 dias de incubação. A. Meio sem suplementação-M1; B. Meio suplementado com farinha de tucumã - MFT.

De modo geral, o meio acrescido de FT e com PET sem tratamento com temperatura foi onde ocorreu a maior atividade média de Lac para todos os fungos testados. Para os meios onde as amostras de PET sofreram pré-tratamento com temperatura 35°C o valor médio da atividade de Lac para todos os fungos, ficou próximo para ambos os meios (Tabela 6).

Assim como ocorreu na atividade de Lac onde o PET não sofreu nenhum pré-tratamento de temperatura, a atividade enzimática foi maior no meio MFT onde estava presente amostras de PET submetidas ao pré-tratamento com temperatura 35°C durante 60 dias. Neste contexto, *P. sanguineus*, apresentou uma atividade de Lac 37% maior que no meio M1, enquanto que, para FBL e FV12 esta atividade enzimática foi 25,8% e 22,2% maior, respectivamente no meio FMT (Tabela 6). Ressalta-se, entretanto, que nessa mesma condição, ao nível de 95% de significância ( $p < 0.05$ ) não diferença estatística entre e dentre os fungos testados.

O padrão da atividade enzimática de Lac ao longo do período de teste para o meio M1, onde as amostras de PET sofreram pré-tratamento a 35°C foram similares para todos os fungos, com maior atividade enzimática aos 60 dias de incubação (Figura 21A).



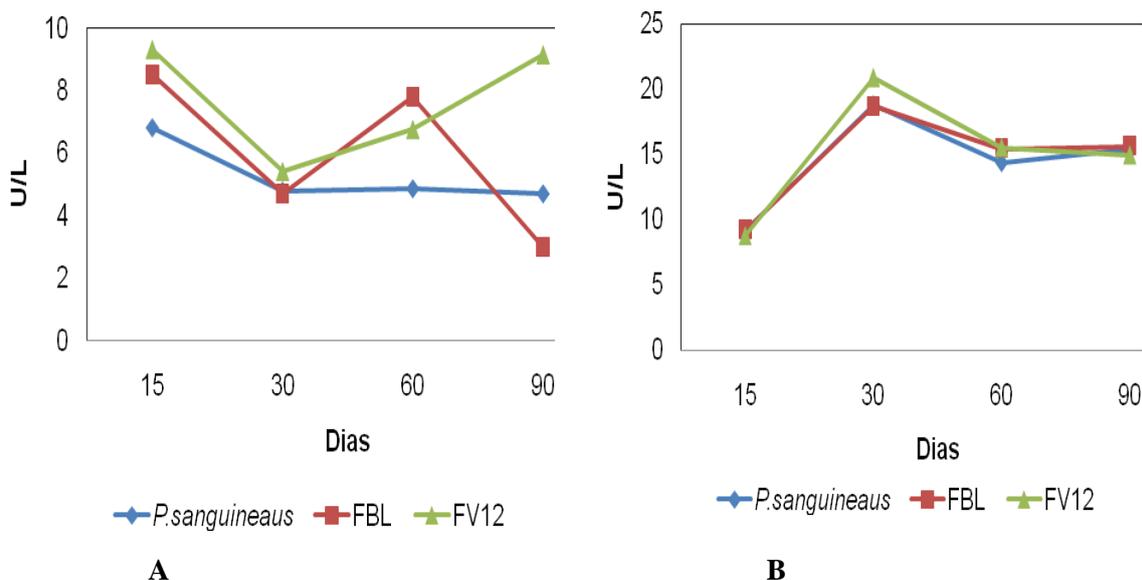
**Figura 21:** Atividade enzimática de Lac, PET submetido ao pré-tratamento com temperatura 35°C, com as linhagens fúngicas *P. sanguineus*, FBL e FV12, em fermentação submersa estacionária, durante 15, 30, 60 e 90 de incubação. A. Meio sem suplementação-M1; B. Meio suplementado com farinha de tucumã - MFT.

No meio MFT, com amostras de PET pré-tratados a 35°C, o padrão da atividade de Lac mostrou pico máximo aos 30 dias de incubação para os fungos FBL e FV12, decrescendo até o final do experimento. *P. sanguineus*, mostrou um padrão crescente de atividade até atingir o pico máximo aos 60 dias de incubação (Figura 21B).

Para os ensaios com PET submetido ao pré-tratamento com temperatura 50°C, de modo geral, os fungos apresentaram maior atividade de Lac no meio acrescido com FT (Tabela 6). Embora no meio MFT a atividade enzimática se apresentar similar para todos os fungos, no meio M1 foi cerca de 172% menor. Dentre os tratamentos, não ocorre diferença estatística ao nível de 95% de significância ( $p < 0.005$ ) na atividade de Lac para o fungo FBL e, entre os tratamentos existe diferença na atividade enzimática dos fungos ao nível de 99% de significância ( $p < 0.01$ ).

O padrão da atividade enzimática de Lac mostrou-se crescente, com pico máximo aos 30 dias de incubação no meio MFT (Figura 21B). Ao final do experimento

a atividade dessa enzima foi cerca de 6.8% maior em relação ao período de 15 dias, marco inicial de mensuração.



**Figura 22:** Atividade enzimática de Lac, PET submetido ao pré-tratamento com, temperatura 50°C, com as linhagens fúngicas *P. sanguineus*, FBL e FV12, em fermentação submersa estacionária, durante 15, 30, 60 e 90 de incubação. A. Meio sem suplementação - M1; B. Meio suplementado com farinha de tucumã - MFT

Comportamento contrário foi observado para FBL e *P. sanguineus* no meio M1 onde o padrão se mostrou decrescente até o final do experimento (Figura 22A). Nesta mesma condição o fungo FV12 apresentou um padrão de decréscimo inicial na atividade enzimática até o trigésimo dia de crescimento, e a partir desse período apresentou um padrão crescente de atividade de Lac até o final do experimento.

### 5.5.2 Atividade de Lignina Peroxidase-LiP

A atividade de lignina peroxidase (LiP) no meio M1, na presença das amostras de PET sem tratamento físico foi menor para todos fungos (Tabela 6). O maior valor médio da atividade de LiP nessas condições foi obtido para *P. sanguineus*. Ressalta-se, entretanto, que ao nível de 95% de significância ( $p < 0.05$ ) não há diferença estatística na atividade de LiP entre e dentre os fungos testados em ambos os meios, com amostras de PET sem tratamento físico.

**Tabela 7.** Valor médio da atividade enzimática de lignina peroxidase, em diferentes meio de cultura e amostras de PET com e sem tratamento físico de temperatura, em 90 dias de incubação.

MEIO DE CULTIVO	PET SEM TRATAMENTO FÍSICO			PET - TEMP. 35°C			PET-TEMP. 50°C		
	PYC*	FBL	FV12	PYC*	FBL	FV12	PYC*	FBL	FV12
M1	70.73 <sup>(a)</sup>	68.40 <sup>(a)</sup>	70.67 <sup>(a)</sup>	74.68 <sup>(a)</sup>	62.17 <sup>(a)</sup>	68.28 <sup>(a)</sup>	71.22 <sup>(a)</sup>	59.68 <sup>(a)</sup>	78.55 <sup>(a)</sup>
MFT	102.46 <sup>(a)</sup>	79.45 <sup>(a)</sup>	93.54 <sup>(a)</sup>	117.92 <sup>(a,b)(1)</sup>	125 <sup>(a,b)(1)</sup>	95.25 <sup>(a,b)(1)</sup>	107.18 <sup>(a,b)</sup>	97 <sup>(a,b)</sup>	107.23 <sup>(a,b)</sup>

Letras iguais na horizontal não apresentam diferença estatística ao nível de 95% de probabilidade ( $p < 0,05$ ).

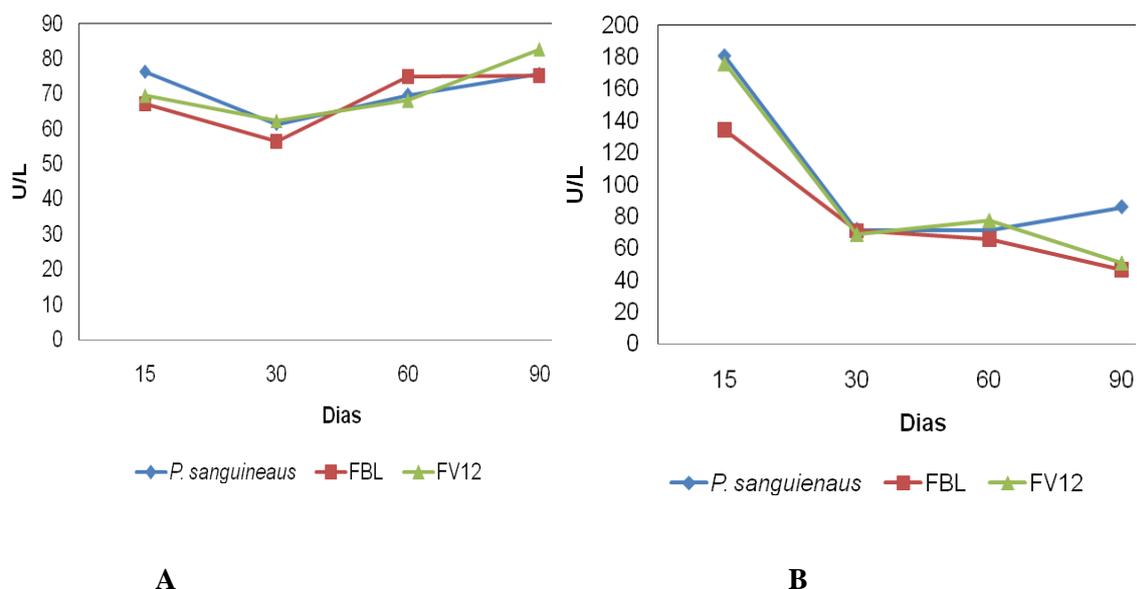
<sup>(1)</sup> Diferença estatística ao nível de 99% de significância.

\*PYC-*P. sanguineus*

O padrão de atividade de LiP nesta etapa da pesquisa, ocorreu em 15 dias de incubação para a linhagem *P. sanguineus* em meio MFT. Após essa atividade máxima houve um decréscimo abrupto e subseqüentemente redução da atividade até o tempo final da medição (Figura 23A).

No entanto, no meio M1, apesar da atividade dessa enzima ter começado em 15 dias de incubação, observa-se um decréscimo no trigésimo dia e subseqüentemente um aumento da atividade seguindo até 90 dias de incubação. (Figura 23B).

Da mesma maneira que ocorreu no meio M1 com PET sem tratamento físico, a atividade de LiP nesse meio com amostras de PET submetidas a pré-tratamento de 35°C, foi também menor do aquele do meio MFT nessas mesmas condições de pré-tratamento (Tabela 7). O fungo FBL foi o que apresentou a maior atividade de LiP no meio MFT. Ressalta-se, entretanto, que não há diferença estatística ao nível de 95% de significância ( $p < 0,05$ ) entre a atividade dos fungos. Porém, entre os tratamentos existe diferença entra a atividade de LiP dos fungos ao nível de 99% de significância ( $p < 00,1$ ) (Tabela 7).

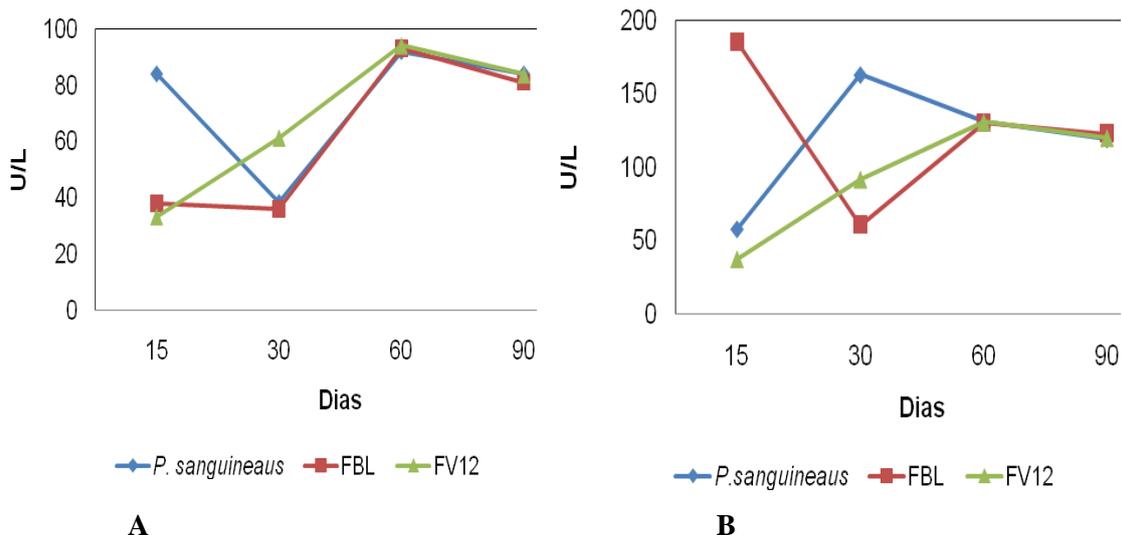


**Figura 23:** Atividade enzimática de LiP, PET sem tratamento físico com as linhagens fúngicas *P. sanguineus*, FBL e FV12, em fermentação submersa estacionária, durante 15, 30, 60 e 90 de incubação. A. Meio sem suplementação-M1; B. Meio suplementado com farinha de tucumã-MFT.

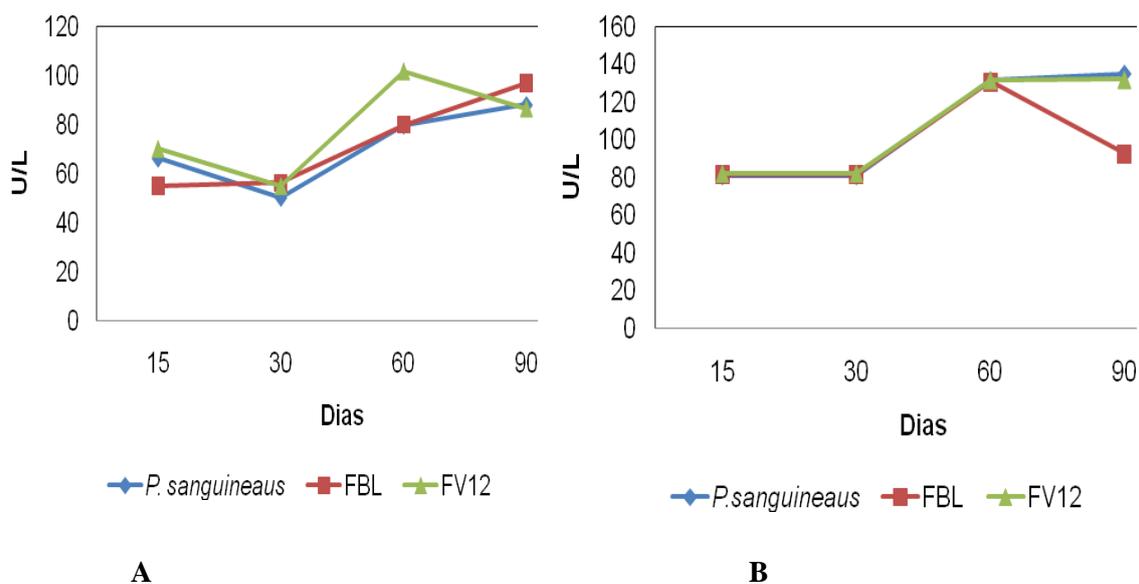
A atividade de LiP no meio M1 e com partículas de PET submetido à temperatura 35°C, atingiu seu nível máximo em 60 dias para o todos os fungos testados .(Figura 24 A). O padrão de atividade de LiP nas mesmas condições, porém no meio MFT apresenta o pico máximo aos 30 dias de incubação para o fungo *P. sanguineus* (Figura 24B).

A atividade de LiP em meio com presença de partículas de PET pré-tratada à 50°C foi maior no meio MFT. Nestas condições FV12 apresentou o maior valor absoluto da atividade enzimática de LiP. Ressalta-se, que dentre os meios não há diferença estatística da atividade de LiP ao nível de 95% de significância ( $p < 0.005$ ). Por outro lado, encontramos diferenças na atividade enzimática do *P. sanguineus* entre os meios de incubação (Tabela 7).

O padrão de atividade de LiP foi similar para todas as linhagens estudadas em meio M1 e MFT, tendo seu pico máximo em 60 dias de incubação. (Figura 25A e 25B).



**Figura 24:** Atividade enzimática de LiP, PET submetido ao pré-tratamento com temperatura 35°C, com as linhagens fúngicas *P. sanguineus*, FBL e FV12, em fermentação submersa estacionária, durante 15, 30, 60 e 90 de incubação. A. Meio sem suplementação-M1; B. Meio suplementado com farinha de tucumã - MFT.



**Figura 25:** Atividade enzimática de LiP, PET submetido ao tratamento físico, temperatura 50°C, com as linhagens fúngicas *P. sanguineus*, FBL e FV12, em fermentação submersa estacionária, durante 15, 30, 60 e 90 de incubação. A. Meio sem suplementação-M1; B. Meio suplementado com farinha de tucumã - MFT.

### 5.5.3 Atividade de Manganês Peroxidase – MnP

Ensaio onde partículas de PET não sofreram qualquer tratamento físico antes de serem adicionadas aos diferentes meios de cultura e fungos, a maior atividade média de MnP ocorreu no meio MFT (Tabela 8). Neste meio, o FV12 apresentou maior atividade de MnP, 63% maior do que no meio M1. Ressalta-se que não existe diferença estatística ao nível de 95% de significância entre e dentre os tratamentos realizados.

**Tabela 8.** Valor médio da atividade enzimática de manganês peroxidase, em diferentes meio de cultura e amostras de PET com e sem tratamento físico de temperatura, em 90 dias de incubação.

MEIO DE CULTIVO	PET SEM TRATAMENTO FÍSICO			PET-TEMP. 35°C			PET-TEMP. 50°C		
	PYC*	FBL	FV12	PYC*	FBL	FV12	PYC*	FBL	FV12
M1	66.3 <sup>(a)</sup>	69.7 <sup>(a)</sup>	54.5 <sup>(a)</sup>	60.1 <sup>(a)</sup>	58.2 <sup>(a)</sup>	58.7 <sup>(a)</sup>	53.6 <sup>(a)</sup>	49.0 <sup>(a)</sup>	60.4 <sup>(a)</sup>
MFT	80.2 <sup>(a)</sup>	85.3 <sup>(a)</sup>	88.7 <sup>(a)</sup>	102.5 <sup>(a,b)(1)</sup>	103.8 <sup>(a,b)(1)</sup>	82.5 <sup>(a,b)(1)</sup>	107.3 <sup>(a,b)</sup>	147.1 <sup>(a,b)</sup>	156.9 <sup>(a,b)</sup>

Letras iguais na horizontal não apresentam diferença estatística ao nível de 95% de probabilidade ( $p < 0,05$ ).

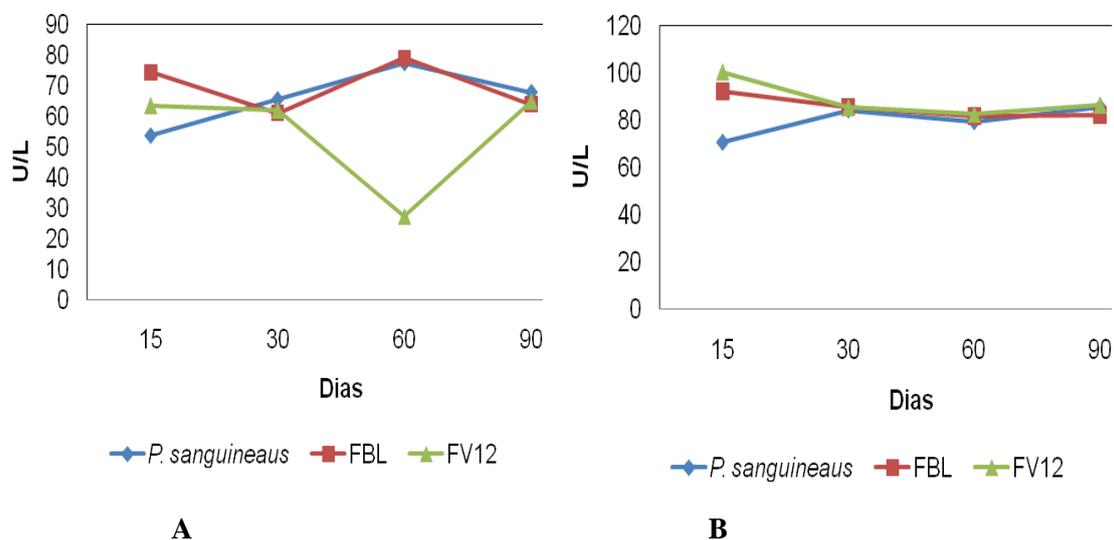
<sup>(1)</sup> Diferença estatística ao nível de 99% de significância.

\*PYC-*P. sanguineus*

A atividade de MnP foi maior para todos os fungos e meios testados. No caso específico onde as amostras de PET não sofreram qualquer tratamento físico antes de serem adicionadas aos diferentes meios de cultura o padrão de atividade de MnP teve sua atividade máxima em 60 dias para o fungo *P. sanguineus* e FBL. Comportamento contrário para FV12 que demonstrou que a atividade enzimática decresceu nesse mesmo período (Figura 26A). O padrão de atividade enzimática de MnP ao longo do experimento para o meio MFT nas condições acima citadas, mostrou-se decrescente para todos os fungos com atividade máxima aos quinze dias de incubação (Figura 26B).

O padrão de atividade MnP, no meio M1, que continha as amostras de PET pré-tratadas a 35°C, mostrou-se crescente com máximo de atividade aos 60 dias de incubação para todos os fungos (Figura 27A). No meio MFT nas mesmas condições de pré-tratamento, a atividade de MnP apresentou padrão decrescente para *P. sanguineus* e

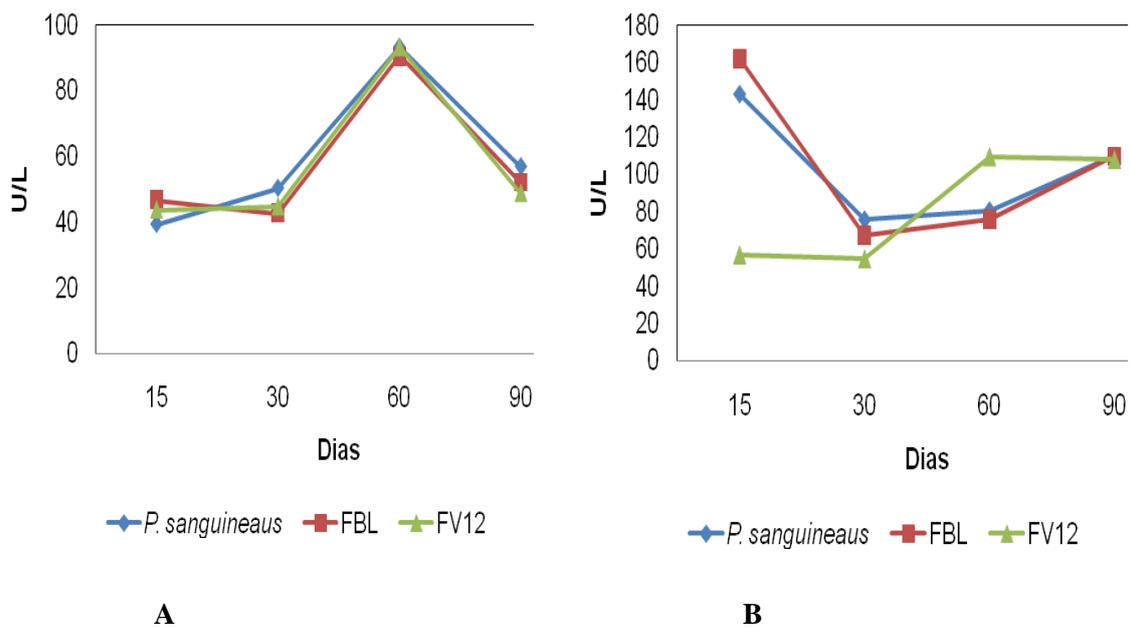
FBL com atividade máxima nos quinze primeiros dias de incubação, exceção para o fungo FV12 cujo padrão de atividade enzimática mostrou-se crescente durante o período do experimento, alcançando atividade máxima aos sessenta dias de incubação (Figura 27B).



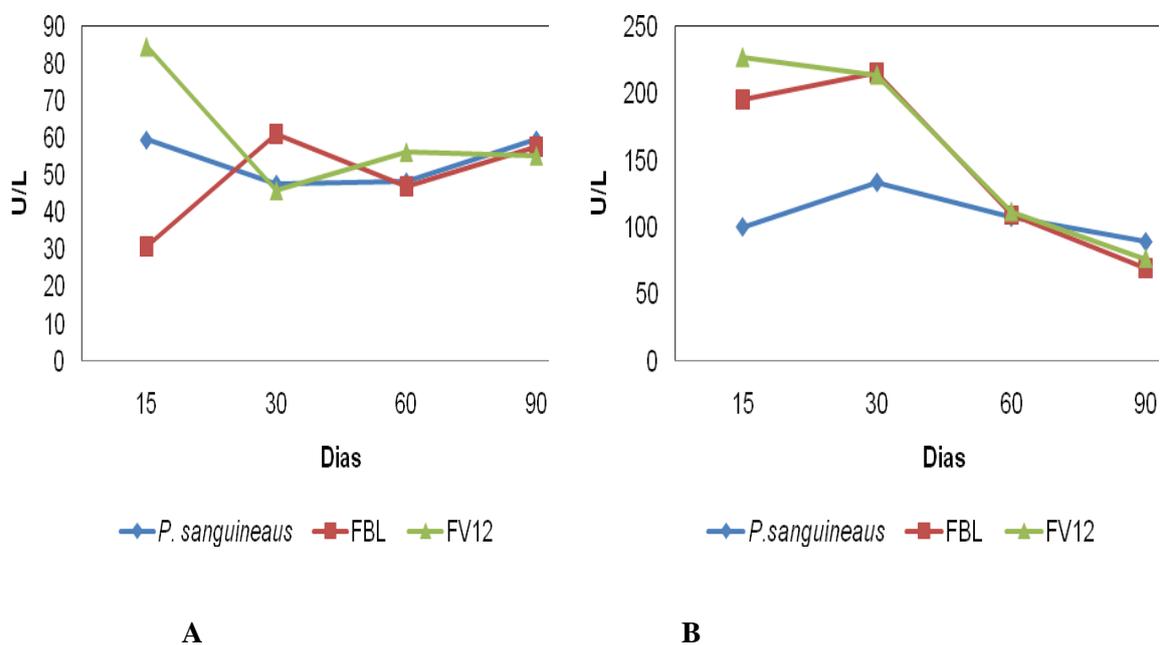
**Figura 26:** Atividade enzimática de MnP, PET sem tratamento físico com as linhagens fúngicas *P. sanguineus*, FBL e FV12, em fermentação submersa estacionária, durante 15, 30, 60 e 90 de incubação. A. Meio água; B. Meio suplementado com farinha de tucumã.

Para o meio MFT que continha amostras de PET pré-tratadas à 50°C a atividade média de MnP foi maior para FV12, seguida de FBL e *P. sanguineus* (Tabela 8). Nesta condição de pré-tratamento da amostra e meio MFT foi onde ocorreu a maior atividade de MnP, em comparação com as amostras sem nenhum pré-tratamento e aquelas pré-tratadas a 35°C. No meio M1, a atividade enzimática mostrou-se similar para todos os tratamentos, exceção para FBL com atividade enzimática máxima em 30 dias de incubação (Figura 28A).

O padrão de atividade enzimática de MnP ao longo do experimento para o meio MFT nas condições acima citadas, mostrou-se decrescente para todos os fungos com atividade máxima aos 15 dias de incubação para FV12 e 30 dias para *P. sanguineus* e FBL (Figura 28B).



**Figura 27:** Atividade enzimática de MnP, PET submetido ao tratamento físico, temperatura 35°C, com as linhagens fúngicas *P. sanguineus*, FBL e FV12, em fermentação submersa estacionária, durante 15, 30, 60 e 90 de incubação. A. Meio sem suplementação-M1; B. Meio suplementado com farinha de tucumã - MFT.



**Figura 28:** Atividade enzimática de MnP, PET submetido ao tratamento físico, temperatura 50°C, com as linhagens fúngicas *P. sanguineus*, FBL e FV12, em fermentação submersa estacionária, durante 15, 30, 60 e 90 de incubação. A. Meio sem suplementação-M1; B. Meio suplementado com farinha de tucumã - MFT.

## 6 DISCUSSÃO

Através das análises realizadas para determinar a perda de massa dos polímeros em estudo verificou-se que todas as amostras de PET apresentaram decréscimo em sua massa inicial após incubação com as linhagens fúngicas nos períodos de incubação testados.

Silva (2009) refere que a degradação do PET pode ocorrer por duas rotas: pela fotoclivagem direta do polímero e por subsequente fotoxidação dos grupos glicol. Quando expostos à luz solar a foto oxidação não é uniforme sendo degradado, preferencialmente, na superfície orientada pela luz. Em relação à degradação hidrolítica todos os poliésteres aromáticos podem ser degradados a temperaturas máximas de utilização em torno de 105° C (MARK *et. al.*, 1986).

Foram realizados pré-tratamentos com temperatura 35° e 50°C visando explorar os processos de transformações químicas e físicas objetivando a perda dessas propriedades, tornando mais acessíveis à colonização dos fungos e conseqüentemente o processo de biodegradação. Dzieciol; Trzeczynski, (1998) afirmam que a estabilidade térmica do PET é relativamente alta, substâncias voláteis tóxicas são emitidas à temperaturas de 200-300° , durante a produção, processamento e reciclagem do material, produzindo principalmente acetaldeído, formaldeído, monóxido de carbono e benzeno. As reações de degradação termo-oxidativas são mais complicadas com a participação do O<sub>2</sub> formando hidroperóxido seguido pela ruptura da cadeia.

Cepas amazônicas dos fungos FBL e FV12 no período de 90 dias de cultivo em meio MFT, submetido ao pré-tratamento com temperatura 50°C, promoveram a maior perda de massa do plástico, atingindo ambos o percentual de 30%. Este resultado concorda com o de JARA (2007), que realizando experimentos com o fungo basidiomiceto *Phanerochaete chrysosporium*, no processo de degradação do PET, observou que as amostras de PET submetidas à pré-tratamento com temperatura 50°C e

incubadas com o referido fungo, obtiveram também diminuição de sua massa polimérica em 60 dias de incubação, sendo que nossos fungos apresentaram maior perda de massa das partículas de PET.

Nos ensaios realizados sem nenhum tratamento físico, os melhores resultados foram obtidos no período de 90 dias de incubação em meio MFT, fermentação submersa estacionária para o fungo FBL, alcançando a média 23,9% de perda inicial de massa do PET. REYES (2003), realizando ensaios com PET sem tratamento físico, em meio de cultivo líquido contendo água e sais, utilizando o fungo basidiomiceto *Pleurotus* 001, alcançou a média em torno de 5,79% em 30 dias de incubação. COSTA (2001) também estudando a perda de massa do PET em fermentação submersa, utilizando resíduos agroindustriais, encontrou um período máximo de perda similar ao encontrado na presente pesquisa (90 dias).

Tratamentos biológicos utilizando consórcios de microorganismos vêm sendo apresentado como uma poderosa alternativa biotecnológica, apresentado-se viável no processo de biorremediação/biodegradação (KUNZ *et. al.*; 2002).

Neste sentido, nossos resultados mostraram-se melhores com consórcios de fungos do que quando testados individualmente. Gallego e seus colaboradores (2007), por exemplo, também demonstraram experimentalmente que a biodegradação de derivados do petróleo, pelo consórcio de fungos filamentosos, foi mais eficiente do que com os microorganismos isolados. Costa *et.al.*, (2007), referem que os consórcios microbianos podem utilizados como inóculos em tratamentos biológicos, visando reduzir o tempo de degradação. E, no processo de biodegradação dos derivados do petróleo é necessária a cooperação sinérgica entre os microorganismos para metabolizarem os compostos presentes no petróleo até a completa mineralização destes em gás carbônico e água ou gás metano e água (URURAHY *et.al.*, 1998).

Nossos resultados mostraram-se diferentes quando realizamos ensaios com partículas de PET submetido ao pré-tratamento com temperatura 50°C, com melhores resultados obtidos no período de 90 dias de incubação em meio MFT, para o consórcio C1. Tais resultados corroboram com outras pesquisas que mostram o potencial de consórcios fúngicos para a degradação do PET (GALEGO *et. al.*, 2007).

Com relação à atividade enzimática, todas as linhagens estudadas apresentaram atividade para lacase, lignina peroxidase e manganês peroxidase em 90 dias de incubação em fermentação submersa estacionária.

A lacase tanto pode atuar na destoxificação de compostos do substrato como oxidar grupos fenólicos (KEREM *et.al.*, 1992). Nossos experimentos realizados com os fungos testados produziram máxima atividade de peroxidases (LiP e MnP) no mesmo período de pico de lacase, comportando-se de forma similar, o que permite inferir sobre possível sinergismo dessas enzimas na degradação dos compostos que constituem o PET. Estudos realizados evidenciam tal comportamento na descoloração de corantes industriais (KUMARAN *et. al.*, 1997; RODRIGUEZ *et. al.*, 1999; SWAMY & RAMSAY, 1999).

A produção de lacase e peroxidases (LiP e MnP) ocorreu durante a fase exponencial do fungo, possivelmente após a ação das enzimas celulolíticas conforme sugerido por Akhmedova (1994), mas que não foram o foco do presente trabalho.

Nuske e colaboradores (2002) mostraram que a produção de lacase em cultivo submerso de *Nematoloma frowardi* ocorreu conjuntamente com o crescimento fúngico, cessando com o decréscimo da produção de biomassa. Enzimas de interesse botecnológico têm sido tradicionalmente produzidas por fermentação submersa, devido à maior facilidade de controle e operação do processo (ALONSO, 2001).

Os ensaios envolvendo a linhagem fúngica FV12 e o PET submetido à temperatura 50°C em meio MFT, foram os que apresentam melhores resultados quanto à atividade de manganês peroxidase, coincidindo com o maior valor médio de perda de massa do PET nas mesmas condições de incubação, revelando forte relação da atuação dessa enzima no processo de degradação do PET.

O meio de cultivo suplementado com MFT foi onde ocorreu o maior crescimento radial, para todos os fungos testados e a maior produção de atividade enzimática, coincidindo com a maior perda de massa das partículas de PET, indicativo de que as enzimas oxidativas determinadas têm um papel importante na degradação de compostos presentes no polímero. Este meio demonstra apresentar requisitos nutricionais para os fungos no processo de degradação do PET. FERREIRA *et. a.l.*,

(2008) descreve que na composição química do fruto do tucumã encontra-se, em média 46% de umidade, 5% de proteínas, 30% de lipídios, 9% de fibras e 3% de minerais. A casca do tucumã é composta de potássio, cálcio, e selênio e fibra alimentar, verifica-se, portanto, a viabilidade de utilização da mesma (YUYAMA, 2005).

As amostras de PET submetidas à fermentação submersa estacionária e pré-tratamento com temperatura 50°C e incubadas durante 90 dias com a linhagem FBL, FV12 e com o consórcio C3 foram os ensaios que apresentaram os melhores resultados no que tange a diminuição da massa inicial do polímero, realizou-se Microscopia Eletrônica de Varredura para verificar se suas superfícies sofreram alguma modificação. Após análise, observa-se que as partículas de PET sofreram severo desgaste da superfície polimérica, com descamações, rupturas, escavações e aspecto quebradiço em toda superfície, assim como clareamento da amostra. É importante ressaltar que verificar a degradação de um polímero é de extrema dificuldade, pois este fenômeno pode ocorrer sem que haja necessariamente a perda de massa do polímero, mas alterações na molécula do polímero podem ser observadas (SCHNABEL, 1981; SCOTT & GILEAD, 1995). REYES (2003), trabalhando com degradação do PET, destacou o basidiomiceto *P. chrysosporium*, como a linhagem que promoveu maior diminuição de massa do PET, 6,7% em 90 dias de incubação e apresentou maior desgaste e alterações da superfície polimérica ao MEV.

Ressalta-se que a maior perda de massa das partículas de PET, ocorreu nas amostras pré-tratadas à 50°C. Esse pré-tratamento das partículas de PET possivelmente alteraram algumas propriedades físicas e estrutura química do Polietileno tereftalato (PET), facilitando a colonização dos fungos testados e promovendo o processo de biodegradação.

Nossos resultados, com fungos amazônicos concordam com àqueles obtidos por Jara (2007) que mostrou que partículas de Polietileno Tereftalato tratadas com temperatura de 50°C e submetidas ao crescimento com *P. chrysosporium*, apresentaram o maior valor de perda de massa.

## 7 CONCLUSÕES

De uma maneira geral, as linhagens fúngicas utilizadas neste trabalho foram capazes de diminuir a massa molar do PET.

- As linhagens fúngicas FBL, FV12 e o consórcio C1 promoveram a maior perda de massa do PET quando submetido ao pré-tratamento com temperatura 50°C durante 90 dias. Demonstraram ter um grande potencial na degradação de polietileno tereftalato apresentando alterações da morfologia e superfície do polímero em MEV com severo desgaste da superfície polimérica, descamações, escavações, rupturas e aspecto quebradiço em toda superfície, assim como clareamento da amostra.
- A utilização de consórcio de microorganismos fúngicos apresenta-se como uma poderosa alternativa biotecnológica, demonstra-se técnica e economicamente viável no processo de biodegradação do polietileno tereftalato - PET.
- A enzima manganês peroxidase (MnP) em meio MFT foi a que apresentou os maiores valores de atividade dentre as três enzimas estudadas.

## 8 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Nossos resultados qualificaram outras indagações sobre variáveis não estudadas, que poderiam influenciar nos resultados. Nesse sentido é necessário os seguintes estudos:

- Verificar a influência do pH no processo de degradação do PET e o efeito dos tratamentos físicos (UV e temperatura) na toxicidade do meio de cultivo;
- Verificar atividades de enzimas hidrolíticas e a influência de indutores para aumentar a atividade das enzimas oxidativas;
- Estudar faixa maior de temperatura para pré-tratamento das partículas de PET;
- Testar outros meios de cultura alternativos para incubação e consórcios com outros fungos;
- Estudar a incubação sob fermentação em estado de agitação;

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABIQUIM – Associação Brasileira das Indústrias Químicas. Os plásticos. Disponível em: <<http://www.abiquim.org.br>>. Acesso em: 16 de maio de 2010.

AGARWAL, A., SINGH, A. AND AGARWAL, P. N., **Pop. Plast.**, 16 (Oct.), 1971.

AGUIAR, J.P.L.; MARINHO, H.A.; REBÊLO, Y.S.; SHRIMPTON, R. Aspectos nutritivos de alguns frutos da Amazonia. **Acta Amaz.** Manaus, v.10, n. 4 p. 775-8, 1980.

AGUIAR, J.P.L. Tabela de composição de alimentos da Amazônia. **Acta Amaz.** Manaus, v.26, n. ½, p. 121-26, 1996.

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.

AITKEN, M.D, IRVINE, R.L. Characterization of reactions catalysed by manganese peroxidase from *Phanerochaete chrysosporum*. **Archive Biochemical Biophysical.** v. 276, p. 405-414. 1990.

AKHMEDOVA, Z.R.; Lignolytic enzymes of basidiomycetes: lignin peroxidases from the fungus *Pleurotus ostreatus* UzBl-Zax 108. **Applied Biochemical Biotechnology.** v. 49, p. 257-280, 1994.

ALBERTSSON, A. C. AND RANBY, B., in Proc. 3rd Int. Biodegradation Symp., ed. J. M. Sharpley and A. M. Kaplan. **Applied Science Publishers**, London, p. 743, 1976.

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

ALLEN, G.; BEVINGTON, J.C. **Comprehensive Polymer Science**, 1ª ed., vol. 1, Oxford: Pergamon plc, 1989.

ALONSO, F.O.M. **Efeito da agitação e aeração na produção de lipases por *Yarrowia lipolytica* (IMUFRJ 50682)**. Dissertação de Mestrado – Centro de Ciências da Saúde – Universidade Federal do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro, 2001.

ANON. Curso Básico Intensivo de Plásticos. Poli (tereftalato de etileno). **Jornal de Plásticos**, Niterói, 1997. 4.9.1.

ASTM – AMERICAN SOCIETY FOR TESTING MATERIALS. Standart Practice for Determinig Resistance of Plastics to bacteria, G22-76, 1990.

ASTM – AMERICAN SOCIETY FOR TESTING MATERIALS. Standart Practice for Determinig Resistance of Plastics to fungi, G21-90, 1990.

ASTM – AMERICAN SOCIETY FOR TESTING MATERIALS. Standart Test Method for Determining the Anaerobic Biodegradation of Rastic Materials in the presence of Municipal Sewage Sludge, D 5210-92, 1992.

ASTM – AMERICAN SOCIETY FOR TESTING MATERIALS. Standart method for aerobic biodegradability of degradable plastics by specific microorganisms, D5247- 92, 1992.

AZEVEDO, J.L. Fungos: Genética e Melhoramento de fungos na biotecnologia. Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento. 2003. Disponível em: <http://www.biotecnologia.com.br/revista/bio01/1hp>. Acesso em: 05 de maio de 2011.

BLANCHETE, R.A. Deslignification by wood-decay fungi. **Annual Review Phytopathology**, v. 29, p. 381-398,1991.

BALLESTEROS, M. Estado del desarrollo tecnológico del aprovechamiento de biomasa: Biocombustibles para el sector del transporte. **Energía**, v.161, p. 29-34, 2001.

BAL-TEC. Preparation Technology for Electron Microscopy – Catalogue N. 5 A Systems and Devices. Liechtenstein: Bal-Tec AG, 1999.

BASSET, D.C. Principles of Polymer Morphology. **Cambridge: Cambridge University Press**, 1981.

BROCHIER, J. Húlie naturelle riche en caroténoïdes (*Astrocaryum vulagre Mart*). **Paris:JBA**, 2000. 132 p.

CALL, H. P.; MÜCKE, I. History, overview and applications of mediated lignolytic systems, especially laccase-mediator-systems (Lygnozyl®-process): **Minireview. Journal of Biotechnology**, v. 53, p. 163-202, 1997.

CANEVAROLO, S.V. **Ciência dos Polímeros**. Editora Art Líber. 1ª ed., 2002, 184p.

CASTRO E SILVA, A.; SILVA, M. B. C.; CAVALCANTI, M. A. Fungos: O inexplorado potencial enzimático da biodiversidade amazônica, 2002. Disponível em: <http://www.geocities.com.br/biodiversidade2002/fungos>. Acesso em 20 de fevereiro de 2010.

CASTRO E SILVA, A.; ESPOSITO, E.; FERAZ, A.; DURAN, N. Decay of parkia oppositifolia in Amazônia by *Pycnoporus sanguineus* and potential use for effluent decolorization. **Holzforschung** 47: 361-368.1993.

CAVALCANTE, P.B. Frutas comestíveis da Amazônia. 5ª. ed. Belém: CEJUP, CNPq, Museu Paraense Emílio Goeldi, 1991. 279 p. (**Coleção Adolfo Ducke**).

CHANDRA, R.; RUSTGI, R. Biodegradable Polymers. **Program Polymer Science**. v. 23, p. 1273-1335, 1998.

CHANG, S.T. Bioconversion technology: Composting and production of microbial and metabolites, In: Workshop Sul-Americano sobre usos alternativos de resíduos de origem florestal e urbana. **Anais**. Colombo: EMBRAPA-Floretas, p. 71-82, Curitiba, 1997.

CLEMENTE, A.R.. **Degradação de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos por fungos**. Tese de Doutorado - Faculdade de Engenharia de Alimentos. Universidade Estadual de Campinas. Campinas, SP, 2002.

CLEMENT, C.R.; LLERAS, P.E.; VAN LEEUWN, J. O potencial das palmeiras tropicais no Brasil: acertos e fracassos das últimas décadas. **Ver. Bras. Agrociênc.**, v.9, n. 1-2, p.67-71, 2005.

COSTA, K.C.F. **Estudo da degradação de polímeros sintéticos de importância industrial por linhagens fúngicas**. Dissertação de Mestrado - Faculdade de Engenharia de Alimentos. Universidade Estadual de Campinas. Campinas, SP, 2001.

COSTA, A.F.S.; SILVA, J.R.R; SANTOS, R.C.M.M.; FARIAS. C.B.; SARRUBO, L.A.; JORDÃO, R.C.C.; SALGUEIRO, A.A. Obtenção de consórcio de microorganismos a partir de amostra de petróleo. **Revista Ciência e Tecnologia**. Ano 1, nº 1, julho-dezembro, 2007.

CONTATO, M.C.D.; SERAFINI, T.Z.; SOTO, J.M.R. Contaminação por sólidos e químicos em tartarugas marinhas no Sul do Brasil. In: **Simpósio Brasileiro de Engenharia Ambiental**, Itajaí/SC, 2003.

COWLING, E.B.; KIRK, T.K. Properties of cellulose and lignocellulosic materials a substrates for enzymatic conversion process. **Biotechnol. Bioeng.** Symp., n. 1, p. 95-123, 1976.

DAVIDSON, R.W.; CAMPBELL, W.A & BLAISDELL,D.J. Defferetiation of wood-decayin fungi by their reactions on gallic or tannic acid médium. **Journal. of Agric. Res.** , v.57, n.9, p. 683-685, 1938.

DOELLE, H.W. Joint venture capital investment for clean technologies and their problems in developing countries. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**. n. 12, p. 445-450, 1996.

DURÁN, N. Reduction of chemical oxygen demand in bleach plant effluent by a combination of photochemical and biological method. **Proc. Second Symp. Chem. Lignin Other Wood Components**, Campinas, S.P. Brazil 3: 323-333. 1992.

DURAN, N.; ESPOSITO, E. Potential applications of oxidative enzymes and phenoloxidase-like compounds in wastewater and solid treatment: a review. **Applied Catalysis B: Environmental**, v.28, p.83-99, 2002.

DZIECIOL, M.; TRZESZCZYNSKI, J. Studies of Temperature Influence on Volatile Thermal Degradation Products of Poly (ethylene terephthalate). **Journal of Applied Polymer Science**, 69:2377-2381, 1998.

ERIKSSON, K. E. L. Biotechnology in the pulp and paper industry. **Wood Science and Technology**, v.24, p.79-101, 1990.

ERIKSSON, K. E. L.; BLANCHETE, R.A.; ANDER, P. Microbial and enzymatic degradation of wood and wood components. **Springer Verlag**, Germany-Berlin, p.407, 1990.

ESPOSITO, E.; CANHOS, V.P.; DURÁN, N. Screening of lignin degrading fungi for removal of color from Kraft mill wastewater with no additional extra carbon-source. **Biotechnology Lett.** 13: 571-576. 1991.

ESPOSITO, E.; AZEVEDO, J.L. (Orgs). **Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia**. Caxias do Sul: Educs, 2004.

FAO - Food and Agriculture Organization. **Especies forestales productoras de frutas y otros alimentos**. 3. Ejemplo de America Latina, 44/3. Rome, 1987. 241 p.

FERREIRA, F. S. **Crescimento e produção enzimática dos fungos deterioradores de madeira *Pycnoporus sanguineus* (L.: Fr) Murr e *Trametes***. Dissertação de Mestrado

em Biotecnologia e Recursos Naturais da Amazônia. Universidade Estadual do Amazonas, Manaus, Am, 2005.

FERREIRA, E.S.; LUCIEN, V.G.; AMARAL, A.S.; SILVEIRA, C.S. Caracterização físico-química do fruto e do óleo extraído de tucumã (*Astrocaryum vulgare* Mart). **Rev. Alim. Nutr.**, Araraquara, v. 19, n. 4, p. 427-433, 2008.

FORLIN, F.J.; FARIA, J.A.F. Considerações Sobre a Reciclagem de Embalagens Plásticas. **Polímeros**, 2002, vol.12, no.1, p.1-10.

GALLEGO, J.L.R.; MARTINEZ, M.J.G.; LLAMAS, J.F.; BELLOCH, C.; PELÁEZ, A.I; SANCHÉZ, J. Biodegradation of oil tank bottom sludge using microbial consortium. **Biodegradation**. v.18, p. 269-281, 2007.

GAZHALI, F.M.; RAHMAN, R.N.Z.A.; SALLEH, A.B.; BASRI, M. Biodegradation of hydrocarbons in soil by microbial consortium. *Internationa Biodeterioration & Biodegradation*. v.54, p.61-67, 2004.

GIANFREDA, L.; XU, F.; BOLLAG, J.M. Laccases: A useful group of oxidore ductive enzymes. **Bioremediation Journal**, 3: 1-26, 1999.

GLENN, J.K; AKILESWAREAN, L.; GOLD, M.H. Mn(II) oxidation is the principle function of the extracellular Mn-peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium*. **Arch. Biochem. Biophys.**, v.251, p. 688-696, 1986.

GOCHEV, V.K.; KRASTANOV, A.I. Fungal laccases. **Bulgarian Journal of Agricultural Science**, 13, 75-83, 2007.

GOMES, H. A. S. **Obtenção, caracterização mecânica de pet/amido plastificado e o cálculo das incertezas das medições**. Dissertação de Mestrado em Engenharia e Ciência dos Materiais. Universidade do São Francisco. Itatiba, SP, 2006.

GÖPFERICH, A. Mechanisms of polymer degradation and erosion. **Biomaterials**. V.17, p.103-114, 1996.

GUEDES, A.M.M.; FRANÇA, L.F.; CORRÊA, N.C.F. Caracterização físico-química da polpa do tucumã (*Astrocaryum vulgare* Mart). In: Congresso Latino Americano de Ciências dos Alimentos, 5., 2005, Campinas, **Anais...** Campinas, Sociedade Brasileira de Ciência dos Alimentos, 2005.

HATAKKA, A. Lignin-modifying enzymes from selected with-rot fungi: Production and role in lignin degradation. **FEMS Microbiol Reviews**. v. 13, p. 125-135, 1994.

INSTITUTO GEA – ÉTICA E MEIO AMBIENTE. **Plásticos**. Disponível em: <http://www.institutogea.org.br/4b.htm>. Acesso em: 15 de maio de 2010.

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

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

KEREM, Z.; FRIESEM, D.; HADAR, Y. Lignocellulose degradation during solid-state fermentation: *Pleurotus ostreatus* versus *Phanerochaete chrisporium*. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 58, n. 4, p. 1123-1127, 1992.

KIRK, T.K.; FARREL, R.L. Enzymatic combustion: the microbial degradation of lignin. **Annual Review of Microbiology**. v. 21. p. 31-33,1987.

KUMARAN, S.; SASTRY, C.A.; VIKINESWARY, S. Laccase, cellulose and xylanase activities during growth of *Pleurotus sajor-caju* on *sagohampus*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**. v .13, n. 1, p. 43-49,1992.

KUNZ, A.; ZAMORA, P.P.; DURÁN, N.; MORAES, S.G. Novas tendências no tratamento de efluentes industriais. **Química Nova**. v. 25. n.1, p. 78-82, 2002.

LEE, B.; POMETTO III, A.L.; FRATZKE, A.; BAILEI JR., T.B. Biodegradation of degradable plastic polyethylene by *Phanaerochaete* and *Streptomyces species*. **Applied. Environmental Microbiology**. v.57, n.3, p. 678-685, 1991.

LEONOWICZ, A. e GRZYWNOWICZ, K. Quantitative estimation of laccase forms in some white rot fungi using syringaldazine as a substrate. **Enzyme and Microbial Technology**. v. 3, p. 55 – 58, 1981.

LIMA, A.M.F. **Estudo da cadeia produtiva do polietileno tereftalato na região metropolitana de Salvador como subsídio para análise do ciclo de vida**. UFBA – Universidade Federal da Bahia. Salvador-BA, 2001.

LOPES, L. O que são polímeros sintéticos. Texto elaborado para a **1ª Semana de Polímeros do IMA**, 2007. Disponível em: < <http://www.abiquim.org.br/plastivida> >. Acesso em: 18 de maio de 2010.

LUBRANO, C.; ROBIN, J.R.; KHAIAT, A. Composition en acides gras, sterols et tocopherols d' huiles de pulpe de fruits de six espèces de palmiers de Guyane. **Rev. Oleagineux**, v.49, n. 2, p. 59-65, 1994.

MANO, E. B. **Introdução a Polímeros**. Editora Edgard Blücher Ltda., São Paulo, 1985.

MANO, E. B.; MENDES, L.C. **Introdução a Polímeros**. 2ª. ed. Editora Edgard Blücher Ltda., São Paulo, 1999.

MACEDO, J. M. B., GOTTSCHALK, L. M. F., BON, E.P.S. Calcium carbonate mediates higher Lignin Peroxidase activity in the culture supernatant of *Streptomyces viridosporus* T7A, **Braz. J. Chem. Eng.**, (16 (2): 121-131, 1999.

MARK, H.F.; BIKALES, N.M.; OVERBERGER, C.G.; MENGES, G. **Encyclopedia of Polymer Science and Engineering**, 2ª ed., vol. 4. New York (USA): John Wiley & Sons Inc., 1986.

MARINHO, H.A.; CASTRO, J.S. Carotenóides e valor de pró-vitamina A em frutos da região amazônica: pajurá, piquiá, tucumã e umari. In: **Congresso Brasileiro de Fruticultura**, 17, 2003, Belém. Anais...Belém:SDF, 2002. Meio magnético.

MATHEUS, D.C.; OKINO, L.K. Utilização de basidiomicetos em processos biotecnológicos. IN: Bononi, V.L.R.; Grandi, R.A.P. (eds.). *Zigomicetos, basidiomicetos e Deuteromicetos: Noções básicas de taxonomia e aplicações biotecnológicas*. São Paulo: Instituto de Botânica. São paulo. P-107-139. 1998.

MAU, J.; BEELMAN, R.B.; ZIEGLER, G.R.; ROYSE, D.J. Effect of nutrientes supplementation on flavor, quality, and shelf life of the cultivated mushroom *Agaricus bisporus*. **Mycologia**. 83(2): 142-149. 1991.

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

MIRANDA, I.P.A. et.al. Frutos de palmeiras da Amazônia. **Manaus:MCT/INPA**, 2001. 120 p.

MORAIS, J.D.; DIAS, M.R.P. **Elaboração do doce em massa e néctar de tucumã (*Astrocaryum vulgare* Mart)**. 2001. Monografia – Especialização em Tecnologia de Alimentos. Universidade Federal do Pará. Belém, 2001.

MÜLLER, R.J.; KLEEBERG, I; DECKWER, W.D. Biodegradation of polyesters containing aromatic constituents. **Journal of Biotechnology**, 86:87-95, 2001.

MUSTAFA, N. **Plastics Wast Management: Disposal, Recycling and Reuse**. New York (USA): **Marcel Dekker Inc.**, 1993.

NÜSKE, J.; SCHNEIBNER, K.; DORNBERGER, U.; ULLRICH, R.; HOFRICHTER, M. Large scale production of manganese-peroxidase using agaric white-rot fungi. **Enzyme and Microbial Technnology**, v. 30, p. 556-561, 2002.

OSE-COC. Disponível em: <<http://www.ose.g12.br/vantagem.htm>>. Acesso em: 15 de maio de 2010.

O'SULLIVAN, C. Mechanisms of pollutant degradation by White rot fungi. **App. Catal.B: Environm.**, v.5, issues: 1-2, p. 3-5, 1994.

PAVARINA, E.C. **Fungos microaeróbios na bioconversão de material lignocelulósico**. Tese de Doutorado, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, p. 161, Campinas, 2002.

PANDEY, A.; SOCCOL, C.R.; NIGAM, P.; SOCCOL, V. New developments in solid state fermentation: I-bioprocesses and products. **Biores. Technol.** 74: 69-80, 2000.

PEREIRA, R.C.C.; MACHADO, A.H.; SILVA, G.G. (Re) conhecendo o PET. **Revista Química Nova na Escola**. Química e Sociedade. p. 3-5, 2002.

PLÁSTICOS. Disponível em: <<http://www.desenvolvimento.org.br>>. Acesso em: 09 de julho de 2010.

**REDIFF ON THE NET**. Disponível em: <http://members.rediff.com/jogsn/BP4.html>. Acesso em: 25/06/2010.

REYES, L.F. **Estudo da degradação de polietileno tereftalato (PET) por fungos badidiomicetos lignolíticos**. Dissertação de Mestrado - Faculdade de Engenharia de Alimentos. Universidade Estadual de Campinas. Campinas, SP, 2003.

RIBEIRO, C.C.; SOARES, M.S. Caracterização do fruto e elaboração de geléia da polpa de tucumã (*Astrocaryum vulgare* Mart). In: Encontro Regional do norte e Nordeste da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos. 5., 1995, fortaleza. **Anais...Fortaleza**. Sociedade Brasileira de ciência e Tecnologia de Alimentos, 1995. 213 p.

RODRIGUEZ, E.; PICKARD, M.A.; VASQUEZ-DUHAL, T.R. Industrial dye decolorization by laccases from ligninolytic fungi. **Curr. Microbiol.** V.38, p.27, 1999.

ROSA, S.D.; CHUI, Q.S.H. Avaliação da Biodegradação de poli- $\beta$ -(hidroxibutirano-co-valerato) e poli-e-(caprolactona) em solo compostado. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**. v. 12, n.4. São Carlos. Oct./Dez. 2002.

SCHNABEL, W. Polymer Degradation: Principles and Pratical Applications. New York (USA): **Macmillan Publishing Co. Inc.**, 1981.

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

SCOTT, G.; GILEAD, D. Degradable Polymers. **London: Chapman & Hall**, 1995.

SERMANNI, G.; PORRI, A. The potentiality of solid state biotransformation of lignocellulosic materials. **Chimica Oggi**. Março: 15-19, 1989.

SILVA, K.R.I. **Biodegradação de polietileno tereftalato (PET) por fungos lignolíticos**. Dissertação de Mestrado em Engenharia de Alimentos. Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, 2009.

SONG, C.H.; CHO, K.Y.; NAIR, N.G. Effect of low temperature shock treatmente on sprorphore initiation, lipid profile and nutrient transport in *Lentinula edodes*. **Mycologia**. 83(1): 24-29. 1991.

SOUZA, H.Q. **Agaricales da reserva biológica Wlater Alberto Egler, Amazonas, Brasil**. Dissertação de Mestrado. Manaus: Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia. 173 p. 2002.

SPINACÉ, M.A.S. **Poli(tereftalato de etileno) processamento por extrusão e metodologia de caracterização**. *Química Nova*. p. 34-48, 2000.

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

SWAMY, J., RAMSAY, J.A. Effects of  $Mn^{2+}$  and  $NH^4$  concentrations on laccase and manganese peroxidase production and Amaranth decoloration by *Trametes versicolor*. **Applied. Microbiology. Biotechnology**, v. 51, p.391, 1999.

SCKLARZ, G.D.; ANTIBUS, R.K.; SINSABAUGH, R.L. & LINKINS, A.E. Production of phenol – oxidases and peroxidases by wood-rotting fungi. **Mycol.**, n. 81, p. 234-240, 1989.

TIBURTIUS, E.R.L.; PERALTA-ZAMORA, P.; LEAL,E.S. Contaminação de águas por BTXs e processos utilizados na remediação de sítios contaminados. **Química Nova**. V.27, n.3, 2004.

TIEN, M. & KIRK, T.K. Lignin-degrading enzyme from *Phanerochaete chrysosporium*: purification, characterization, and catalytic properties of a unique  $H_2O_2$ -requiring oxygenase. **Proc. Nat. Acad. Sci. USA**. 84:2280-2284, 1984.

TIMOFIECSYK, F.R.; PAWLOWSKY, U. Minimização de resíduos na indústria de alimentos: **Revisão. B. CEPPA**, 18 (2), p. 221-236, 2000.

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

URURAHY, A.F.P.; PEREIRA JR, N.; MARINS, M.D.M. Desempenho de um biorreator do tipo CSTR no processo de degradação de borra oleosa. **Boletim Técnico da Petrobrás**. v. 41, p. 125-132, 1998.

VILLACHICA, H. Frutales y hortalizas promisoras de la Amazonia; tratado de cooperación amazônica. Lima: Secretaria Pro-Tempore, **Tratado de Cooperacion Amazonica**, 1996. 367 p.

VILLAIN, F.; COUDANE, J.; VERT, M. **Polymer Degradation and Stability**.43, 1994.

YUYAMA, L.K.O.; AGUIAR, J.P.L.; TEIXEIRA, A.P.; LOPES, T.M.; YUYAMA, K.; FAVARO, D.I.T.; VASCONCELOS, M.B. Biodisponibilidade dos carotenóides do buruti (*Mauritia flexuosa* L.) em ratos. **Acta Amaz.**, Manaus, v. 28, n.4, p. 409-415, 1998.

YUYAMA, L.K.O.; AGUIAR, J.P.L.; TEIXEIRA, A.P.; LOPES, T.M.; YUYAMA, K.; FAVARO, D.I.T.; VASCONCELOS, M.B. Polpa e casca de tucumã (*Astrocaryum aculeatum* Meyer): quais os constituintes nutricionais? **Nutrire: Rev. Soc. Bras. Alim. Nutr.**, v.30, supl., p. 332, 2005.

YUYAMA, L.K.O.; MAEDA, R.N.; PANTOJA, L.; AGUIAR, J.P.L.; MARINHO, H.A. Processamento e avaliação da vida-de-prateleira do tucumã (*Astrocaryum aculeatum* Meyer) desidratado e pulverizado. **Cienc. Tecnol. Aliment.** v. 28, n. 2, Campinas, 2008.

**ANEXOS**  
**RESUMOS**



## ATIVIDADE OXIREDUCTASE DO *Pycnopus sanguineus*: SECREÇÃO DE LACASE EM MEIO SUPLEMENTADO COM DIFERENTES FONTES DE CARBONO

Naimy Farias de Castro <sup>1</sup>  
 Edilson Albuquerque Vieira <sup>1</sup>  
**Elaine Pires Soares** <sup>1</sup>  
 Adriana da Silva Nunes <sup>1</sup>  
 Ademir Castro e Silva <sup>1</sup>

1. Universidade do Estado do Amazonas

### INTRODUÇÃO:

Enzimas ligninolíticas têm potencial para aplicações em vários processos industriais e biotecnológicos. Tais aplicações incluem descontaminação de efluentes industriais, principalmente da indústria têxtil e petroquímica, processo de alvejamento e deslignificação na indústria de celulose e papel e na remoção de compostos fenólicos na indústria de bebidas (BALAN & MONTEIRO, 2001) e várias outras aplicações. Dentre essas enzimas encontra-se a lacase (benzenediol: oxigen oxidoreductase EC 1.10.3.2), que catalisa a oxidação de vários substratos com a redução de moléculas de oxigênio em água. Fungos causadores de podridão branca da madeira (white-rot fungi) são grandes secretores dessa enzima. Dentre estes encontra-se o *Pycnopus sanguineus* que vem sendo estudado nos seus vários aspectos de atividade enzimática. É necessário, entretanto, pesquisar novas fontes de carbono que possam estimular o aumento da atividade de lacase. Neste sentido, o presente trabalho teve como objetivo testar a atividade de lacase produzida pelo fungo *Pycnopus sanguineus* em meio suplementado com diferentes fontes de carbono, industriais e naturais na fermentação líquida e no estado estacionário.

### METODOLOGIA:

Cepa de *Pycnopus sanguineus* foi coletada na zona rural do município de Manaus. Pequenos fragmentos do carpóforo foram inoculados em meio extrato de malte para posterior obtenção da cultura pura utilizada para determinação enzimática. O meio de crescimento foi composto de 3g de NaNO<sub>3</sub>, 0,5g KPO<sub>4</sub>, 0,5 mg MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0,5mg KCl e 0,01% FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O e 24 mEq./l de NaNO<sub>3</sub>. O meio foi acrescido individualmente de  $\alpha$ -celulose (Sigma-Adrich USA), xilana (Fluka Biochemika, Switzerland), dextrose anidra e serragem de madeira de *Calophyllum brasiliensis* e *Aniba* sp sem extrativos (extração com acetato de etila:etanol:água, 1:1:1). A atividade enzimática de lacase foi determinada conforme metodologia proposta por Szklarz (1989) que consiste na oxidação do substrato enzimático de seringaldazina até a sua forma quinona com leitura da absorbância em espectrofotômetro a 525 nm ( $\epsilon=65.000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ). Todo o teste foi feito em triplicatas.

### RESULTADOS:

A maior atividade de lacase ocorreu no meio suplementado com serragem de madeira de *Aniba* sp, sem extrativos, com uma atividade 77 % maior do que no meio sem esse substrato (controle = 3,80 U.L<sup>-1</sup>). Por outro lado, no meio contendo serragem da madeira de *Calophyllum brasiliensis* sem extrativos, a atividade foi menor (1,53 U.L<sup>-1</sup>) do que a do controle. Considerando que a espécie *Aniba* sp contém células oleíferas no seu tecido xilemático é possível inferir que o fungo utilize-as na síntese da lacase. Estudos específicos, entretanto, são necessários para comprovar tal suposição. O meio suplementado com  $\alpha$ -celulose foi o que apresentou a menor secreção de lacase (1,39 U.L<sup>-1</sup>). O acréscimo de glicose no meio inibiu parcialmente a atividade enzimática confirmando estudos anteriores de que o excesso desses açúcares no meio pode inibir a secreção de lacase. A suplementação do meio com xilana contribuiu para uma secreção 3,6 vezes menor de lacase.

### CONCLUSÃO:

O material lignocelulósico (madeira) com tratamento para retirada dos extrativos, ou ainda sem extração desses químicos, pode contribuir para o aumento da secreção de lacase. É necessário estudos sobre diferentes tipos de madeira que possam contribuir para o aumento da atividade de lacase considerando a quantidade e qualidade dos extrativos que possam estar inibindo ou não a secreção dessa enzima.

Instituição de Fomento: CAPES - Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior; FAPEAM - Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Amazonas

**Palavras-chave:** Enzima Ligninolítica, Fungo Amazônico, Serragem de Madeira.



## SECREÇÃO DE LIGNINA-PEROXIDASE (LiP) E MANGANÊS-PEROXIDASE (MnP) DO FUNGO *Pycnoporus sanguineus* EM FERMENTAÇÃO ESTACIONÁRIA

Elaine Pires Soares<sup>1</sup>  
 Solange Pires de Araujo<sup>2</sup>  
 Marcia Jaqueline Mendonca Maciel<sup>1</sup>  
 Adriana da Silva Nunes<sup>1</sup>  
 Helena Camarao<sup>1</sup>  
 Ademir Castro e Silva<sup>1</sup>

1. Universidade do Estado do Amazonas  
 2. Universidade Federal do Amazonas

### INTRODUÇÃO:

Os fungos de podridão branca degradam a lignina mais rápida e extensivamente do que outros grupos de microrganismos e são os únicos grupos de organismos capazes de degradar completamente a lignina para dióxido de carbono e água (Eriksson *et al.*, 1990). As enzimas responsáveis pela degradação da lignina são principalmente lignina-peroxidase (LiP), manganês-peroxidase (MnP) e lacase. O potencial dessas enzimas ligninolíticas na indústria e biotecnologia tem estimulado pesquisas sobre sua atividade em fungos (Vikineswary *et al.*, 2006; Songulashvili *et al.*, 2007). A LiP e a MnP apresentam potencial uso na indústria alimentícia, indústria de celulose e papel, na indústria têxtil, na bioremediação e para síntese orgânica. (Lamascolo *et al.*, 1999; Barbosa *et al.* 2008; Sigoillot *et al.*, 2005; Maijala *et al.*, 2007; Robles-Hernandez *et al.*, 2008; Champagne & Ramsay, 2005; Wen *et al.*, 2009; Iwahara *et al.* 2000). No setor médico e farmacêutico a LiP vem sendo pesquisada para uso em cremes para redução de pigmentação da pele (Belinky *et al.*, 2005). Considerando o potencial dessas peroxidases para aplicação industrial, o presente trabalho objetiva avaliar a atividade enzimática da LiP e MnP secretadas por *Pycnoporus sanguineus* em meio suplementados com diferentes fontes de carbono.

### METODOLOGIA:

Cepa de *Pycnoporus sanguineus* foi coletada na zona rural do município de Manaus. Pequenos fragmentos do carpóforo foram inoculados em meio extrato de malte para posterior obtenção da cultura pura utilizada para determinação enzimática. O meio de crescimento foi composto de 3g de NaNO<sub>3</sub>, 0,5 g KPO<sub>4</sub>, 0,5 mg MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O; 0,5g KCl e 0,01 FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 24 mEq./l de NaNO<sub>3</sub>. O meio foi acrescido individualmente de  $\alpha$ -celulose Sigma-Adrich (USA), xilana (Fluka Biochemika, Switzerland), dextrose anidra e serragem de madeira de *Calophyllum brasiliensis* e *Aniba sp* com e sem extrativos (extração com acetato de etila:etanol:água, 1:1:1). A atividade enzimática foi determinada conforme metodologia proposta por Tien & Kirk (1984) com leitura da absorbância em espectrofotômetro a 460 nm ( $\epsilon = 29.400 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ). Todo o teste foi feito em triplicatas.

### RESULTADOS:

No meio acrescido de glicose a atividade de LiP (46,08 U.L<sup>-1</sup>) foi 2,7 vezes menor do que o controle (125,6 U.L<sup>-1</sup>) (sem acréscimo dessa fonte de carbono). O meio com  $\alpha$ -celulose aumentou em 65% a atividade de LiP. Nos meios com lignocelulósico (serragem de madeira) sem tratamento químico para a retirada dos "extrativos", LiP foi ligeiramente maior em comparação com aquele onde ocorreu a extração desse material. Podemos inferir que alguns desses compostos podem estar contribuindo para a síntese dessa enzima. De modo geral, todos os suplementadores contribuíram para o aumento da secreção de MnP. A menor atividade de MnP (0,83 U.L<sup>-1</sup>) ocorreu no meio acrescido de glicose embora tenha sido maior (0,38 U.L<sup>-1</sup>) do que no controle (sem essa fonte de carbono). A maior atividade ocorreu no meio acrescido com serragem de madeira de *Aniba sp* sem extração dos extrativos (14,67 U.L<sup>-1</sup>), sendo 38 vezes maior em comparação com controle (sem adição dessa fonte de carbono). Atividade de MnP em meio de cultura contendo serragem de madeira de *Calophyllum brasiliensis* com a extração dos extrativos (13,16 U.L<sup>-1</sup>) foi 4,6 maior do que sem extrativos (2,86 U.L<sup>-1</sup>). Aparentemente, o efeito sinérgico de alguns extrativos pode contribuir para o aumento da atividade de MnP.

### CONCLUSÃO:

O acréscimo de  $\alpha$ -celulose no meio czapek-Dox contribui com aumento de 65,5% na secreção de lignina-peroxidase (LiP). A serragem da madeira de *Calophyllum brasiliensis*, sem extrativos, acrescida ao meio czapek-Dox aumentou em 360% a secreção de manganês-peroxidase (MnP), ao contrario da serragem de *Aniba sp.*, com a presença de extrativos, que aumentou a secreção dessa enzima em 3.760%. O meio de crescimento acrescidos de xilana, serragem de *Calophyllum brasiliensis*- com extrativo, serragem de *Calophyllum brasiliensis*- sem extrativos, serragem de *Aniba sp.* - com extrativos e *Aniba sp.* sem extrativo aumentaram a secreção de lignina-peroxidase (LiP) em 7,5%, 50,5%, 23,7%, 20,4% e 18,4% respectivamente.

Instituição de Fomento: CAPES, FAPEAM, UEA.

**Palavras-chave:** peroxidases, fungo amazônico, madeira.



## CRESCIMENTO DE DIFERENTES CEPAS DE *Pycnoporus sanguineus* EM “CHORUME” OBTIDO NO LIXÃO MUNICIPAL DE PARINTINS

**Autores:** NUNES, A.S., TAVARES, B.P., SOUZA, P.L., SOARES, E.P., CASTRO E SILVA, A.

1. Universidade do Estado do Amazonas. 2. Centro de Estudos Superiores de Parintins/AM

**Introdução:** O chorume é um resíduo líquido de elevada carga orgânica e forte coloração, produzida pela decomposição química e microbiológica dos resíduos sólidos depositados em um aterro. De maneira geral, o chorume pode ser considerado como uma matriz de extrema complexidade, composta por quatro frações principais: matéria orgânica dissolvida, compostos orgânicos xenobióticos, macrocomponentes inorgânicos e metais potencialmente tóxicos. Por sua vez, pesquisas vêm sendo realizadas para tratamento enzimático desse tipo de resíduo utilizando-se fungos que produzem enzimas oxidativas capazes de quebrar compostos recalcitrantes em moléculas menores diminuindo a toxicidade da substância em teste. Considerando a grande diversidade fungica da região amazônica, e o pouco que se conhece objetivou-se avaliar a produção de biomassa fúngica por três diferentes cepas de *Pycnoporus sanguineus* em chorume do lixão de Parintins. **Material e métodos:** Carpóforos do fungo *Pycnoporus sanguineus* foram coletados em três diferentes áreas no município de Parintins/AM, codificados em cepa 1, cepa 2 e cepa 3. Foram cultivados em meio BDA. Para produção de biomassa foi utilizado meio contendo água estéril e chorume em concentração 0,5%. A produção de massa micelial foi avaliada pelo crescimento em meio líquido em condição estacionária, em intervalos de 13, 14, e 15 dias, utilizando-se o método de filtragem alíquota em papel filtro para quantificação da biomassa produzida. **Resultados e discussão:** As linhagens testadas apresentaram crescimento utilizando o chorume como fonte de carbono. Em valores absolutos a maior produção de biomassa ocorreu para CEPA 1 (11,45%) no 13º dia de crescimento seguida das cepas 2 e 3. Ressalta-se que essa cepa 1 apresentou uma rápida pigmentação. O crescimento em chorume dessas linhagens mostra que as mesmas possuem atividade enzimática capaz de quebrar compostos presentes no chorume. Teste ANOVA ao nível de 95% de probabilidade mostrou que estatisticamente não existe diferença no crescimento entre as linhagens de *P. sanguineus* testadas. **Conclusão:** *P. sanguineus* apresenta potencial para degradação dos compostos presentes no chorume. Faz-se necessário o estudo enzimático para identificar quais possíveis enzimas poderiam estar atuando nessa atividade.

**Palavras-chave:** Biomassa, Chorume, Enzimas oxidativas, Região Amazônica, *Pycnoporus sanguineus*



## CRESCIMENTO *IN VITRO* DE FUNGOS AMAZÔNICOS EM RESÍDUO DE “CHORUME”

**Autores:** TAVARES, B. P, SOUZA, P.L., NUNES, A.S., SOARES, E.P., CASTRO E SILVA.

1. Universidade do Estado do Amazonas. 2. Centro de Estudos Superiores de arintins/AM

**Introdução:** O predomínio dos lixões a céu aberto é dos grandes problemas ambientais contemporâneos. Originados a partir da liberação de resíduos sólidos do lixo urbano. Quando biodeteriorados forma o chorume, um líquido percolado de cor escura, classificado como um resíduo sólido da classe I, potencialmente tóxico, e possuir uma alta carga de compostos recalcitrantes. Fungos de podridão branca têm se mostrado eficazes na degradação desses compostos, pois possuem um potencial enzimático diversificado. A região amazônica possui um potencial fúngico pouco explorado de suas enzimas para aplicação industrial e ambiental. Neste sentido, o objetivo desta pesquisa foi avaliar o crescimento de fungos basidiomicetos como potenciais degradadores do chorume obtido do lixão a céu aberto do município de Parintins. **Material e métodos :** O crescimento foi avaliado em teste de placa de Petri. Foram utilizados quatro linhagens de fungos basidiomicetos FI-03, FV-12, FBL e *Pycnoporus sanguineus*. Os fungos foram incubados em meio BDA (M1) acrescido das seguintes concentrações de chorume coletado no lixão a céu aberto no município de Parintins: 20 µ/L, 100 µ/L, 1000 µ/L e 10000 µ/L. O mesmo tratamento foi realizado em meio somente de ágar (M2) acrescido das diferentes concentrações de chorume. Foram incubados em estufa BDO em temperatura de 30°C e seu crescimento mensurado a cada 24 horas durante 7 dias. **Resultados e discussão:** O crescimento dos fungos em meio BDA(M1) acrescido de diferentes concentrações de chorume foi maior do que no meio Agar (M2) tendo chorume como única fonte de carbono. Neste último meio (M2), entretanto, a linhagem FV-6 mostrou maior crescimento (0,6cm) na concentração de 10<sup>4</sup> µg.L<sup>-1</sup> de chorume como única fonte de carbono seguida da linhagem FBL para todas as concentrações, exceção para concentração de 20 µg.L<sup>-1</sup>. O crescimento da linhagem FV-6 em meio BDA suplementado com chorume (M1) foi menor e lento iniciando após três dias de incubação, enquanto que para FBL após 24 horas. No meio (M1), o *P. sanguineus* apresentou o melhor crescimento em todas as concentrações testadas. **Conclusão:** Todas as linhagens testadas apresentaram-se promissoras para degradar compostos do chorume. As linhagens FV-6 e FBL são as mais promissoras para degradar compostos de chorume *in natura*.

**Palavras-chave:** crescimento, fungos basidiomicetos, chorume, degradação.



## DESCOLORAÇÃO DO CORANTE “METILORANGE” POR FUNGOS AMAZÔNICOS

**Autores:** SOUZA, P. L., GONÇALVES, M. S., SOUZA, E.G., SOARES, E. P., NUNES, A. S., CASTRO E SILVA, A.

1. Universidade do Estado do Amazonas. 2. Centro de Estudos Superiores de Parintins/AM.

**Introdução:** Uma grande quantidade de corantes químicos é largamente utilizada em atividades industriais como indústria têxtil, fotográfica, de bebidas e outras, que geram grandes quantidades de resíduos tóxicos que afetam significativamente o equilíbrio ambiental. Esses efluentes contêm compostos de alto peso molecular, como metais pesados que apresentam enorme poder de resistência aos tratamentos convencionais. Estudos têm mostrado que fungos de podridão branca têm se destacado como eficientes degradadores desses compostos, por possuírem um complexo enzimático capaz de tolerar altas concentrações de poluentes tóxicos. A Amazônia possui um enorme potencial fúngico, porém em sua maioria ainda permanece desconhecido. Dessa forma objetivou-se selecionar fungos coletados na Região do Baixo Amazonas como potenciais descolorizadores do corante metilorange. **Material e métodos :** Foram utilizados nove linhagens de fungos provenientes do laboratório de microbiologia do CESP-UEA: *Pycnoporus sanguineos*, FV-6, FV-12, FI-2, FI-3, FI-9, FBL, CV-29 e CV-35. Três fragmentos de cerca de 5mm de diâmetro de cada fungo foram acrescidos em solução do corante metilorange, na concentração de 0,01% em 100 ml de água estéril, em balão de fundo chato de 250 mL, incubadas a 30°C, durante 27 dias. Foram feitas análises qualitativas (visuais) diárias para verificar a ação dos fungos no processo de descoloração do corante e avaliado a produção de biomassa através método de filtragem de alíquota em papel filtro. **Resultados e discussão:** Todos os fungos mostraram crescimento no meio testado. As linhagens FI-3 e FV-6 mostraram coloração escurecida do meio 5 horas após incubação, enquanto que as linhagens FI-9 e CV-29 após 6 dias de crescimento. Ressalta-se, entretanto, que FI-9 após o sétimo dia apresentou clareamento do meio. As linhagens FI-2, FBL, CV-35, *Pycnoporus sanguineos* e FV-12 apresentaram clareamento em um período de 9 dias. A linhagem FV-12 continuou clareando em relação ao controle. A maior produção de biomassa ocorreu para a linhagem FV-29 (4,7%) seguida de FV-6 (1,31%), e FI-2 (1,29%). As menores produção de biomassa (< 1%) foram obtidas pelas outras linhagens testadas sendo que FBL e FV-12 apresentaram uma baixa produção de biomassa de 0,27% e 0,26% respectivamente. **Conclusão:** Os fungos testados apresentaram uma relação positiva em relação à descoloração do corante “metilorange” indicando estarem utilizando o corante como fonte de alimento com destaque para a linhagem CV-29. Urge, entretanto, continuar estudos no sentido de verificar se a biomassa produzida está ou não adsorvendo o corante.

**Palavras-chave:** Metilorange, Fungos da Amazônia, Degradação, Corantes.



## INFLUÊNCIA DA AUTOCLAVAGEM DA GLICOSE NO CRESCIMENTO DE FUNGOS AMAZÔNICOS

**Autores:** SILVA, A.V., DIAS, R.A., SILVA, M.A., SOARES, E.P., NUNES, A.S., CASTRO E SILVA, A.

1. Universidade do Estado do Amazonas. 2. Centro de Estudos Superiores de Arintins/AM.

**Introdução :** Os requisitos nutricionais para o crescimento de fungos são caracterizados por fontes de carbono e minerais. Dentre as fontes de carbono a glicose é uma das mais utilizadas. A autoclavagem do meio suplementado com glicose faz com que a alta temperatura quebre as cadeias longas desses açúcares formando monossacarídeos de cadeias pequenas e subprodutos, que podem ser responsáveis pelo escurecimento do meio (Reação de Minard). Alguns fungos podem utilizar ou não esses produtos como requisito nutricional para seu crescimento. Não existem informações sobre o uso do produto da glicose da reação em alta temperatura em fungos amazônicos. Portanto, este trabalho objetiva verificar se o meio com glicose autoclavada ou não influencia no crescimento de cinco fungos amazônicos. **Material e métodos:** Para os testes utilizaram-se cinco fungos provenientes do Laboratório de Microbiologia do CESP – UEA, *Pycnoporus sanguineos*, FV-6, FV-12, FI0-3 e FBL. Para o cultivo dos fungos, utilizou-se 500 mL de meio BDA, com 7,5 g de glicose para cada tratamento. No primeiro a glicose foi autoclavada juntamente com o meio, no segundo a glicose foi adicionada após a autoclavagem do meio. O crescimento da fronteira micelial foi mensurado a cada 24hrs durante 10 dias, em temperatura de 30° C. Todos os tratamentos foram realizados em duplicatas. **Resultados e discussão:** A glicose em alta temperatura propicia a formação de monossacarídeos e possivelmente outros produtos oriundos da síntese de transformação que ocorre em condições de alta temperatura. Estes produtos dão a cor escura ao meio. Alguns fungos utilizam esses açúcares de cadeias menores para acelerar o seu crescimento. A cepa FI-3, por exemplo, possivelmente utilizou os monossacarídeos para este fim. Para o crescimento nos dois tratamentos ( meio com glicose não autoclavada e autoclavada), não houve diferença dentre as cepas com exceção da cepa FI-3, onde apresentou maior crescimento no meio onde a glicose foi autoclavada (2,29 cm). Em termos absolutos a cepa FV-12 foi a que apresentou maior crescimento médio no meio suplementado com glicose não autoclavada. O menor crescimento, onde a glicose não foi autoclavada aconteceu para o fungo *Pycnoporus sanguineos*. Nos tratamentos com meio com glicose autoclavada, não houve diferença de crescimento entre as cepas ao nível de 99% de probabilidade. Por outro lado, no meio com glicose não autoclavada a cepa FV-12 foi que apresentou maior crescimento entre os tratamentos (2,74 cm). **Conclusão :** De modo geral, no meio com glicose autoclavada o crescimento em termos absolutos é maior, embora essa diferença não seja significativa ao nível de 95% de probabilidade. Exceção para a cepa FV-12 onde o crescimento com glicose não autoclavada foi maior.

**Palavras-chave:** Glicose, Crescimento, Fungos, Fonte de carbono.



## CRESCIMENTO MICELIAL DE FUNGOS AMAZÔNICOS EM DIFERENTES FAIXAS DE pH EM MEIO SUPLEMENTADO COM FARINHA DA CASCA DE TUCUMÃ (*Astrocaryum aculeatum* MEYER)

Mariane dos Santos Gonçalves<sup>1</sup>  
 Adriana da Silva Nunes<sup>1</sup>  
 Naím Farias de Castro<sup>1</sup>  
 Ademir Castro e Silva<sup>1</sup>  
 Elaine Pires Soares<sup>1</sup>

1. Dep.Ciências Biológicas - Universidade do Estado do Amazonas - UEA
2. Mestranda em Biotecnologia e Recursos Naturais - Universidade do Estado do Amazonas - UEA
3. Prof. Msc./Orientadora - Universidade do Estado do Amazonas - UEA
4. Prof. Dr./ Co-orientador - Universidade do Estado do Amazonas - UEA
5. Mestranda em Biotecnologia e Recursos Naturais - Universidade do Estado do Amazonas - UEA

### INTRODUÇÃO:

Os fungos tem, comparativamente, uma ampla faixa de pH sobre a qual podem crescer e o pH ótimo para a maioria dos fungos está no lado ácido da escala, abaixo do pH 7. Qualquer curva de pH – crescimento é o sumário de todos os efeitos do pH sobre inúmeros fatores que controlam o crescimento e não representa um efeito unitário. Fungos invariavelmente alteram o pH do meio onde crescem. Por outro lado, os fungos necessitam de alguns elementos nutricionais que são essenciais para seu crescimento onde encontram-se os macro-elementos (carbono, nitrogênio, hidrogênio, oxigênio, enxofre, etc.) os quais são requisitados em grande quantidade pelos fungos e podem ser fatores determinantes no rendimento e na produção de biomassa, onde esta, por sua vez, pode ser empregada na biosorção de metais pesados. Poucos trabalhos nesse sentido são realizados com fungos da região do Baixo Amazonas, portanto, o objetivo dessa pesquisa foi avaliar o crescimento micelial de fungos amazônicos da classe dos basidiomicetos em meio de cultura alternativo a base de farinha da casca de tucumã na concentração 0,5% em diferentes faixas de pH.

### METODOLOGIA:

Carpóforos de fungos Basidiomicetos foram coletados no perímetro rural do município de Parintins/AM, codificados em FV-12, FV-06, FI-09, FI-03 e *Pycnoporus sanguineus*. Para obtenção de cultura pura, pequenos fragmentos dos carpóforos foram crescidos em meio de cultura BDA. Para os testes de crescimento linear utilizou-se a farinha da casca do tucumã (*Astrocaryum aculeatum* Meyer) previamente seca e esterilizada na concentração 0,5% e nas faixas de pH 4, 6, 8, 10 e 12. A medição do crescimento foi realizada a cada 24 horas por um período de cinco dias ou até o preenchimento total da placa, à temperatura de 30° C. Todos os tratamentos foram realizados em duplicata.

### RESULTADOS:

Em dados absolutos o maior crescimento micelial na concentração 0,5% na faixa de pH 4 ocorreu para o fungo *Pycnoporus sanguineus* com 2,5 cm. Na faixa de pH 6 novamente *Pycnoporus sanguineus* obteve o maior crescimento (2,5 cm) seguido dos fungos FV-12 e FI-03 (2,28 cm). Já na faixa de pH 8 o melhores crescimentos ocorreram para as linhagens FV-12 e FI-03 com 2,2 cm. Nas faixas 10 e 12 em meio acrescido com farinha da casca de tucumã *Pycnoporus sanguineus* apresentou o melhor crescimento com 2,15 cm e 2,25 cm respectivamente. O crescimento micelial dos fungos testados em meio suplementado com a farinha da casca de tucumã na concentração 0,5% não mostrou diferença estatística entre os tratamentos ao nível de 5% de significância ( $p < 0,05$ ).

### CONCLUSÃO:

O crescimento micelial dos fungos testados em meio suplementado com farinha da casca de tucumã (*Astrocaryum aculeatum* Meyer) na concentração 0,5% nas faixas de pH 4, 6, 8, 10 e 12 apresentou relação positiva e resultados promissores, uma vez que os fungos basidiomicetos amazônicos testados apresentaram crescimento nas faixas de pH 4, 10 e 12 contrariando dados da literatura que indica as faixas entre 5 e 7 como pontos ótimos para crescimento.

**Palavras-chave:** pH, Meio de cultura alternativo, Fungos amazônicos.



## SECREÇÃO DE LACASE POR CONSÓRCIO DE FUNGOS AMAZONICOS.

**Autores:** SOARES, E.P, MUNIZ, V.A, NUNES, A.S, SILVA, A.V, SOUZA, P.L, GALÚCIO, V.A, KATAKI, R.M, CASTRO E SILVA.

1.Universidade do Estado do Amazonas. 2. Centro de Estudos Superiores de Parintins/AM.

### Resumo

**Introdução:** A utilização de organismos fúngicos em bioprocessos envolvendo descontaminação ambiental vem crescendo nos últimos tempos, no que se refere à utilização de sistemas enzimáticos, devido às vantagens de sua utilização. Devido à sua baixa especificidade por substratos e seu potencial para utilização em aplicações biotecnológicas, as lacases fúngicas têm sido objeto de investigação. Lacases são enzimas envolvidas na degradação de lignina e têm a capacidade de catalisar a oxidação de fenóis e outros compostos aromáticos. Neste contexto, surge a biodiversidade fúngica amazônica inexplorada com potencial para a degradação de plásticos sintéticos. Este trabalho visa avaliar a atividade enzimática de lacase por consórcio de fungos amazônicos em meio de cultivo contendo farinha da casca de tucumã (*Astrocaryum aculeatum Meyer*) no processo de biodegradação do polietileno tereftalato (PET). **Material e métodos:** Foram utilizadas consórcio de três estirpes fúngicas da classe dos Basidiomicetos: *Pycnoporus sanguineus*, FV12, FBL. O meio de cultivo foi composto de 20g farinha da casca de tucumã e 500ml de água destilada. Amostras do PET foram submetidas à temperatura de 35°C, em estufa durante 72 horas e como controle foram utilizadas partículas de polímeros sem tratamento físico. Erlenmeyers de 125 ml receberam 50ml do meio, 5 amostras dos polímeros, os fungos em estudo e incubados à 30° C. A determinação de lacase - Lac foi avaliada através de filtrados de enzima bruta obtido em fermentação submersa e condição estacionária durante 30 dias, sendo centrifugado a 1.400 rpm, durante 5 minutos e utilizado o sobrenadante para a leitura em espectrofotômetro. O método baseia-se na oxidação do substrato enzimático de seringaldazine para sua forma de quinona com absorção à 525 nm ( $\epsilon=65000M^{-1} cm^{-1}$ ). **Resultado e discussão:** O consórcio dos fungos Pyc+FBL+FV12 nos testes PET +28°C foi o que apresentou maior produção de Lac (10,2 U.L<sup>-1</sup>). No entanto, esse consórcio de fungos em teste PET 35°C apresentou uma atividade de Lac 10 vezes menor. Pode-se ressaltar que ocorreu uma correlação positiva para os tratamentos com o consórcio Pyc+FBL+FV12 entre a maior atividade de Lac (10,2 U.L<sup>-1</sup>) e para a perda de massa do PET (14,4%) no ensaio PET+28°C. No entanto, a maior perda de massa ocorreu com o consórcio Pyc+FBL (28,7%) e (19,7%) nos teste PET +28°C e 35°C respectivamente, porém no que diz respeito a atividade de Lac com os referidos consórcio nestes tratamentos, os mesmos não apresentaram resultados significativos, sendo 0,1 U.L<sup>-1</sup> e 3,3 U.L<sup>-1</sup> respectivamente. **Conclusão:** De modo geral ocorre a atividade de lacase -Lac no meio testado, no entanto, destaca-se o consórcio dos fungos Pyc+FBL+FV12 que apresentou maior produção de Lac e perda de massa significativa do polímero no teste PET +28°C.



## DETERMINAÇÃO ENZIMÁTICA DE FUNGOS AMAZONICOS MEIO ACRESCIDO COM FARINHA DE TUCUMÃ (*Astrocaryum aculeatum Meyer*)

**Autores:** SOARES, E.P; SILVA, A.V; NUNES, A.S; ARAUJO, S.P; DIAS, R.A; TAVARES, B.P; SOUZA, E.A; MELO, J.L; CASTRO E SILVA,

1.Universidade do Estado do Amazonas. 2. Centro de Estudos Superiores de Parintins/AM.

### Resumo

**INTRODUÇÃO:** Com o avanço dos estudos na área biotecnológica os organismos fúngicos, principalmente a produção de enzimas tornaram-se de grande interesse e vêm contribuindo com produtos e processos de importância industrial. Apesar do seu papel nos ecossistemas e suas aplicações na biotecnologia, o conhecimento sobre os fungos amazônicos ainda permanece num nível incipiente, sendo que poucos dados na área sobre enzimas com o potencial industrial são disponíveis. O presente trabalho visa avaliar a atividade de enzimas oxidativas em meios de cultivo utilizando resíduo agroindustrial de baixo custo, como fonte de carbono no processo de degradação do politereftalato de etileno. **MATERIAL E METODOS:** Foram utilizadas três amostras de fungos Basidiomicetos: *Pycnoporus sanguineus*, FV12, FBL e o consórcio entre os mesmos. O meio de cultivo foi composto de 20g farinha da casca de tucumã e 500 ml de água destilada. Erlenmeyers de 125 ml receberam 50ml do meio, 5 amostras dos polímeros, os fungos em estudo e incubados à 30° C. Amostras do PET foram submetidas à temperatura de 35°C, em estufa, durante 72 horas e como controle foram utilizados partículas de polímeros sem tratamento físico. A determinação enzimática foi avaliada através de filtrados de enzima bruta obtido em fermentação submersa e condição estacionária durante 30 dias. Para atividade de lacase e peroxidase, utilizou-se a metodologia de SZKLARZ *et.al.* 1989, para a atividade de LiP utilizou-se o método proposto por Tien-Kirk (1984) e a atividade de MnP foi baseada na metodologia de GLEN *et.al.*, (1986); AITKEN & IRVINE, (1990). **RESULTADO E DISCUSSÃO:** A atividade de Lac mostrou-se de modo geral, maior para o ensaio PET +28°C. O consórcio dos fungos Pyc+FBL+FV12 foi o que apresentou maior produção de Lac (10,2 U.L<sup>-1</sup>). Por outro lado esse consórcio de fungos em teste PET 35°C apresentou uma atividade de Lac 10 vezes menor. Nos ensaios individuais o fungo FBL apresentou maior produção de Lac (6,5 U.L<sup>-1</sup>) no teste PET +28°C. No entanto, o Pyc. sanguineus no teste PET 35°C apresentou menor atividade de Lac (0,05 U.L<sup>-1</sup>). Em média a atividade de LiP foi 56,2 e 55,2 U.L<sup>-1</sup> para o teste PET +28°C e PET 35°C respectivamente, enquanto que a MnP foi 61,8 e 61,3 U.L<sup>-1</sup> nos mesmos testes respectivamente. A atividade de peroxidase foi maior no teste PET +28°C para o consórcio Pyc+FBL+FV12 (8,4 U.L<sup>-1</sup>), enquanto que o Pyc+FBL foi onde ocorreu a menor atividade dessa enzima (0,05 U.L<sup>-1</sup>). **CONCLUSÃO:** De modo geral ocorre a atividade das enzimas oxidativas no meio testado. Pesquisas continuam a fim de verificar testes com "consórcios" de fungos que apresentaram os melhores resultados de atividade enzimática, com destaque para o consórcio Pyc+FBL+FV12.



## SECREÇÃO DE LIGNINA PEROXIDASE (LiP) E MANGANÊS PEROXIDASE (MnP) POR FUNGOS AMAZONICOS COM POTENCIAL PARA DEGRADAR POLIETILENO TEREFALATO.

**Autores:** SOARES, E.P; ANDRADE, F.S; NUNES, A.S; SILVA, A.V, SANTOS, I.C.C; VALENTE, P.M.R; GALÚCIO, V.A; CASTRO E SILVA.

1.Universidade do Estado do Amazonas. 2. Centro de Estudos Superiores de Parintins/AM.

### Resumo

**Introdução:** Os fungos envolvidos na degradação das ligninas secretam diferentes enzimas extracelulares que catalisam reações que levam a degradação do polímero. As mais importantes são as ligninas peroxidases (LiP), manganês peroxidase (MnP) e a lacase. Desta forma, surge o potencial fúngico ainda inexplorado da região do Baixo Amazonas, como alternativa para a degradação do polietileno tereftalato (PET). Essa região, sem ação antrópica mais contundente guarda ainda espécies fúngicas com potencial enzimático capaz de participar em vários processos industriais. Urge, portanto, a necessidade de prospecção dessa biodiversidade na busca de microorganismos capazes de produzir enzimas específicas com potencial para uso em aplicações biotecnológicas, em particular na degradação do PET. **Material e métodos:** Foram utilizadas três linhagens fúngicas da classe dos Basidiomicetos: *Pycnoporus sanguineus*, FV12, FBL e o consórcio entre os mesmos. Para a realização dos testes de degradação do polímero foi utilizado meio contendo 20g farinha da casca de tucumã (*Astrocaryum aculeatum* Meyer) e 500ml de água destilada. Amostras de PET foram preparadas previamente (corte 1x1cm, peso e assepsia) e submetidas à temperatura de 35°C, em estufa durante 72 horas e como controle foram utilizados partículas de polímeros sem tratamento físico. Erlenmeyers de 125 ml receberam 50ml do meio previamente autoclavado, 5 amostras dos polímeros e os microrganismos em estudo, e incubados à 30° C. A determinação enzimática foi avaliada através de filtrados de enzima bruta obtido em fermentação submersa estacionária durante 30 dias. Para a atividade de LiP utilizou-se o método proposto por Tien-Kirk (1984) e a atividade de MnP foi baseada na metodologia de GLEN *et al.*, (1986); AITKEN & IRVINE, (1990). **Resultado e discussão:** Após 30 dias de fermentação submersa a atividade de LiP e MnP não apresentaram diferença estatística a nível de 5% de significância no teste de ANOVA entre os ensaios PET +28°C e PET 35°C. Em média a atividade de LiP foi 56,2 U.L<sup>-1</sup> para o controle e 55,2 U.L<sup>-1</sup> para o tratamento, enquanto que a MnP foi 61,8 U.L<sup>-1</sup> para o ensaio PET +28°C e 61,3 U.L<sup>-1</sup> para os ensaios PET 35°, tanto em testes individuais com em consórcios de fungos. Quanto aos testes para verificação de perda de massa do polímero o consórcio Pyc+FBL foi o que apresentou maior perda (28,7%), enquanto que a atividade de LiP com este consórcio, verificou-se que a maior atividade ocorreu com o tratamento (57,1 U.L<sup>-1</sup>) e para a atividade de MnP o melhor resultado foi para o tratamento com a linhagem FBL (64,1 U.L<sup>-1</sup>). **Conclusão:** Nos bioensaios realizados com as linhagens fungicas amazônicas verificou-se que todas apresentaram potencial para a produção de enzimas lignases, LiP e MnP no meio composto de farinha de tucumã, independente da perda de massa do polímero.



## EFEITO DO pH NO CRESCIMENTO *IN VITRO* DE FUNGOS AMAZONICOS EM MEIO SUPLEMENTADO COM CHORUME

**Autores:** NUNES, A. S, SOUZA, E.A, SOUZA, P.L , SOARES, E.P, CORDEIRO, M.S.C , SILVA, A.V , GALÚCIO, V.A , CASTRO E SILVA, A.

1.Universidade do Estado do Amazonas. 2. Centro de Estudos Superiores de Parintins/AM.

### Resumo

**Introdução:** O pH exerce grande influência sobre o metabolismo de fungos, que pode num meio afetar o crescimento direta ou indiretamente. Ainda que o pH mais favorável ao desenvolvimento dos fungos esteja entre 5, 6 e 7, a maioria dos fungos tolera amplas variações de pH. Uma das características que podem sofrer variação é a pigmentação que pode diversas vezes estar relacionada com o pH do substrato, pois o microorganismo se adapta ao ambiente respondendo com mecanismos de natureza química ou física. Outro efeito é sobre a permeabilidade da célula, a qual é alterada com diferentes graus de acidez ou alcalinidade. Pouco se conhece sobre o efeito do pH no crescimento de fungos da região amazônica e sua fisiologia, menos ainda quando submetidos a alto grau de estresse nutricional, como por exemplo com a presença de chorume, líquido resultante da decomposição de resíduos sólidos. Nesse contexto, o objetivo dessa pesquisa foi avaliar os efeitos do pH no crescimento *in vitro* de fungos amazônicos em meio de cultivo acrescido com chorume em fermentação semi-sólida. **Material e métodos:** Foram utilizadas duas linhagens de fungos basidiomicetos coletadas na região de Parintins/AM, codificados em FI-03 e FV-12. Para o meio de cultivo foi utilizado chorume coletado do lixão municipal de Parintins/AM, previamente autoclavado e oxigenado por 2 horas e posteriormente centrifugado a 2000 rpm por 10 min. O crescimento fúngico foi avaliado em teste de placa Petri, contendo apenas Agar e chorume nas concentrações: 0,5, 1,0, 2,0 e 2,5% nas faixas de pH 3, 5, 7, 9 e 11. Os tratamentos foram incubados em estufa BOD a 30°C e o crescimento mensurado a cada 24 horas durante cinco dias. **Resultados e discussão:** Em valores absolutos os maiores crescimentos radiais em ordem decrescente ocorreram para o fungo FV-12 na concentração 2,5% em pH 5 (1,58cm), seguido do fungo FI-03 na concentração 0,5% em pH 9 (1,45cm), por conseguinte FV-12 concentração 0,5% em pH 11 (1,40cm) e 1,35 cm para o fungo FI-03 na concentração 1% em pH 7. Portanto, os fungos testados suportaram condições de estresse nutricional em variadas faixas de pH, apontando que cada fungo tem suas exigências específicas. Não houve diferença estatística entre os crescimentos nas faixas de pH e concentrações testadas. **Conclusão:** Portanto, o pH e a acidez do meio podem ser fatores determinantes no crescimento radial e em nos demais comportamentos fisiológicos dos fungos amazônicos testados.



## PRODUÇÃO DE BIOMASSA POR FUNGOS AMAZONICOS UTILIZANDO CHORUME COMO FONTE DE CARBONO

Autores: SOUZA, P. L, NUNES, A.S, **SOARES, E.P**, VALENTE, P.M.R, SILVA, A.V, GALÚCIO, V.A, CASTRO E SILVA, A, KATAK, R.M.

1.Universidade do Estado do Amazonas. 2. Centro de Estudos Superiores de Parintins/AM.

### Resumo

**Introdução:** O lixo urbano é um dos problemas ambientais mais preocupantes da atualidade, por sua produção acelerada e seu descarte na maioria das vezes indiscriminado em locais inapropriados causando impactos negativos ao meio ambiente e a população, pela presença do chorume, líquido percolado de alta toxicidade e odor desagradável gerado a partir da biodeterioração da matéria orgânica. Pesquisas recentes utilizando fungos de podridão branca evidenciam a versatilidade destes microorganismos em biodeteriorar a matéria orgânica e até inorgânica, apresentando-se como potenciais degradadores deste líquido rico em metais potencialmente tóxicos. A exploração da atividade dos microrganismos é a principal estratégia utilizada em tratamento biológico para recuperação de ambientes poluídos e a Amazônia mostra-se como um enorme laboratório capaz de fornecer fungos capazes de degradar chorume. Portanto, o presente projeto visou avaliar fungos amazônicos com potencial para produção de biomassa em meio acrescido de diferentes concentrações de chorume. **Material e métodos:** Carpóforos de fungos basidiomicetos foram coletados na região de Parintins/Am, codificados em FV-12, FI-02 e *Pycnoporus sanguineus*. Para produção de biomassa fúngica foi utilizado meio contendo água estéril e chorume (total 150 mL) nas concentrações 1%, 2% e 4% em erlenmeyer de 250 mL coletado no lixão de Parintins, previamente esterilizado a 121°C, centrifugado e oxigenado. A produção de massa micelial foi avaliada pelo crescimento em meio líquido em condição estacionária, em período de 60 dias à 30°C, utilizando-se o método de filtragem alíquota em papel filtro para quantificação em porcentagem da biomassa produzida. **Resultados e discussão:** Em valores absolutos a maior produção de biomassa fúngica em meio acrescido de chorume ocorreu para a linhagem de *Pycnoporus sanguineus* na concentração 2% (2,27%), seguida da linhagem FI-02 na concentração 1% (2,04%) e de *Pycnoporus sanguineus* na concentração 4% (1,86%). A menor produção foi da linhagem FV-12 na concentração 1% (0,70%). No teste de ANOVA ao nível de 5% não houve diferença estatística entre os tratamentos. **Conclusão:** Todas as linhagens fúngicas amazônicas testadas apresentaram crescimento positivo em meio contendo apenas chorume in natura como fonte de carbono. Com destaque para o fungo *Pycnoporus sanguineus*, possível degradador de compostos recalcitrantes do chorume.



## **PRODUÇÃO DE BIOMASSA POR FUNGOS AMAZÔNICOS NO PROCESSO DE DEGRADAÇÃO DO POLITEREFTALATO DE ETILENO EM MEIO SUPLEMENTADO COM FARINHA DE TUCUMÃ (*Astrocaryum aculeatum Meyer*).**

**Autores:** SILVA, A.V, SOARES, E.P, NUNES, A.S, TAVARES, B.P, DIAS, R.A, SOUZA, E.A, SOUZA, E.G, SILVA, M.A, CASTRO E SILVA, A.

1. Universidade do Estado do Amazonas. 2. Centro de Estudos Superiores de Parintins/AM.

**Introdução:** Pesquisas científicas estão sendo realizadas utilizando a biomassa fúngica na biodegradação de plásticos, biorremediação de solos e efluentes contaminados por metais de difícil degradação. Ressalta-se, que a produção de biomassa micelial pode estar estreitamente relacionada com os requisitos nutricionais de cada fungo, conhecimento este que pode contribuir para o melhoramento da produção. Considerando o potencial fúngico inexplorado da região amazônica, este trabalho tem como objetivo verificar a produção de biomassa por fungos basidiomicetos em meio acrescido com farinha da casca de tucumã (*Astrocaryum aculeatum Meyer*) no processo de degradação do polietileno tereftalato (PET).

**Metodologia:** Foram utilizadas três amostras de fungos da classe dos Basidiomicetos coletados em Parintins/AM, *Pycnoporus sanguineus*, FV12, FBL e o consórcio entre os mesmos. Para a realização dos testes de degradação do polímero foi utilizado meio contendo 20g farinha da casca de tucumã e 500ml de água destilada. Amostras do polímero PET foram preparadas previamente (corte 1x1cm, peso e assepsia) e submetidas à temperatura de 35°C, em estufa durante 72 horas e como controle foram utilizados partículas de polímeros sem tratamento físico, temperatura de + 28°C. Erlenmeyers de 125 ml receberam 50ml do meio previamente autoclavado, 5 amostras dos polímeros e os microrganismos em estudo. A produção de massa micelial foi avaliada pelo crescimento em fermentação submersa, condição estacionária durante 30 dias e incubados à 30° C, utilizando o método de filtragem alíquota em papel filtro.

**Resultados e discussão:** O fungo FBL apresentou a maior produção de biomassa (28,4%) no teste com PET temperatura de + 28°C. Por outro lado no teste PET 35°C a maior produção de biomassa ocorreu para o consórcio Pyc.+FBL+FV12 (25,1%). De modo geral os tratamentos com consórcios apresentaram maior produção de biomassa no teste PET 35°, sendo 15,5% e 10,8% para Pyc+FBL e Pyc+FV12 respectivamente. Pode-se enfatizar que houve correlação positiva para o consórcio Pyc+FBL+FV12 no tratamento PET + 28°C entre a degradação do PET (14,4%) e a produção de biomassa (12,8%). Nos tratamentos individuais PET 35°C o *Pyc. sanguineus* e FV12 apresentaram maior produção de biomassa, exceção para o fungo FBL que neste tratamento apresentou produção de biomassa 1,7 vezes maior em relação ao teste PET + 28°C. Neste tratamento também houve correlação positiva para o fungo *Pyc. sanguineus* entre a degradação do PET (15,2%) e a produção de biomassa (14,8%). Para a produção de biomassa em meio acrescido com a farinha de tucumã o teste de ANOVA a 5% de significância não apresentou diferenças estatística.

**Conclusão:** O meio acrescido com a farinha da casca do tucumã como fonte de carbono apresentou relação positiva com a produção de biomassa fúngica e degradação de PET pelos três fungos amazônicos testados.



## SECREÇÃO DE LACASE POR FUNGOS AMAZÔNICOS UTILIZANDO MEIO ACRESCIDO COM CHORUME IN NATURA

**Autores:** NUNES, A.S, SOUZA, P.L , CASTRO E SILVA, A , SOARES, E.P , VALENTE, P.M.R, SANTOS, I.C.C, MELO, J.L.

1.Universidade do Estado do Amazonas. 2. Centro de Estudos Superiores de Parintins/AM.

### Resumo

Microorganismos como fungos e bactérias têm tomado destaque nos últimos anos, no que diz respeito à recuperação ou minimização de áreas contaminadas por metais potencialmente tóxicos. Pesquisas recentes mostram que enzimas oxidativas produzidas por fungos basidiomicetos de decomposição branca estão envolvidas na degradação e mineralização de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, herbicidas, corantes azo, polifenóis entre outros. Podendo representar uma alternativa viável na degradação de compostos recalcitrantes presentes no chorume, devido ao seu complexo e diversificado potencial enzimático. Os fungos da região amazônica são em sua magnitude desconhecidos em relação à sua vasta região territorial e riquezas naturais apresentando-se como potenciais deterioradores de substâncias potencialmente tóxicas, como o chorume. Portanto, o objetivo desta pesquisa foi avaliar a atividade da enzima Lacase produzida por fungos da Amazônia em meio acrescido de chorume proveniente do lixão municipal de Parintins/Am. Linhagens de fungos basidiomicetos codificados em: FV-12, FI-02 e *Pycnoporus sanguineus* foram utilizadas nos tratamentos enzimáticos em meio acrescido das concentrações 1%, 2% e 4% de chorume. As culturas foram incubadas em BOD à 30° C durante 60 dias e sua determinação enzimática realizada em espectrofotômetro. O controle foi realizado com a ausência de chorume. A mistura reacional foi composta de 50 µL da amostra filtrada; 0,95 mL tampão tartarato de sódio pH 4,5; 0,1mL seringaldazina e 0,1mL de água destilada, sendo monitorado o aumento da absorbância em 525 nm durante 60 segundos, utilizando-se o coeficiente de extinção  $\epsilon = 6,5 \times 10^4 \text{ cm}^1 \cdot \text{M}^1$ . De modo geral a enzima lacase foi produzida tanto no controle quanto nos tratamentos com chorume. A linhagem FV-12 apresentou no controle 1.14 U/L<sup>-1</sup>, paralelamente na concentração 2% apresentou 1.70 U/L<sup>-1</sup>, seguida da concentração 1% com 1,20 U/L<sup>-1</sup> e 1,14 U/L<sup>-1</sup> na concentração 4%. Para as demais linhagens a atividade não foi significativa. Ao nível de 95% de probabilidade não houve diferença na atividade enzimática entre as três linhagens testadas. Todos os fungos testados apresentaram potencial para produção de lacase em estado de fermentação líquida nas concentrações 1%, 2% e 4% de chorume, com destaque para a linhagem FV-12.



## AVALIAÇÃO DE ENZIMAS OXIDATIVAS PRODUZIDAS POR FUNGOS AMAZÔNICOS EM BIORREATOR DE COLUNA UTILIZANDO RESÍDUO AGRO-INDUSTRIAL

**Autores:** TAVARES, B. P; NUNES, A.S; **SOARES, E.P;** CASTRO E SILVA, A; SOUZA, E.A; TRINDADE, D.B; DIAS, R.A; MELO, J.L; VALENTE, P.M.R.

1. Universidade do Estado do Amazonas. 2. Centro de Estudos Superiores de Parintins/AM.

### Resumo

**Introdução:** Da decomposição da matéria orgânica e inorgânica resulta o chorume, líquido viscoso, de odor forte e desagradável, que apresenta em sua composição metais potencialmente tóxicos e compostos recalcitrantes danosos ao homem e ao ecossistema como um todo. Podendo atingir lençóis freáticos, rios e córregos, levando a contaminação destes recursos hídricos. Nesse contexto, tratamentos biológicos utilizando enzimas fúngicas têm apresentado êxito na degradação ou mineralização de compostos de elevada massa molecular. No que diz respeito a região amazônica pouco ou quase nenhum estudo nessa área tem sido realizado com os fungos dessa região, que possivelmente apresentam potencial para aplicações em biorremediação ambiental. Portanto o objetivo dessa pesquisa foi avaliar um fungo amazônico e seu potencial para degradação do chorume obtido do lixo a céu aberto do município de Parintins/AM em sistema de biorreator de coluna acrescido de resíduo agro-industrial. **Material e métodos:** O experimento ocorreu em colunas de 20x4cm, utilizando uma linhagem de fungo Basidiomiceto, codificado em FI-03. Fragmentos foram incubados em colunas contendo 20g do resíduo agroindustrial (cana-de-açúcar ou casca de tucumã). O sistema foi suplementado com 20ml de chorume previamente autoclavado, centrifugado e oxigenado. As colunas foram mantidas a 30°C e oxigenadas a cada 12 horas por um período de 100 dias. A leitura enzimática foi realizada em espectrofotômetro sendo monitorado o aumento da absorbância em 525 nm durante 60 segundos para Lacase, 270 nm para Mn-Peroxidase e 310 nm para Li-Peroxidase. **Resultados e discussão:** O resíduo da casca de tucumã apresentou uma perda de massa de 37,75% e o bagaço cana-de-açúcar 22,75%. Na análise da atividade enzimática, Li-P nos resíduos da casca de tucumã e bagaço de cana-de-açúcar apresentou atividade de 52,80 U/L<sup>-1</sup> e 30,22 U/L<sup>-1</sup> respectivamente, seguida da atividade de Mn-Peroxidase em casca de tucumã com 11,11 U/L<sup>-1</sup> e bagaço de cana-de-açúcar 9,80 U/L<sup>-1</sup>. Já a atividade de Lacase foi registrada em 0,185 U/L<sup>-1</sup> no resíduo da casca do tucumã e em 0,492 U/L<sup>-1</sup> no bagaço de cana-de-açúcar. **Conclusão:** O fungo amazônico apresentou potencial para produção de enzimas oxidativas (L.Peroxidase, M. Peroxidase e Lacase) nos dois resíduos agroindustriais testados, podendo atuar em processos de biorremediação ambiental como a degradação de compostos recalcitrantes do chorume.



## **CRESCIMENTO DE FUNGOS AMAZÔNICOS EM DIFERENTES FAIXAS DE pH EM MEIO DE CULTIVO SUPLEMENTADO COM *Dioecorea trifida* L.F**

**Autores:** GALUCIO, V.C.A.; SOUZA, E.A.; NUNES, A.S; SILVA, N.P.; SOARES, E.P.; SILVA, M.A.; DIAS, R.A.; CASTRO E SILVA, A.

1. Centro de Estudos em Energia, Ambiente e Biodiversidade-CEAB. 2. Universidade do Estado do Amazonas-UEA. 2. Centro de Estudos Superiores de Parintins/AM-CESP.

### **Resumo**

**Introdução:** Os fungos tem, comparativamente, uma ampla faixa de pH sobre a qual podem crescer e o pH ótimo para a maioria dos fungos está no lado ácido da escala, abaixo do pH 7. Qualquer curva de pH – crescimento é o sumário de todos os efeitos do pH sobre inúmeros fatores que controlam o crescimento e não representa um efeito unitário. Fungos invariavelmente alteram o pH do meio onde crescem. Por outro lado, os fungos necessitam de alguns elementos nutricionais que são essenciais para seu crescimento onde encontram-se os macro-elementos (carbono, nitrogênio, hidrogênio, oxigênio, enxofre, etc.) os quais são requisitados em grande quantidade pelos fungos e podem ser fatores determinantes no rendimento e na produção de biomassa, onde esta pode ser empregada na biosorção de metais pesados. Poucos trabalhos nesse sentido são realizados com fungos da região do Médio Amazonas, portanto, o objetivo dessa pesquisa foi avaliar o crescimento micelial de sete fungos amazônicos em meio regional de cará (*Dioecorea trifida* L.F) em diferentes faixas de pH. **Materiais e métodos:** Sete linhagens de fungos basidiomicetos FBL, FI-3, CV-50, FV-12, FV-6 FI-2 e *Pycnoporus sanguineos* foram cultivados em meio regional de cará (*Dioecorea trifida* L.F) em placa de Petri. Foi realizado o ajuste do pH com NaOH para as faixas 6, 8, 10 e 12. As linhagens foram incubadas a 30°C e mensuradas através da progressão linear da fronteira micelial a cada 24 horas durante 8 dias. **Resultados e discussão:** As sete linhagens de fungos toleraram variações de pH. As linhagens testadas FV-6, FI-3, CV-50 e FV-12 apresentaram crescimento nas faixas 6, 8, 10 e 12, porém os fungos *Pycnoporus sanguineos*, FBL e FI-2 não apresentaram crescimento na faixa de pH 12. As maiores médias de produção foram de *P.sanguineos* nas faixas de pH 6 (2,31 cm) e pH 8 (2,30cm), seguido de FV-12 em pH 10 (2,10cm). Ao nível de 95% de probabilidade não houve diferença no crescimento entre os fungos testados nas diferentes faixas de pH. **Conclusão:** Fungos basidiomicetos ocorrentes na região amazônica, toleram variações de pH, podendo também se desenvolver em faixa de pH 8, 10 e 12, em oposição ao relatado em bibliografias, onde esta classe de fungos cresce entre pH 5.5 a 7. Faz-se necessário estudos com quantidades maiores de fungos para conhecer os diferentes comportamentos dos fungos amazônicos.



## CRESCIMENTO MICELIAL E DESCOLORAÇÃO DO CORANTE ALARANJADO DE METILA POR FUNGOS DA AMAZÔNIA.

**Autores:** SOUZA, E.G; NUNES, A.S; GALUCIO, V.C.A; SOARES, E.P; VALENTE, P.M.R; TRINDADE, D.B; CASTRO E SILVA.

1. Universidade do Estado do Amazonas. 2. Centro de Estudos Superiores de Parintins/AM.

### Resumo

**Introdução:** Os processos industriais de tingimento de tecidos e a obtenção da celulose são atividades que produzem uma grande quantidade de resíduos sólidos, líquidos e gasosos, extremamente daninhos ao meio ambiente por conterem metais potencialmente tóxicos como cloroligninas e clorofenóis. Por apresentarem enorme habilidade para oxidar especificamente compostos fenólicos, por meio de seus diversificados sistemas enzimáticos os fungos de podridão branca vêm sendo cada vez mais utilizados para biorremediação dos ecossistemas em geral através da degradação de compostos recalcitrantes. O grande potencial fúngico existente na região amazônica vem estimulando cada vez mais o aprofundamento e as novas descobertas da biotecnologia que se faz necessário devido o vasto campo de atuação desses organismos. Dessa maneira o objetivo desta pesquisa foi avaliar o crescimento micelial de fungos amazônicos e seu potencial de descoloração do corante metilorange em estado de fermentação semi-sólida. **Metodologia:** Foram utilizadas seis linhagens de fungos: *Pycnopus sanguineus*, FV-12, FI-2, FI-3, FV-6, FI-9, FI-11, CV-29 e FBL. O meio de cultivo foi composto de 500 mL de água destilada estéril, 7,5 g de ágar e corante metilorange na concentração de 0,0002%. Fragmentos fúngicos de 5 mm de diâmetro foram inoculados no centro da placa de Petri e incubados a 30°C no escuro. A avaliação do crescimento foi realizada através da progressão da fronteira micelial a cada 24 horas por um período de 15 dias. **Resultados e discussão:** Em valores absolutos o maior crescimento ocorreu para a linhagem FI-3 (3,76cm) seguido de *P. sanguineus* (3,52cm), FI-2 (3,50cm) e FI-11 (2,77cm) respectivamente. Os menores crescimentos foram das linhagens FV-6 (2,24cm) e CV-29 (2,28cm). As linhagens FI-02, FI-03, FBL e *Pycnopus sanguineus* apresentaram descoloração total em um período de 5 dias em estado de fermentação semi-sólida, seguidas das linhagem FI-11 em um período de 12 dias e o FV-12 em 13 dias. De acordo com teste ANOVA ao nível de 95% de probabilidade não houve diferença estatística entre os tratamentos. **Conclusão:** Das nove linhagens de fungos testadas seis apresentaram potencial para aplicação em bioprocessos de remoção de cor de efluentes têxteis em baixas concentrações ou no tratamento de outros resíduos sólidos coloridos, Porém, ainda existe a necessidade de um amplo conhecimento tecnológico para o aproveitamento desses organismos e suas estruturas.



## CONSORCIO DE FUNGOS AMAZONICOS PARA A PRODUÇÃO DE BIOSURFACTANTES.

**Autores:** SILVA, A.V; SOARES, E.P; NUNES, A.S; ARAUJO S.P; VALENTE, P.M.R; GALUCIO, V.A; SOUZA, E.A; MELO, J.L; CASTRO E SILVA, A.

1. Universidade do Estado do Amazonas. 2. Centro de Estudos Superiores de Parintins/AM.

### Resumo

**Introdução:** Atualmente, a grande maioria dos surfactantes disponíveis é sintetizada a partir de derivados do petróleo, entretanto, as novas legislações de proteção ao meio ambiente, bem como, a preocupação ambiental entre os consumidores tem elevado a procura por surfactantes naturais como alternativa aos produtos existentes. As vantagens dos biosurfactantes quando comparados aos quimicamente sintéticos reside na biodegradabilidade, baixa toxicidade, biocompatibilidade, digestibilidade e produção econômica aceitável, tornando os biosurfactantes adequados para várias aplicações industriais. Neste sentido, a região do Baixo Amazonas apresenta-se como um grande laboratório, com uma biodiversidade fúngica em sua magnitude ainda inexplorada que apresenta possibilidades de aplicações nos mais diversos setores industriais. Portanto, o presente resumo visa avaliar a produção de biosurfactante por fungos amazônicos com a utilização de polímeros sintéticos em meio suplementado com resíduo agroindustrial. **Material e métodos:** Para os ensaios foram utilizados consórcio de três fungos Basidiomicetos: *Pycnoporus sanguineus*, FV12, FBL, os quais foram incubados em meio de cultivo contendo 20g farinha da casca de tucumã (*Astrocaryum aculeatum Meyer*) e 500ml de água destilada. Amostras do polietileno tereftalato PET foram submetidas à temperatura de 35°C, em estufa durante 72 horas e como controle foram utilizadas partículas de polímeros sem tratamento físico. Erlenmeyers de 125 ml receberam 50ml do meio, 5 amostras dos polímeros e os fungos em estudo, e incubados à 30° C. As atividades de emulsificação foram determinadas através de agitação vigorosa em agitador magnético de tubos de 3,5 ml de caldo de cultura previamente filtrado em lâ de vidro e 2,0 ml de hidrocarboneto de tolueno. Após 1 hora, a densidade óptica da emulsão óleo em água foi medida em espectrofotômetro a 610 nm. Após 24 horas, as emulsões água em óleo foram expressas em centímetros relativos à altura do halo e compactação máxima das bolhas formadas. **Resultado e discussão:** De modo geral, todos os fungos mostraram-se capazes de produzir biosurfactantes após 30 dias de fermentação submersa estacionária. A maior atividade de emulsificação ocorreu com o consórcio Pyc+FBL (Abs:0,802) para o ensaio PET +28°C. Em média a atividade de emulsificação com os consórcios foi 0,33 e 0,12 de absorvância para o teste PET +28°C e PET 35°C respectivamente. A maior formação do halo ocorreu com o consórcio dos fungos Pyc+FBL+FV12 (PET +28°C) e para Pyc+FBL (PET 35°C) com 3 cm respectivamente. **Conclusão:** A presença de biosurfactantes no meio de cultura composto por farinha de tucumã pode estar favorecendo a utilização dos substratos plásticos como fonte de energia para os microorganismos, tornando os polímeros mais acessíveis ao processo de degradação.



## AVALIAÇÃO DE FUNGOS AMAZONICOS COM POTENCIAL PARA DEGRADAÇÃO DO POLIETILENO TEREFTALATO – PET

**Autores:** SOARES, E.P; SILVA, A.V; NUNES, A.S; SOUZA, P.L; ARAUJO, S.P; VALENTE, P.M.R; MELO, J.L; CASTRO E SILVA.

1. Universidade do Estado do Amazonas. 2. Centro de Estudos Superiores de Parintins/AM.

### Resumo

**Introdução:** Pesquisas comprovam a eficácia da utilização de microorganismos para degradar embalagens plásticas, ou pelo menos parte delas, em especial o polietileno tereftalato que apresenta-se como um dos principais causadores de impactos ambientais. Sendo de grande importância o estudo das condições ótimas de crescimento dos microorganismos aliado à combinação de outros fatores físico-químicos que podem auxiliar ou maximizar o processo de degradação (temperatura, pH, luz UV, entre outros). Portanto, este trabalho tem como objetivo avaliar fungos amazônicos com potencial para degradar polietileno tereftalato (PET). **Metodologia:** Três amostras de fungos Basidiomicetos coletados em Parintins/AM: *Pyc. sanguineus*, FV12, FBL e o consórcio entre os mesmos foram utilizados para os testes de degradação do polímero em meio contendo 20g farinha da casca de tucumã (*Astrocaryum aculeatum Meyer*) e 500ml de água destilada. As amostras do polímero PET foram preparadas previamente (corte 1x1cm, peso e assepsia) e submetidos à temperatura de 35°C, durante 72 horas e como controle foram utilizados partículas de polímeros sem tratamento físico. Erlenmeyers de 125 ml receberam 50ml do meio, 5 amostras dos polímeros e os microrganismos em estudo, e após autoclavados foram incubados à 30° C. A degradação do PET foi avaliada em fermentação submersa estacionária durante 30 dias. Após o período de incubação, a determinação da perda de massa dos polímeros foi baseada na metodologia ASTM D5247-92 (1992) que consiste na análise da diferença do peso final menos o peso inicial. **Resultados:** Em termos absolutos o maior percentual de perda de peso no tratamento com PET (+28°C) ocorreu para o consórcio Pyc+FBL (28,7%). No tratamento individual o maior percentual ocorreu para *Pyc. sanguineus* (11,4%) e o menor para FV12 (0,40%). Nos testes com PET 35°C o consórcio Pyc+FBL também apresentou o maior percentual de perda de massa (19,7%), porém, 45,6% menor do que no teste PET +28°C. Neste tratamento ocorreu um aumento na perda de massa para todos os ensaios individuais sendo 33%, 41% e 420% para *Pyc. sanguineus*, FBL e FV12 respectivamente. Por outro lado, o consórcio no tratamento PET 35°C apresentou um menor percentual de perda de massa para Pyc+FBL+FV12 e PYC+FBL, 58,1% e 45,7% respectivamente. Exceção para o consórcio de fungos Pyc+FV12 onde a perda de massa foi 3,9 vezes maior no tratamento PET 35°C. **Conclusão:** Todos os fungos amazônicos testados apresentaram potencial para degradar o polietileno tereftalato, sendo que os testes “consórcios” com PET sem tratamento físico apresentou maior perda de massa do polímero. De uma forma geral, o meio composto da farinha de tucumã possivelmente influenciou o processo de degradação do PET, visto que apresenta requisitos nutricionais para o crescimento fúngico.



## CRESCIMENTO LINEAR DE FUNGOS DE DECOMPOSIÇÃO BRANCA EM MEIO ACRESCIDO DE CHORUME

**Autores:** NUNES, A.S.; SOARES, E.P.; SOUZA, P.L.; SANTOS, I.C.; TAVARES, B.P.; MELO, J.L.; GALÚCIO, V.A.; CASTRO E SILVA.

1. Universidade do Estado do Amazonas. 2. Centro de Estudos Superiores de Parintins/AM.

### Resumo

**Introdução:** O lixão é uma forma inadequada de disposição final de resíduos sólidos, acarretando vários problemas ambientais, gerados pela simples descarga do lixo sobre o solo, sem medidas de proteção ao meio ambiente ou à saúde pública. Da decomposição química e microbiológica dos resíduos sólidos depositados em um lixão forma-se o chorume - líquido de elevada carga orgânica e forte coloração que se torna extremamente poluente, sendo potencial contaminante de lençóis freáticos e corpos d'água, comprometendo a saúde da população. Portanto, pesquisas vêm sendo realizadas no sentido de amenizar os impactos ambientais causados por esse descarte indiscriminado. Neste contexto os fungos produtores de enzimas oxidativas tomam destaque, uma vez que estes microorganismos possuem um “pool” enzimático diversificado capaz de degradar compostos recalcitrantes presentes no chorume. Neste sentido o objetivo desta pesquisa foi avaliar o crescimento linear de fungos amazônicos em meio contendo chorume como principal fonte de carbono. **Material e métodos:** Foram utilizados cinco fungos da classe dos basidiomicetos codificados em FI-02, FV-12, FI-03, FBL e *Pycnoporus sanguineus* coletados na zona rural do município de Parintins/Am. Para obtenção da cultura pura fragmentos dos carpóforos foram inoculados em meio BDA. O chorume utilizado foi coletado no lixão municipal de Parintins/AM, em seguida autoclavado, oxigenado por 2 horas e posteriormente centrifugado a 2000 rpm por 10 min. O crescimento fúngico foi avaliado em teste de placa Petri, contendo apenas Agar e chorume nas concentrações: 1%, 1,5% e 2%. Os tratamentos foram incubados em estufa BOD à 30°C e seu crescimento mensurado a cada 24 horas durante cinco dias. **Resultados e discussão:** As linhagens testadas apresentaram correlação positiva quanto ao crescimento em meio contendo chorume nas concentrações 1%, 1,5% e 2%, sua principal fonte de carbono. Em valores absolutos os maiores crescimentos foram para as linhagens FI-02 na concentração 2% (2,22 cm), seguida de FI-02 na concentração 1% (2,16 cm) e FV-12 na concentração 2% (2,14 cm) respectivamente. Paralelamente os menores desempenhos ocorreram para *Pycnoporus sanguineus* na concentração 1,5% (1,15 cm) e *Pycnoporus sanguineus* em concentração 1% (1,10 cm). Não houve diferença estatística entre os tratamentos. **Conclusão:** As cinco linhagens fúngicas amazônicas testados apresentaram relação positiva com o crescimento radial em meio de cultivo acrescido de chorume como principal fonte de carbono.



**26º Congresso Brasileiro de Microbiologia**  
de 2 a 6 de outubro de 2011  
Rafain Palace Hotel e Convention Center  
Foz do Iguaçu - Paraná

II Encontro Nacional de Professores de Microbiologia - ENAPROM  
International Society for Microbial Ecology - Latin America ISME Symposium 2011  
Simpósio Internacional de Bactérias Láticas

## ESPÉCIE AMAZÔNICA COM POTENCIAL FUNGICIDA FRENTE A FUNGO FITOPATÓGENO QUE ATACA HORTALIÇAS NO MUNICÍPIO DE PARINTINS-AM

**Autores:** VALENTE, P.M.R; **SOARES,E.P**; NUNES,A.S; ARAUJO,S.P; GALUCIO,V.A; ROCHA,E.M; SCUDELLER,V.V; CASTRO E SILVA,A; MELO,J.L.

1.Universidade do Estado do Amazonas. 2. Centro de Estudos Superiores de Parintins/AM.

### Resumo

**Introdução:** Nas últimas décadas vem se utilizando alternativas menos agressivas de controle de pragas agrícolas garantindo o controle de doenças e a sustentabilidade da atividade agrícola. O fungo *Fusarium* sp causa grande prejuízo as culturas de hortaliças e respectivamente a outros espécies agrícolas causando prejuízo econômico. No município de Parintins-Am, produtores de hortaliças sofrem o ataque desses fitopatógenos, comprometendo sua produção e deixando em risco a saúde da população. A diversidade de espécies vegetais na Amazônia torna importante a investigação de novas moléculas químicas capazes de serem utilizadas como controle biológico amenizando a agressão ao meio ambiente. O *Caryocar villosum* é uma espécie bastante encontrada na Amazônia Central, sendo conhecida regionalmente como piquiá. As folhas, casca da árvore e polpa do fruto são ricas fontes de taninos. Estas substâncias contribuem para a defesa das plantas contra o ataque de insetos e tem sido relacionada com inibição do crescimento de microrganismos. O estudo teve como objetivo desenvolver pesquisa em torno da planta Amazônica com potencial fungicida, capaz de realizar controle biológico, e tornando menos agressivo ao meio ambiente. **Material e método:** O trabalho utilizou folhas coletadas de uma população de piquiá (*Caryocar villosum*(Aubl)/Pers),coletada no município de Parintins no Estado do Amazonas. As amostras das folhas foram pesadas e secas em estufa a 30°C,em seguida moídas. Na realização dos testes com o extrato do *C. villosum*,o extrato bruto das folhas foi obtido através do método de extração à quente.As amostras dos patógenos foram obtidas de folhas apresentando sintomas de fusariose em plantas comerciais.Os patógenos foram cultivados em placa de petri em meio de cultura BDA (batata-dextrose-agar). A atividade antifúngica das concentrações do extrato foliar foi avaliada através da inibição do crescimento miceliano do patógeno. Utilizou-se o extrato foliar da espécie vegetal nas concentrações de 1, 10, 100 e 1000 µg/mL-1. A avaliação do efeito das diferentes concentrações do extrato foliar sobre o crescimento miceliano foi realizada quando o crescimento da testemunha cobriu totalmente a superfície do meio de cultura. **Resultados e Discussão:** Constatou-se que o extrato de *C.villosum* nas concentrações 10,100 e 1000 µg/mL-1 testadas inibiram em 100% a germinação dos esporos de *Fusarium* sp. Sete dias após a avaliação verificou-se que os esporos permaneceram sem germinar, não ocorrendo, conseqüentemente, o crescimento micelial do fungo e, comprovando-se, portanto, o efeito fungicida do extrato foliar. Na concentração 1µg/mL-1 não houve crescimento micelial, constatando que a concentração é baixa para inibição do patógeno. **Conclusão:** O extrato bruto foliar obtido do *Caryocar villosum* apresenta potencial fungicida.



## ISOLAMENTO DACTÉRIAS PROVENIENTES DO CHORUME DA LIXEIRA PUBLICA DE PARINTINS-AM E AVALIAÇÃO DA PRESENÇA DE COLIFORMES

**Autores:** ANDRADE, F.S; GALUCIO, V.C.A; SANTOS, I.C.C;  
BITTENCOURT, V.S; MUNIZ, V.A; NUNES, A.S; **SOARES, E.P;** SILVA, A.  
MOREIRA; PROCOPIO, A.R.L.

1. Universidade do Estado do Amazonas. 2. Centro de Estudos Superiores de Parintins/AM.

### Resumo

**Introdução:** Parintins é a segunda maior cidade do estado do Amazonas, localizada na maior Bacia hidrográfica do mundo, é circundada pelo Rio Amazonas formando uma ilha com diversos lagos. Nestas mediações está localizada a lixeira pública, onde é depositado todo o resíduo doméstico e industrial gerado pela cidade. Com uma grande produção de chorume, um líquido resultante da degradação de resíduos sólidos urbanos, sendo que a percolação deste líquido em lixões sem impermeabilização do solo pode provocar poluição das águas subterrâneas e superficiais, e consequente alteração da fauna, flora e microbiota. **Material e métodos:** As amostras de chorume foram coletadas no período de vazante e de enchente dos rios, em quatro diferentes pontos do entorno da lixeira. Foram retirados 50 ml de cada poça e transportados para o laboratório de Biologia da UEA/Parintins-AM. Para avaliar a presença de coliformes, distribuiu-se 10 mL de cada amostra em tubos de ensaio com 10 mL de meio contendo caldo lactosado com púrpura bromocresol, e incubou-se por 24 horas em BOD a  $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ . Como controle positivo foi utilizado o meio TSB acrescido de 10  $\mu\text{l}$  de cultura de *E. coli* ATCC 25922. Para o isolamento de bactérias foi semeado com alça drigalski 100  $\mu\text{L}$  de cada amostra com diferentes diluições em placas de Petri contendo meio de cultivo TSB e NA e incubadas em BOD a  $30^{\circ}\text{C}$  por 24h. Após o crescimento, fez-se a purificação das colônias por esgotamento com estrias cruzadas. As bactérias purificadas foram preservadas em meio de cultivo TSB líquido suplementado com glicerol a 15%, e estocadas a  $-20^{\circ}\text{C}$ . **Resultados e discussão:** Após o período de incubação avaliou-se a produção de gás pela presença de bolhas no meio de cultivo e a mudança de coloração do mesmo pela produção de ácido. Características de crescimento de bactérias do grupo coliformes, observado em todas as amostras coletadas nos diferentes períodos. A presença de *E. coli* foi confirmada pela observação crescimento de colônias com brilho verde metálico após o plaqueamento em meio EMB, sendo positiva em 14 das 24 amostras avaliadas. Destas amostras também foram isoladas 96 diferentes colônias de bactérias, indicando a diversidade bacteriana do chorume. Estas bactérias foram depositadas na coleção de culturas do programa de Mestrado em Biotecnologia da UEA. **Conclusão:** chorume é um líquido tóxico, podendo ser um veículo de transmissão de doenças, pela presença de uma diversidade de microrganismos patogênicos ou não, os resultados mostram a potencialidade de ocorrência de doenças disentericas pela indicação da presença de *Escherichia coli*. Além de ser uma fonte de microrganismos com potencial biotecnológico a ser explorado.



## APROVEITAMENTO DE RESÍDUO AGROINDUSTRIAL DA AMAZÔNIA COMO FONTE DE CARBONO PARA FUNGOS DETERIORADORES DE MADEIRA

**AUTORES:** NUNES, A.S (UEA) ; GONÇALVES, M.S (UEA) ; SOUZA, E.G (UEA) ; SOARES, E.P (UEA) ; CASTRO, N.F (UEA) ; CASTRO E SILVA (UEA)

**RESUMO:** O objetivo desta pesquisa foi testar a farinha da casca do tucumã (*Astrocaryum aculeatum* Meyer) no crescimento de fungos deterioradores de madeira em diferentes concentrações e faixas de pH. Para os testes de crescimento utilizou-se a farinha da casca de tucumã como suplemento nas concentrações 1% e 2% e ajustado o pH inicial para 4, 6, 8, 10, 12. Os fungos estudados foram coletados na zona rural de Parintins/AM e codificados em: FV-12, FV-6, FI-9, FI-3 e *Pycnoporus sanguineus*. O crescimento foi mensurado através da progressão linear da fronteira micelial. A concentração ótima para o crescimento dos fungos testados apresentou-se em 1% de farinha da casca de tucumã. Referente ao pH a faixa ótima para o crescimento dos fungos testados ocorreu entre 4 e 6.

**PALAVRAS CHAVES:** casca de tucumã, fungos amazônicos, crescimento

**introdução:** O tucumã (*Astrocaryum aculeatum* Meyer), também conhecido como tucumã-do-amazonas ou tucumã-açu, é uma palmeira de crescimento monopodial, arborescente e monóica (CAVALCANTE, 1991). Seus frutos são ricos em vitamina A, ácidos graxos saturados e glicérides trissaturados, podendo substituir o dendê e o babaçu na indústria de óleos (VILLACHICA et al. 1996). No Amazonas, especialmente em Manaus, esse produto agrícola tem significativo valor financeiro, representando uma atividade econômica crescente. Porém, apenas a polpa do tucumã é utilizada, gerando grandes quantidades de resíduos da casca, que é desperdiçada sem nenhum aproveitamento. Nos últimos anos tem ocorrido um interesse maior na utilização eficiente de resíduos agroindústrias (PANDEY et al., 1999; ROSALES et al., 2002). Muitos bioprocessos têm sido desenvolvidos baseados nesses materiais como substratos em bioprocessos para produção de enzimas isoladas, ácidos orgânicos, etanol, cogumelos comestíveis, enzimas e metabólitos secundários biologicamente importantes (PANDEY et al., 1999; MASSADEH et al., 2001; LAUFENBERG et al., 2003). Neste sentido, as enzimas de fungos tem se mostrado úteis na degradação numa variedade de persistentes poluentes ambientais. Muitas dessas enzimas são extracelulares e, na natureza, provavelmente estão envolvidas na degradação da madeira (MAYER & STAPLES, 2002). O desenvolvimento da capacidade lignolítica requer condições nutricionais e culturais, incluindo substrato metabolizável, níveis elevados de oxigênio, um limite de nitrogênio e várias outras condições de cultivo (KIRK & FARREL., 1987; BUSWELL, 1991). Neste contexto, o objetivo desta pesquisa foi testar a farinha da casca do tucumã no crescimento de fungos deterioradores de madeira em diferentes concentrações e faixas de pH. **Material e métodos:** Para os testes de crescimento linear utilizou-se a farinha da casca de tucumã (*Astrocaryum aculeatum* Meyer) previamente seca em estufa a 50°C e esterilizada em autoclave a 1,5 atm. Os meios de cultivo foram preparados com farinha da casca de tucumã nas concentrações 1% e 2%, com o acréscimo de 1g de glicose e 15g de ágar a cada 1000 mL de água destilada. O pH foi ajustado com NaOH ou H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> nas faixas de pH: 4, 6, 8, 10, 12. Os fungos deterioradores de madeira estudados foram coletados na zona rural do município de Parintins/AM, codificados em FV-12, FV-06, FI-09, FI-03 e *Pycnoporus sanguineus*. Para obtenção de cultura pura, pequenos fragmentos dos carpóforos foram crescidos em meio de cultura BDA. Nos bioensaios com a farinha da casca do tucumã a medição do crescimento foi realizada a cada 24 horas por um período de cinco dias. O crescimento foi mensurado através da progressão linear da fronteira micelial, feita com régua milimetrada na base de cada placa de Petri, com medidas tomadas em duas direções perpendiculares. As culturas foram incubadas em estufa BOD à temperatura de 30°C. Todos os tratamentos foram realizados em duplicata. **Resultados e discussão:** Em termos de valores absolutos os melhores desempenhos ocorreram na concentração 1% de farinha da casca de tucumã para todos os fungos testados nas faixas de pH 4, 6, 8, 10, 12. Na concentração 1% de farinha da casca de tucumã o maior crescimento ocorreu para o fungo *Pycnoporus sanguineus* nas faixas de pH 4 (2,5cm), seguida do pH 6 (2,3cm) e pH 12 (2,0cm) respectivamente, seguido dos fungos FI-3 e FV-12 nas faixas de pH 6 (2,28cm), pH 8 (2,22cm) e pH 10 (2,06cm). Os menores crescimentos foram de FV-6 e FI-09 no pH 10 (1,9 cm) e (1,8 cm) respectivamente. Na concentração 2% de farinha da casca de tucumã o maior crescimento foi de FV-6 pH 6 (2,0 cm), seguido de FV-12 pH 12 (1,35 cm). Possivelmente a casca do tucumã contém substâncias macromoleculares que foram utilizadas como fonte de nutrientes, para isto as enzimas hidrolíticas, secretadas pelos fungos, hidrolisaram estas macromoléculas e liberaram, assim, pequenas moléculas solúveis que puderam ser utilizadas para o crescimento destes microorganismos. O teste ANOVA não mostrou diferença estatística entre os tratamentos ao nível de 5% de significância.

**Conclusões:** A concentração ótima para o crescimento dos fungos testados apresentou-se em 1% de farinha da casca de tucumã. Referente ao pH a faixa ótima para o crescimento dos fungos testados ocorreu entre 4 e 6.

**REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICA:** BUSWELL, J.A. Fungal degradation of lignin. In: ARORA, D.K. et

al. Handbook of applied mycology: Soil an plants. New York: Marcel Dekker, vol. 1, p. 425-480, 1991.  
CAVALCANTE, P.B. 1991. Frutas comestíveis da Amazônia. 5.ed. Belém: Edições CEJUP/Museu Paraense Emílio Goeldi. 279pp. (Coleção Adolfo Ducke).

KIRK, T.K.; FARREL, R.L. Enzymatic “combustion”. The microbial degradation of lignin. Annual Review of Microbiology, Palo Alto, v.41, p. 564-505, 1987.

LAUFENBERG, G.; KUNZ, B.; NYZTROEM, M. Transformation of vegetable waste into value added products: (A) The upgrading concept; practical implementation. Bioresource Technology. Essex, v 87, p. 167-198, 2003.

MASSADEH, M. et al. Synergism of cellulose enzymes in mixed culture solid substrat fermentation. Biotechnological Letters, Hull, v. 23, p. 1771-1774, 2001.

MAYER, A.M., STAPLES, R.C. Lacase: new functions for and old enzymes. Phytochemistry, New York, v. 60, p. 551-565, 2002.

PANDEY, A. et al. Solid state fermentation for the production of industrial enzymes. Currente Sciences, Bangalore, v. 77, p. 149-162, 1999.

ROSALES, E.; COUTO, R.; SAROMAN, A. New uses of food waste: application to lacase production by *Trametes hirsute*. Biotechnological Letters, Hull, v. 24, p. 701-704, 2002.

VILLACHICA, H.; CARVALHO, J. E. U.; MÜLLER, C. H.; DÍAZ, S. C. & ALMANZA, M. 1996. Frutales y hortalizas promisorias de la Amazonía. Pp. 264-267. Tratado de Cooperación Amazonica, (TCA-SPT,44), FAO, Lima, Peru. Versão eletrônica.



### CRESCIMENTO RADIAL DE FUNGOS AMAZÔNICOS EM MEIO DE CULTIVO SUPLEMENTADO COM CORANTE AZUL DE METILENO

**AUTORES:** SOUZA, E.G (UEA) ; NUNES, A.S (UEA) ; TRINDADE, D.B (UEA) ; PONTES, M.P. (UEA) ; CASTRO E SILVA, A (UEA) ; SOARES, E.P (UEA)

**RESUMO:** O objetivo desta pesquisa foi selecionar fungos amazônicos com potencial de crescimento e descoloração em meio acrescido com o corante azul de metileno. Foram utilizadas nove linhagens de fungos basidiomicetos: *Pycnoporus sanguineus*, FV-12, FI-2, FI-3, FV-6, FI-9, FI-11, CV-29 e FBL. Os bioensaios ocorreram em placa de Petri na concentração 0,002% do corante. A avaliação foi feita durante 17 dias. As melhores médias de crescimento ocorreram respectivamente para: *P. sanguineus* (3,54cm), FI-2 (2,70 cm), CV-29 (2,47cm) e FV-12 (2,43cm). Quanto à descoloração, *P. sanguineus* e FV-12 apresentaram 100% de descoloração, seguidas de FI-2, FI-11, FBL com 98%, FV-06 e FI-3 com 95%. Portanto, os fungos estudados apresentam potencial para aplicação em processo de biorremediação de áreas contaminadas.

**PALAVRAS CHAVES:** azul de metileno, fungos basidiomicetos, amazônia

**Introdução:** Uma das maiores preocupações enfrentadas hoje no mundo industrial diz respeito aos custos, tratamentos e destino dos efluentes gerados pela aplicação de corantes químicos durante o tingimento e beneficiamento dos derivados industriais, acarretadas pelo fato de tratar-se de compostos recalcitrantes. Devido a preocupação ambiental, vem aumentando o interesse por métodos alternativos, com o uso de microrganismos para biorremediação de áreas contaminadas por metais potencialmente tóxicos (KOTRBA; RUMML, 2000). Nos últimos anos, os fungos da podridão branca (FPB) têm sido aplicados inclusive em estratégias de biorremediação devido a sua capacidade em mineralizar uma grande variedade de compostos altamente tóxicos encontrados no meio ambiente, como hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, corantes azo, herbicidas, entre outros (CLEMENTE, 2002; NEVES, 2002). Por se tratar de uma região rica em microrganismos, a Amazônia tornou-se um referencial em pesquisas para reduzir os gastos, o tempo e as consequências desses contaminantes. Desse modo, o objetivo desta pesquisa foi selecionar fungos amazônicos com potencial de crescimento e descoloração em meio de cultivo acrescido com o corante sintético azul de metileno. **Material e métodos:** Foram utilizadas nove linhagens de fungos basidiomicetos coletados na zona rural do município de Parintins/AM: *Pycnoporus sanguineus*, FV-12, FI-02, FI-03, FV-6, FI-9, FI-11, CV-29 e FBL. Para aquisição da cultura pura fragmentos foram isolados em meio BDA. Para o bioensaio com o corante o meio de cultivo foi composto de 500 mL de água destilada estéril, 7,5 g de ágar, 50mL de ampicilina, 2,5mL de gentamicina e corante azul de metileno na concentração de 0,002%. Fragmentos fúngicos de 5 mm de diâmetro foram inoculados no centro da placa de Petri e incubados a 30°C em estufa BDO no escuro. A avaliação do crescimento foi realizada através da progressão da fronteira micelial a cada 24 horas por um período de 17 dias. Também foram observadas as mudanças na coloração das culturas.

**Resultados e discussão:** Em termos de valores absolutos as melhores médias de crescimento ocorreram respectivamente para as linhagens: *Pycnoporus sanguineus* (3,54cm), FI-02 (2,70 cm), CV-29 (2,47cm), FV-12 (2,43cm) e FI-03 (2,26cm). Por outro lado as menores médias foram registradas para as linhagens FI-11 (2,12cm) e FV-06 (1,95cm). No que diz respeito à descoloração do corante, as linhagens *Pycnoporus sanguineus* e FV-12 apresentaram 100% de descoloração em 17 dias, seguidas de FI-02, FI-11, FBL com 98%, e FV-06 e FI-03 com 95% de descoloração. Possivelmente enzimas produzidas por estas linhagens fúngicas estejam atuando no processo de quebra molecular do corante, formando novos produtos de peso molecular menor ou ainda, absorvendo em sua massa micelial os compostos do corante, agindo assim no processo de descoloração. Os compostos presentes no efluente atuam como substratos para as bactérias, leveduras e fungos filamentosos que metabolizam os nutrientes para crescimento e manutenção celular durante o tratamento biológico (UZURA et al., 2000 apud GUARATINI, ZANONI, 2000). **Conclusões:** Os fungos amazônicos testados apresentaram correlação positiva quanto ao crescimento micelial em meio de cultivo suplementado com o corante sintético azul de metileno, bem como a descoloração por sete dos nove fungos estudados. Apresentando potencial para aplicação em processo de biorremediação de áreas contaminadas.

**Referências bibliográficas:** CLEMENTE, A.R. 2002. Degradação de Hidrocarbonetos Aromáticos policíclicos por Fungos. Tese de Doutorado, Faculdade de Engenharia de Alimentos, UNICAMP, Campinas - SP.

GUARATINI, C. C.I.; ZANONI, M. V. B. Corantes têxteis. *Química Nova*. V. 23, n. 1, 2000, p 71-78.

KOTRBA, P.; RUMML, T. 200. Bioremediation of heavy metal pollution exploiting constituents, metabolites and metabolic pathways of living. A review. *Coll. Czech. Chem. Comm.*, 65:1205-1247.

NEVES, E.B. 2002. Degradação de Hidrocarbonetos Aromáticos policíclicos por Bactérias. Tese de Doutorado, Faculdade de Engenharia de Alimentos, UNICAMP, Campinas - SP.