



UNIVERSIDADE DO ESTADO DO AMAZONAS
ESCOLA DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA E RECURSOS
NATURAIS DA AMAZÔNIA

DANIEL SARAIVA ROESSING

IDENTIFICAÇÃO, FILOGENIA E BIODEGRADAÇÃO DE PLÁSTICO LDPE POR
FUNGOS LIGNÍCOLAS ISOLADOS DO BOSQUE DO INPA (BASIDIOMYCOTA;
ASCOMYCOTA)

MANAUS

2023

DANIEL SARAIVA ROESSING

**IDENTIFICAÇÃO, FILOGENIA E BIODEGRADAÇÃO DE PLÁSTICO LDPE POR
FUNGOS LIGNÍCOLAS ISOLADOS DO BOSQUE DO INPA (BASIDIOMYCOTA;
ASCOMYCOTA)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Recursos Naturais da Amazônia da Universidade do Estado do Amazonas (UEA), como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia e Recursos Naturais da Amazônia.

Orientadora: Dra. Érica Simplício de Souza

Coorientador: Dr. João Vicente Braga de Souza

MANAUS

2023

DANIEL SARAIVA ROESSING

IDENTIFICAÇÃO, FILOGENIA E BIODEGRADAÇÃO DE PLÁSTICO LDPE POR FUNGOS LIGNÍCOLAS ISOLADOS DO BOSQUE DO INPA (BASIDIOMYCOTA; ASCOMYCOTA)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Recursos Naturais da Amazônia da Universidade do Estado do Amazonas (UEA), como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia e Recursos Naturais da Amazônia.

Data da aprovação: 15/12/2023

Banca Examinadora:

Dr^a. Érica Simplício de Souza

Orientadora – EST/UEA

Dr^a. Waldireny Caldas Rocha

Membro interno – FCF/UFAM

Dr. João Paulo Alves Silva

Membro externo – EEL/USP

MANAUS

2023

Ficha Catalográfica

R718i Roessing, Daniel Saraiva.
 Identificação, filogenia e biodegradação de plástico LDPE
 por fungos lignícolas isolados do Bosque do INPA
 (Basidiomycota: Ascomycota./Daniel Saraiva Roessing . --
 Manaus : Universidade do Estado do Amazonas, 2023.
 91f. : il. Color. ; 30 cm

 Dissertação – PGSS – Biotecnologia e Recursos Naturais da
 Amazônia (Mestrado) –Universidade do Estado do Amazonas,
 Manaus, 2023.
 Orientadora: Souza, Érica Simplício de
 Coorientador: Souza, João Vicente Braga de




 1.Basidiomycota 2.Ascomycota 3.Biodegradação 4.Plástico
 LDPE 5.Fenoloxidasas I.Título

Ficha Catalográfica elaborada pela Bibliotecária Maria Eliana N Silva, lotada na
Escola Superior de Ciências da Saúde - UEA

**PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA – PROPESP
ESCOLA SUPERIOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE – ESA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA E RECURSOS
NATURAIS DA AMAZÔNIA – PPGMBT**

A banca examinadora da Defesa Pública da Dissertação de Mestrado de DANIEL SARAIVA ROESSING, intitulada “**Identificação, filogenia e biodegradação de plástico LDPE por fungos lignícolas isolados do Bosque do INPA (BASIDIOMYCOTA; ASCOMYCOTA)**”, tendo como presidente a Dra. Érica Simplício de Souza e como membros os professores: Dra. Waldireny Caldas Rocha e Dr. João Paulo Alves Silva em sessão pública realizada aos quinze dias do mês de dezembro do ano de dois mil e vinte e três às oito horas e trinta minutos, via *Google Meet* - Web Conferência, emitiu o seguinte parecer: **APROVADO**

Considerações finais _____

Banca	Conceito	Assinatura
Dra. Érica Simplício de Souza	(X)Aprovado(a) () Reprovado(a)	 Documento assinado digitalmente ERICA SIMPLICIO DE SOUZA Data: 15/12/2023 12:20:29-0300 Verifique em https://validar.iti.gov.br
Dra. Waldireny Caldas Rocha	(X)Aprovado(a) () Reprovado(a)	 Documento assinado digitalmente WALDIRENY ROCHA GOMES Data: 29/12/2023 12:16:54-0300 Verifique em https://validar.iti.gov.br
Dr. João Paulo Alves Silva	(X)Aprovado(a) () Reprovado(a)	 Documento assinado digitalmente JOAO PAULO ALVES SILVA Data: 15/12/2023 15:06:26-0300 Verifique em https://validar.iti.gov.br

À minha avó, Ângela Maria Saraiva Roessing (*in memoriam*);

À minha mãe, Danielle Roessing de Souza.

Os grandes pilares da minha educação e do meu caráter.

“Nada na vida é para ser temido, apenas ser compreendido. Agora é a hora de entender mais, para que possamos temer menos.”

Marie Curie

“Não temos esperança de resolver nossos problemas sem aproveitar a diversidade, a energia e a criatividade de todo o nosso povo.”

Roger Wilkins

AGRADECIMENTOS

A Deus, e a toda a egrégora que me acompanha no plano espiritual, por me guiarem, protegerem e ampararem, especialmente nos dias difíceis. Agradeço ainda por me darem a força e a saúde para chegar até aqui. Salve suas forças! A vocês toda a honra e toda a glória.

Ao PPGMBT, à UEA, e à FAPEAM, pela concessão da bolsa e pela oportunidade de realizar o mestrado, etapa tão importante na minha vida profissional.

Ao INPA, e ao Laboratório de Micologia, por fornecerem toda a infraestrutura e recursos para realização deste trabalho.

Ao Laboratório Temático de Biologia Molecular, pela parceria na realização deste trabalho.

Aos meus orientadores Dra Érica Simplício e Dr João Vicente, pela grande paciência e compreensão, pela dedicação e fé neste trabalho, e por todos os conhecimentos compartilhados e orientações recebidas. Nada disto seria possível sem vocês.

À Dra Ana Cortez, pelo carinho e disposição em auxiliar e compartilhar seus conhecimentos.

Aos meus colegas de laboratório, Juan, Naira, Linnek, Carlos, João, Rita, Robert, Vanessa, Izabela. Por toda a ajuda, conselhos, conhecimentos compartilhados, e momentos de descontração. A companhia de vocês no ambiente de trabalho tornou esta experiência muito mais leve, construtiva e divertida! Um agradecimento especial a Luciana, Nayara e Flávia, por toda a paciência e pela grande ajuda nas etapas de biologia molecular.

Às nossas estimadas colaboradoras Vanusa e Maria Onete, por todo o cuidado e carinho na rotina de trabalho, e por cada momento de partilha no almoço e café da tarde.

A todos os alunos, técnicos e profissionais do Prédio 02 do INPA, por cada interação, ajuda e conselho ao longo destes anos. Em especial, à todo o grupo de alunos, professores e profissionais do Laboratório de Micologia, por contribuírem tanto ao meu desenvolvimento profissional e pessoal. É uma grande honra fazer parte deste grupo de pesquisa. Esta conquista é de todos vocês!

À toda minha família, por incentivarem meus estudos, acreditarem em mim e me apoiarem nos momentos mais difíceis. À minha avó, Ângela; Aos meus pais, Danielle e Ricardo; Aos meus irmãos, Letícia e Júnior; Aos meus tios, Dayanne e Gustavo; À minha prima, Ghislene. Este trabalho é de vocês, para vocês.

A todos os meus amigos de todas as caminhadas da vida, que me acompanharam e me

incentivaram nesta etapa. Um agradecimento especial aos irmãos que a UFAM me deu, Érica, Lucas, Audrey, Carol, e muitos outros amados companheiros de profissão. Cada um de vocês contribuiu para a minha formação como biólogo e como ser humano, e este mérito também é de vocês.

Aos mestres e professores do PPGMBT, INPA, UEA e UFAM, por todo o conhecimento compartilhado, paciência e dedicação ao ensino, que culminou na realização deste trabalho.

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

MUITO OBRIGADO!

RESUMO

Esta dissertação descreve um estudo que teve como objetivo isolar e identificar fungos lignícolas do Bosque da Ciência do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), localizado em Manaus, Amazonas, Brasil, e avaliar sua capacidade de degradação de filmes de polietileno de baixa densidade (LDPE) em meio com ágar e em meio líquido. Foram coletadas 38 amostras de esporomas de macrofungos ligninolíticos associados a amostras lignocelulósicas em decomposição. A partir dessas amostras, foram isolados oito fungos, sendo quatro pertencentes ao filo Basidiomycota e quatro ao filo Ascomycota, sendo estes quatro últimos contaminantes dos Basidiomycota. A análise filogenética baseada na sequência da região ITS revelou a identificação precisa das espécies dos isolados, que foram identificadas como *Schizophyllum commune*, *Irpex laceratus*, *Phlebiopsis flavidoalba*, *Peniophora crassitunicata*, *Endomelanconiopsis endophytica*, *Annulohypoxylon stygium*, *Xylaria heliscus* e *Xylaria plebeja*. Quanto aos resultados da avaliação da degradação de filmes de LDPE, todos os isolados demonstraram potencial na degradação do plástico, dependendo das condições de cultivo. Em meio com ágar mineral, após 21 dias de cultivo estacionário em temperatura ambiente, todos os isolados salvo *Xylaria plebeja* XPM090323 promoveram a redução da massa do plástico, destacando-se *Pleurotus ostreatus* CPOINPA1, usado como controle positivo (3,7%), *Irpex laceratus* ILM050722 (3%), *Endomelanconiopsis endophytica* EEM140223 (3,2%) e *Annulohypoxylon stygium* ASS170223 (3,8%). *E. endophytica* EEM140223 exibiu a atividade de lacase mais elevada (18,1 U/Kg), enquanto *Schizophyllum commune* SCM050722 se destacou na atividade de peroxidases (5,9 U/Kg). Em contraste, em meio líquido caldo mineral, após 21 dias de cultivo estacionário em temperatura ambiente, *X. plebeja* XPM090323 destacou-se como o mais eficiente na redução da massa do LDPE (1,5%). Por fim, o isolado *Xylaria heliscus* XHS310123 apresentou a maior produção de biomassa (4,1 g/L) e de peroxidases (13,3 U/L), enquanto *S. commune* SCM050722 apresentou a maior atividade de lacase (25,2 U/L). Este estudo contribui para a compreensão da diversidade de fungos lignícolas na região amazônica e sua capacidade de degradação de polietileno, apresentando potencial relevância em aplicações ambientais e de remediação de resíduos plásticos.

Palavras-chave: Basidiomycota; Ascomycota; Biodegradação; Plástico LPDE; Fenoloxidasas.

ABSTRACT

This dissertation describes a study that aimed to isolate and identify ligninolytic fungi from the Bosque da Ciência of the National Institute of Amazonian Research (INPA), located in Manaus, Amazonas, Brazil, and to evaluate their capacity for degrading low-density polyethylene (LDPE) films in agar medium and liquid medium. Thirty-eight samples of sporomes of ligninolytic macrofungi associated with decomposing lignocellulosic samples were collected. From these samples, eight fungi were isolated, four belonging to the phylum Basidiomycota and four to the phylum Ascomycota, with the latter four being contaminants of Basidiomycota. Phylogenetic analysis based on the ITS region sequence revealed precise identification of the isolated species, which were identified as *Schizophyllum commune*, *Irpex laceratus*, *Phlebiopsis flavidoalba*, *Peniophora crassitunicata*, *Endomelanconiopsis endophytica*, *Annulohyphoxylon stygium*, *Xylaria heliscus*, and *Xylaria plebeja*. Regarding the results of LDPE film degradation assessment, all isolates showed potential in plastic degradation, depending on the culture conditions. In mineral agar medium, after 21 days of stationary culture at room temperature, all isolates except *Xylaria plebeja* XPM090323 promoted plastic mass reduction, with the most effective being *Pleurotus ostreatus* CPOINPA1, used as positive control (3.7%), *Irpex laceratus* ILM050722 (3%), *Endomelanconiopsis endophytica* EEM140223 (3.2%), and *Annulohyphoxylon stygium* ASS170223 (3.8%). *E. endophytica* EEM140223 exhibited the highest laccase activity (18.1 U/Kg), while *Schizophyllum commune* SCM050722 excelled in peroxidase activity (5.9 U/Kg). In contrast, in liquid mineral broth, after 21 days of stationary culture at room temperature, *X. plebeja* XPM090323 stood out as the most efficient in reducing LDPE mass (1.5%). Finally, the isolate *Xylaria heliscus* XHS310123 presented the highest biomass production (4.1 g/L) and peroxidase activity (13.3 U/L), while *S. commune* SCM050722 showed the highest laccase activity (25.2 U/L). This study contributes to the understanding of the diversity of ligninolytic fungi in the Amazon region and their capacity for polyethylene degradation, presenting potential relevance in environmental applications and plastic waste remediation.

Keywords: Basidiomycota; Ascomycota; Biodegradation; LDPE plastic; Phenoloxidases.

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AFM – Microscopia de força atômica	MEA – Ágar Extrato de Malte
ANOVA – Análise de variância	MEV – Microscopia eletrônica de varredura
ASTM – American Society for Testing and Materials	MnP – Manganês Peroxidase
BDA – Ágar Batata Dextrose	MNPs – Microplásticos e nanoplásticos
CPE – Polietileno clorado	NCBI – National Center for Biotechnology Information
Cut – Cutinase	NMR – Ressonância magnética nuclear
DMSO – Dimetilsulfóxido	PA – Poliamida
EDTA – Ácido etilenodiamino tetra- acético	PAH – Hidrocarboneto policíclico aromático
FTIR – Espectroscopia em infra-vermelho por transformada de Fourier	PBAT – Poliadipto de butileno tereftalato
GCMS – Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas	PCR – Reação em cadeia da polimerase
HDPE – Polietileno de alta densidade	PE – Polietileno
HMWPE – Polietileno de peso molecular alto	PEG – Polietilenoglicol
INPA – Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia	PET – Polietileno tereftalato
ISO – International Organization for Standardization	PEX – Polietileno reticulado
ITS – Internal Transcribed Spacer	PLA – Ácido polilático
Lac – Lacase	PNUMA – Programa das Nações Unidas para o Meio Ambiente
LDPE – Polietileno de baixa densidade	PP – Polipropileno
LiP – Lignina peroxidase	PS – Poliestireno
LLDPE – Polietileno linear de baixa densidade	PTT – Politereftalato de trimetileno
MDPE – Polietileno de média densidade	PUR – Poliuretano
UHMWPE – Polietileno de peso molecular ultra alto	PVC – Cloreto de polivinila
UnP – Peroxidase não específica	SPI – Society of Plastics Industry
VLDPE – Polietileno de peso molecular muito baixo	TLC – Cromatografia em camada delgada

LISTA DE TABELAS

ARTIGO DE DISSERTAÇÃO

Tabela 1. Resultados da avaliação de similaridade de sequências da região ITS1 (Internal Transcribed Spacer 1), 5.8S (Ribosomal RNA) e ITS4 (Internal Transcribed Spacer 4) dos oito fungos isolados neste estudo, comparadas com sequências-tipo depositadas no NCBI (Banco de dados do Instituto Nacional de Saúde dos Estados Unidos) e as espécies associadas a essas sequências.71

Tabela 2. Avaliação da redução de massa de filmes de LDPE, vigor micelial e produção de fenoloxidades (lacase e peroxidases) em superfície de meio ágar por fungos isolados do bosque do INPA, Manaus-AM73

Tabela 3. Avaliação da redução de massa de filmes de LDPE, biomassa produzida e produção de fenoloxidades (lacase e peroxidases) em meio líquido por fungos isolados do bosque do INPA, Manaus-AM.75

LISTA DE FIGURAS

REFERENCIAL TEÓRICO

Figura 1. Estrutura química dos principais tipos de plástico.	6
Figura 2. Estrutura das cadeias poliméricas do HDPE e do LDPE.	11
Figura 3. Tracajás em meio à poluição no Igarapé do Mindu, em Manaus-AM.	16
Figura 4. Aterro sanitário municipal de Manaus-AM.	18
Figura 5. Códigos de reciclagem dos polímeros plásticos.	20
Figura 6. Etapas da biodegradação microbiana de plásticos.	25
Figura 7. Via metabólica de degradação fúngica do PE.	26
Figura 8. Basidiomiceto amazônico crescendo em área poluída por plásticos.	37
Figura 9. Via hipotética de degradação do PE, utilizando uma combinação sinérgica de Lac, MnP e LiP.	41
Figura 10. Fungos amazônicos em diferentes substratos lignocelulósicos.	43

ARTIGO DE DISSERTAÇÃO

Figura 1. Esporomas de macrofungos do Bosque da Ciência do INPA em Manaus-AM submetidos a isolamento no presente trabalho.	70
Figura 2. Aspecto macromorfológico da cultura em BDA dos fungos isolados no presente trabalho, à parte de esporomas de macrofungos do Bosque da Ciência do INPA, em Manaus-AM.	70
Figura 3. Reconstrução da árvore filogenética de nove isolados de Basidiomycota e Ascomycota e sequências-tipo do NCBI utilizando o modelo Neighbor-Joining: Uma Análise Comparativa da Diversidade Genética e das Relações Evolutivas.	72
Figura 4. Redução de massa de filmes de LDPE (%) em superfície de meio ágar por fungos isolados do bosque do INPA, Manaus-AM.	73
Figura 5. Produção de fenoloxidades (lacase e peroxidases) (U/Kg) em superfície de meio ágar por fungos isolados do bosque do INPA, Manaus-AM.	74
Figura 6. Redução de massa de filmes de LDPE (%) em meio líquido por fungos isolados do bosque do INPA, Manaus-AM.	75

Figura 7. Biomassa produzida em cultivo com filmes de LDPE (g/L) em meio líquido por fungos isolados do bosque do INPA, Manaus-AM.	76
Figura 8. Produção de fenoloxidades (lacase e peroxidases) (U/L) em meio líquido por fungos isolados do bosque do INPA, Manaus-AM.	76

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. REFERENCIAL TEÓRICO	5
2.1. Plásticos – Características, aplicações, produção e principais tipos.....	5
2.2. Polietileno – História, produção, tipos e aplicações.....	9
2.3. Os impactos do polietileno e outros plásticos.....	12
2.4. Métodos de descarte e manejo de plásticos.....	18
2.5. Biodegradação de plásticos – Aspectos gerais.....	24
2.6. Biodegradação do polietileno – Desafios e perspectivas.....	30
2.7. Biodegradação de polietileno por fungos e suas enzimas.....	34
2.8. O potencial biotecnológico de fungos lignícolas amazônicos na degradação do polietileno – Dados e perspectivas.....	42
3. OBJETIVOS	49
3.1. Objetivo geral	49
3.2. Objetivos específicos	49
4. MATERIAIS E MÉTODOS	49
4.1. Coleta e isolamento de amostras.....	49
4.2. Identificação e filogenia dos isolados.....	50
4.2.1. Extração de DNA.....	50
4.2.2. Amplificação por PCR.....	51
4.2.3. Sequenciamento e análise filogenética.....	51
4.3. Estudos de biodegradação de LDPE.....	52
4.3.1. Biodegradação de LDPE em meio sólido.....	52
4.3.1.1. Meio Ágar Mineral.....	52
4.3.1.2. Bioprocesso.....	53
4.3.2. Biodegradação de LDPE em meio líquido.....	53
4.3.2.1. Meio Caldo Mineral.....	53

4.3.2.2. Bioprocesso.....	54
4.3.2.3. Quantificação de biomassa.....	54
4.3.3. Avaliação da redução de massa.....	54
4.4. Determinação da atividade de Fenoloxidasas.....	55
4.5. Análise estatística.....	56
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	56
6. CONCLUSÕES	83
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	84

1. INTRODUÇÃO

O termo "plástico" (derivado do grego *plastikos*) refere-se a um grupo de materiais sintéticos e semissintéticos de alto peso molecular com maleabilidade para moldagem (Temporiti *et al.*, 2022). Apresentando alta durabilidade e versatilidade, esses materiais desempenham papéis essenciais em diversas áreas da atividade humana, incluindo agricultura, construção, saúde, indústria e embalagens (Bahl *et al.*, 2020). Sua produção pode ser baseada em recursos naturais ou sintéticos, sendo a maioria derivada do petróleo (Daly *et al.*, 2021; Ekanayaka *et al.*, 2022). A produção global de plásticos vem crescendo anualmente, com estimativas indicando um aumento da sua produção para quase 600 milhões de toneladas por ano até 2050 após a pandemia de COVID-19 (Jimenez *et al.*, 2022).

O polietileno (PE) foi um dos primeiros plásticos a ser produzido em massa, tendo sua produção iniciada acidentalmente em 1935 por Michael Perrin, que desenvolveu um processo reproduzível para a síntese de PE com aplicações industriais (Shankar *et al.*, 2019). Classificado em tipos como PE de alta densidade (HDPE) e PE de baixa densidade (LDPE), cada tipo possui propriedades distintas influenciadas por processos de fabricação específicos (Sales *et al.*, 2021).

O PE é aplicado principalmente na fabricação de embalagens e materiais descartáveis, e é um dos plásticos mais consumidos globalmente, representando 64% de todos os plásticos sintéticos, com estimativas de crescimento anual de 12% em sua produção (Srikanth *et al.*, 2022). O LDPE em específico é o polímero sintético mais abundante do planeta, representando 69% dos resíduos sólidos descartados em aterros sanitários, principalmente na forma de sacolas plásticas (Mohanani *et al.*, 2020). Anualmente, entre 500 bilhões e 1 trilhão de sacolas de PE são usadas em todo o mundo (Srikanth *et al.*, 2022). O uso extensivo do PE, especialmente do LDPE, apresenta sérios impactos ambientais e ameaça diversos ecossistemas e organismos, incluindo o ser humano (Ghatge *et al.*, 2020).

A problemática dos plásticos, especialmente do PE, tem implicações significativas no meio ambiente. Cerca de 90% dos produtos plásticos são utilizados uma única vez e então são descartados, contribuindo para a poluição generalizada e sobrecarregando sistemas de gestão de resíduos deficientes (Sánchez, 2020). A persistência dos plásticos no ambiente é agravada por sua lenta degradação, com estimativas de dezenas a milhares de anos para ocorrer (Ali *et al.*, 2021; Jimenez *et al.*, 2022; Taghavi *et al.*, 2021; Temporiti *et al.*, 2022). Os impactos da poluição plástica são amplos, afetando ecossistemas terrestres e aquáticos e uma grande diversidade de organismos, prejudicando a produtividade dos solos, causando problemas em

animais como obstruções intestinais e diminuição da imunidade, e oferecendo riscos à saúde humana, como disfunção endócrina e câncer (Bahl *et al.*, 2020; Venkatesh *et al.*, 2021; Yuan *et al.*, 2020).

Além disso, microplásticos e nanoplásticos (MNPs), formados pela fragmentação abiótica natural destes materiais, encontram-se disseminados globalmente, afetando ecossistemas agrícolas, florestais, fluviais e oceânicos (Jimenez *et al.*, 2022; Mohanan *et al.*, 2020). A saúde humana também está ameaçada pela ingestão de MNPs acumulados na teia trófica, que frequentemente contêm aditivos tóxicos e metais pesados incorporados em sua passagem pelo ambiente (Kutralam-Muniasamy *et al.*, 2023).

Além dos impactos ambientais e de saúde, a poluição plástica gera custos socioeconômicos, prejudicando setores como turismo, pesca e transporte marítimo (Kumar *et al.*, 2021). O lixo plástico tornou-se uma característica distintiva do Antropoceno, exigindo medidas urgentes para minimizar o uso de plásticos e desenvolver estratégias eficazes de manejo (Ghatge *et al.*, 2020).

Os principais métodos de descarte de plásticos incluem a deposição em aterro sanitário, a incineração e a reciclagem (Mishra; Das; Kandali, 2020). Esses métodos são relativamente limitados e dispendiosos, além de causarem impactos ambientais, tornando-os ineficazes no manejo do problema (Sangale; Shahnawaz; Ade, 2019). A reciclagem de plásticos enfrenta desafios significativos, como a degradação das propriedades físico-químicas destes após ciclos repetidos (Ali *et al.*, 2021).

A baixa taxa global de reciclagem de plásticos e as suas limitações destacam a necessidade contínua de soluções inovadoras e sustentáveis para lidar com o problema crescente do acúmulo de resíduos plásticos e seus impactos (Chen *et al.*, 2021; Queiroz *et al.*, 2022). Plásticos biodegradáveis e bioplásticos, provenientes de fontes renováveis como amido e resíduos agrícolas, apresentam potencial no manejo sustentável do problema (Bacha *et al.*, 2023; Jimenez *et al.*, 2022). No entanto, a substituição efetiva dos plásticos convencionais por biodegradáveis ainda é limitada, exigindo estudos sobre as condições ideais para sua degradação efetiva (Ekanayaka *et al.*, 2022; Mishra; Das; Kandali, 2020).

A degradação de plásticos é um processo complexo envolvendo mudanças nas propriedades poliméricas devido a processos químicos, físicos e biológicos. A degradação abiótica, incluindo fotodegradação, degradação térmica, mecânica e química, influencia a fragmentação inicial do polímero, ocorrendo principalmente nos ambientes naturais pela sua exposição prolongada às intempéries (Oliveira *et al.*, 2023).

A biodegradação de plásticos, realizada principalmente por microrganismos, é um

processo complexo e sequencial, seguindo quatro etapas: biodeterioração, biofragmentação, bioassimilação e mineralização (Mohanani *et al.*, 2020). Ao longo do processo, com o auxílio de sistemas enzimáticos, os polímeros são colonizados, fragmentados e assimilados pelas células microbianas, sendo eventualmente incorporados no seu metabolismo, gerando energia e produtos metabólicos (Okal *et al.*, 2023).

A introdução dos plásticos na biosfera é considerada muito recente, de modo que a natureza ainda não teve tempo de evoluir sistemas enzimáticos específicos à degradação destes materiais (Okal *et al.*, 2023). Como consequência, a nossa compreensão mecanicista e holística deste fenômeno ainda está em seus estágios iniciais (Jimenez *et al.*, 2022). A pesquisa científica tem destacado o potencial e a importância da diversidade microbiana na transformação de plásticos, abordando tanto métodos de pesquisa em laboratório como em campo para compreender o fenômeno sob diferentes perspectivas (Haider *et al.*, 2018).

Para avaliar a eficácia do processo de biodegradação, múltiplas abordagens analíticas como observações visuais, avaliações físicas e químicas, evolução de CO₂, consumo de O₂ e marcação radiativa são empregadas, embora estas ainda careçam de padronização e enfrentem dificuldades de reprodutibilidade de seus dados (Alshehrei, 2017; Jimenez *et al.*, 2022). Apesar dos desafios, a biodegradação é vista como uma estratégia promissora para mitigar os impactos ambientais dos plásticos, oferecendo uma alternativa mais limpa e sustentável, convertendo resíduos plásticos em produtos biotecnológicos valiosos (Oliveira *et al.*, 2023; Mohanani *et al.*, 2020).

O PE é conhecido por sua resistência à degradação devido à sua estrutura hidrofóbica, alto peso molecular e aditivos antioxidantes (Ghatge *et al.*, 2020; Mohanani *et al.*, 2020). Várias estratégias, como as mencionadas anteriormente, têm sido adotadas para manejar o PE, mas enfrentam graves desafios e impactos ambientais (Sangale; Shahnawaz; Ade, 2019). Abordagens alternativas como a produção de plásticos biodegradáveis e a biodegradação microbiana tem emergido como potenciais soluções para o problema, sendo tópicos altamente oportunos e relevantes, e amplamente discutidos na comunidade científica (Jimenez *et al.*, 2022).

A literatura científica revela avanços na biodegradação do PE por microrganismos, incluindo bactérias como *Pseudomonas* e fungos como *Aspergillus*, destacando a necessidade de isolamento e triagem de microrganismos eficientes (Danso; Chow; Streita, 2019; Venkatesh *et al.*, 2021). O uso de pré-tratamentos com fatores abióticos, como luz ultravioleta, tem se mostrado promissora na degradação inicial das cadeias de PE, acelerando significativamente o processo (Okal *et al.*, 2023). A combinação de fatores abióticos e bióticos tem mostrado eficácia

na degradação do PE, evidenciando o potencial destas pesquisas para o gerenciamento sustentável de resíduos plásticos (Chaudhary *et al.*, 2021; Sangale; Shahnawaz; Ade, 2019).

A biodegradação de PE por fungos, tema de crescente interesse, explora as características únicas do Reino Fungi. Esses organismos desempenham papéis cruciais nos ecossistemas, atuando como decompositores, simbiontes e até mesmo patógenos (Sánchez, 2020). A biodegradação do PE e de outros plásticos por fungos é resultado da evolução metabólica após exposição prolongada a polímeros xenobióticos introduzidos na natureza pela atividade humana (Jimenez *et al.*, 2022).

Embora os fungos do filo Ascomycota sejam mais estudados na biodegradação de plásticos, espécies de Basidiomycota e Mucoromycota também apresentam potencial, destacando a necessidade de mais investigações nesses grupos (Sánchez, 2020). Ascomicetos como *Trichoderma harzianum* e *Aspergillus flavus*, e basidiomicetos como *Phanerochaete chrysosporium* e *Pleurotus ostreatus* mostraram potencial na degradação do PE produzindo diversos tipos de enzimas, com destaque para as enzimas ligninolíticas do tipo fenoloxidase (Gomez-Méndez *et al.*, 2018; Iiyoshi; Tsutsumi; Nishida, 1998; Sowmia; Krishnappa; Thippeswamy, 2014; Zhang *et al.*, 2020).

As fenoloxidases, como lacase (Lac), lignina peroxidase (LiP) e manganês peroxidase (MnP), tem demonstrando grande potencial biotecnológico na degradação do PE, com estudos computacionais destacando os seus papéis essenciais na oxidação das cadeias poliméricas do PE (Santacruz-Juárez *et al.*, 2021). Propostas de vias sinérgicas envolvendo Lac, LiP e MnP apresentam abordagens promissoras para a degradação eficaz do PE (Santacruz-Juárez *et al.*, 2021).

Várias espécies de macrofungos tem demonstrado potencial na capacidade de degradar filmes de LDPE, com destaque para os fungos ligninolíticos, adaptados à decomposição da matéria vegetal e eficientes na degradação da lignina (Hadibarata; Yuniarto, 2020). Fungos lignícolas como os basidiomicetos *Phanerochaete chrysosporium*, *Trametes versicolor*, *Schizophyllum commune* e *Pleurotus ostreatus*, e os ascomicetos *Daldinia eschscholtzii*, *Xylaria feejensis*, *Chateomium globosum* e *Neofusicoccum occulatum* foram identificados como potenciais degradadores de LDPE, apresentando potencial biotecnológico para sua remediação (Gomez-Méndez *et al.*, 2018; Iiyoshi; Tsutsumi; Nishida, 1998; Perera *et al.*, 2022). Muitos destes grupos são amplamente encontrados em ambientes ricos em matéria vegetal, como a Floresta Amazônica.

A biodiversidade única da Amazônia oferece um campo promissor para a pesquisa biotecnológica, especialmente na busca por enzimas com aplicação potencial na degradação de

plásticos (Jimenez *et al.*, 2022; Mendoza *et al.*, 2022). Apesar dos avanços nos estudos sobre a degradação de plásticos por fungos, há uma lacuna significativa de pesquisas neste tema na região amazônica. Dada a rica diversidade biológica e a importância estratégica da Amazônia para a conservação ambiental e o desenvolvimento sustentável, é crucial conduzir estudos específicos na região para investigar o potencial dos fungos na biodegradação de plásticos e desenvolver soluções adequadas para o problema. Destaca-se a importância do isolamento e identificação de fungos amazônicos com potencial para degradação de PE, abrindo caminhos para futuras pesquisas que possibilitem a sua remediação sustentável.

Diante desse contexto, o presente estudo teve como objetivo identificar, analisar filogeneticamente e avaliar o potencial de degradação de filme de LPDE por fungos lignícolas isolados no Bosque do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), localizado em Manaus, Amazonas. Os resultados desta pesquisa podem fornecer *insights* sobre a degradação fúngica de PE e nortear futuros estudos que busquem a otimização da biodegradação deste plástico, bem como contribuir para a valorização do potencial biotecnológico da diversidade fúngica amazônica.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

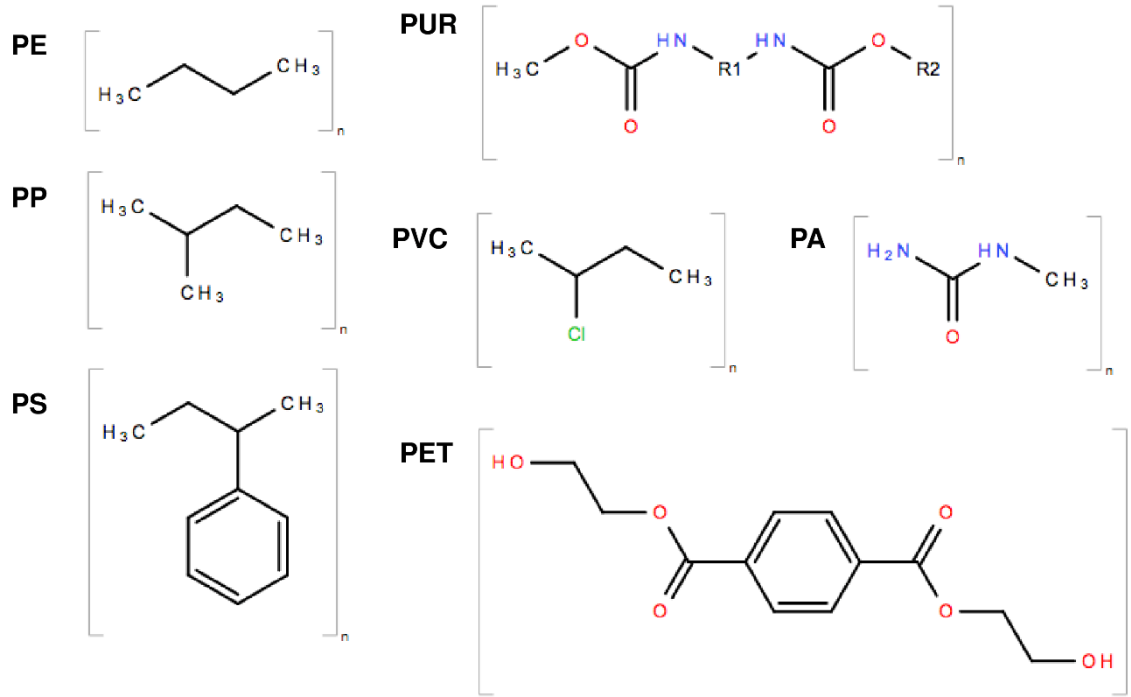
2.1. Plásticos – Características, aplicações, produção e principais tipos

A palavra "plástico" deriva da palavra grega "plastikos", que significa "capaz de ser moldado" (Temporiti *et al.*, 2022). Hoje, o termo "plástico" refere-se a um grupo de materiais que abrange uma ampla gama de compostos orgânicos sintéticos e semissintéticos de alto peso molecular (Bahl *et al.*, 2020; Daly *et al.*, 2021). Eles possuem maleabilidade, que permite que sejam moldados em diferentes formatos (Daly *et al.*, 2021). Na década de 1950, eles começaram a substituir materiais naturais em vários setores e aplicações do cotidiano (Temporiti *et al.*, 2022).

Os plásticos são polímeros compostos por elementos como carbono, hidrogênio, nitrogênio, oxigênio, silício e cloro (Bahl *et al.*, 2020; Ekanayaka *et al.*, 2022). Do ponto de vista estrutural, eles são divididos em dois grupos: polímeros com uma cadeia principal de carbono-carbono (C-C), e polímeros com átomos distintos na cadeia principal (C-O ou C-N) (Mohanani *et al.*, 2020). Os plásticos frequentemente incluem uma ligação orgânica na cadeia principal, grupos moleculares ligados lateralmente e adições de misturas orgânicas e

inorgânicas, como aditivos, plastificantes e estabilizantes (Bahl *et al.*, 2020). Na Figura 1, estão representadas as estruturas químicas dos polímeros plásticos mais comuns.

Figura 1. Estrutura química dos principais tipos de plástico.



Fonte: O autor (ChemDraw, 2021).

Os plásticos são classificados como termoplásticos e termofixos. Os termoplásticos podem ser deformados quando aquecidos. Eles também podem ser reconfigurados quando resfriados, permitindo flexibilidade e reciclagem repetida. Os plásticos termofixos, ao contrário, não podem ser reconfigurados após o aquecimento, sendo mais rígidos e resistentes que os termoplásticos (Taghavi *et al.*, 2021).

A produção de plásticos pode ser baseada em recursos naturais ou sintéticos. Plásticos de base biológica são derivados de compostos naturais, como lignina, celulose, hemicelulose, terpenos, óleos vegetais, carboidratos e resíduos de alimentos (Ekanayaka *et al.*, 2022). Em contraste, a grande maioria dos plásticos é de origem sintética, fabricada a partir de monômeros provenientes do petróleo bruto. Esses plásticos sintéticos são frequentemente considerados não biodegradáveis (Daly *et al.*, 2021; Ekanayaka *et al.*, 2022).

Os plásticos derivados do petróleo possuem várias propriedades desejáveis, como durabilidade, leveza, resistência à corrosão, e isolamento térmico e elétrico, que lhes

proporcionam notável versatilidade (Chaudhary *et al.*, 2021; Mohanan *et al.*, 2020). Os seus métodos de produção são bem estabelecidos e altamente eficientes, resultando em custos de produção reduzidos. Consequentemente, eles se tornaram elementos essenciais da economia e infraestrutura globais (Mohanan *et al.*, 2020).

Os plásticos são aplicados em todos os setores da atividade humana, como agricultura, construção, telecomunicações, transporte, residências, saúde e medicina (Bahl *et al.*, 2020). Sua estabilidade e longevidade desempenham um papel fundamental em atividades diárias, desde usos domésticos até aplicações industriais, de modo que os plásticos se tornaram abundantes na produção humana (Ekanayaka *et al.*, 2022).

Diversos produtos de várias indústrias são fabricados a partir de plásticos. Exemplos incluem aparelhos eletrônicos, artigos de papelaria, móveis, artigos de higiene pessoal, acessórios, componentes automotivos, tanques, tubos de água e, notavelmente, embalagens e itens descartáveis, como embrulhos, copos, colheres, bandejas, entre outros (Bahl *et al.*, 2020).

De 1950 a 2018, a produção total de plásticos foi estimada em aproximadamente 8,3 bilhões de toneladas, com crescimento anual de 5% (Ali *et al.*, 2021). A produção global de plásticos atingiu cerca de 370 milhões de toneladas métricas (Mt) em 2019 (Gambarini *et al.*, 2021; Kumar *et al.*, 2021). Em 2020, cerca de 400 Mt de plásticos sintéticos foram produzidas globalmente, e, após a pandemia de coronavírus de 2019 (COVID-19), espera-se um aumento adicional para quase 600 Mt por ano, até 2050 (Jimenez *et al.*, 2022).

Os polímeros plásticos mais relevantes para a economia mundial, em ordem crescente de produção global, incluem as poliamidas (PAs, mais conhecidas como Nylon), o poliestireno (PS, também conhecido como isopor), os poliuretanos (PUR), o polietileno tereftalato (PET), o cloreto de polivinila (PVC), o polipropileno (PP), e o polietileno (PE) (Danso; Chow; Streita, 2019; Gambarini *et al.*, 2021; Mohanan *et al.*, 2020). Também há uma variedade de outros plásticos, incluindo acrílico, policarbonato, e ácido polilático (PLA) (Ekanayaka *et al.*, 2022). Dentre estes polímeros, os mais amplamente utilizados são o PE (30,3%), PP (19,7%), PVC (9,6%), PET (8,4%), PUR (7,8%) e PS (6,1%) (Temporiti *et al.*, 2022).

As poliamidas (PA) são polímeros compostos de unidades repetidas de moléculas alifáticas, semiaromáticas ou aromáticas unidas por ligações peptídicas de amida (Danso; Chow; Streita, 2019) (Figura 1). Esta categoria de polímeros é popularmente conhecida como Nylon. As poliamidas sintéticas são usadas principalmente na fabricação de produtos têxteis, automotivos, cordas, tapetes e roupas esportivas (Danso; Chow; Streita, 2019).

O poliestireno (PS), conhecido popularmente como isopor, consiste em monômeros de estireno (Figura 1). O PS é o sexto polímero plástico mais fabricado no mundo, e é bastante

utilizado nas indústrias de embalagens, descartáveis e artigos de uso diário, como por exemplo: recipientes de alimentos, materiais de construção, copos, pratos e talheres descartáveis, entre outros (Danso; Chow; Streita, 2019).

Os poliuretanos (PUR) são polímeros formados por unidades orgânicas conectadas por um grupo carbamato (Danso; Chow; Streita, 2019) (Figura 1). Os PUR podem ser sintetizados usando diferentes polióis de poliéter ou poliéster, formando dois tipos de polímero. A incorporação de estruturas de anéis aromáticos tem impacto adicional nas suas propriedades físicas e químicas (Danso; Chow; Streita, 2019). A maioria dos poliuretanos são os polímeros termofixos (Bahl *et al.*, 2020).

Os PUR são o quinto tipo de plástico mais produzido no mundo, e são amplamente utilizados na fabricação de produtos médicos (como cateteres) e industriais (como espumas de assentos de veículos e itens domésticos como esponjas de limpeza) (Danso; Chow; Streita, 2019; Mohanan *et al.*, 2020). Os PUR também são usados em adesivos, isolamentos, revestimentos têxteis, pneus, fibras e tintas (Danso; Chow; Streita, 2019; Mohanan *et al.*, 2020).

O polietileno tereftalato (PET) é um termoplástico linear, composto de unidades repetidas de ácido tereftálico e etilenoglicol, unidos por ligações éster (Sales *et al.*, 2021) (Figura 1). O PET é o quarto polímero sintético mais produzido, e é usado em uma variedade de aplicações, como a fabricação de garrafas PET, recipientes, e fibras têxteis (Danso; Chow; Streita, 2019; Mohanan *et al.*, 2020). Várias tecnologias para o manejo do PET já foram relatadas, abrangendo abordagens mecânicas, químicas e biológicas (Sales *et al.*, 2021).

O policloreto de vinila (PVC) é um termoplástico composto por unidades de cloroetilo (Figura 1), sintetizado a partir da hidrólise do acetato de polivinila (Bahl *et al.*, 2020; Mishra; Das; Kandali, 2020). O PVC possui baixo peso molecular, forte resistência à abrasão e baixa absorção de umidade, e é o terceiro polímero produzido com maior frequência (Bahl *et al.*, 2020; Mishra; Das; Kandali, 2020).

O PVC é aplicado principalmente na fabricação de produtos e materiais de embalagem, brinquedos, móveis, encanamentos, pisos e materiais de construção (Ali *et al.*, 2014). Canos de PVC são utilizados em banheiros e cozinhas de edifícios. Ele também é usado em isolamento de fios elétricos e no revestimento de pisos e produtos de couro sintético (Bahl *et al.*, 2020).

O Polipropileno (PP) é um termoplástico composto por unidades de propilenoglicol (Mishra; Das; Kandali, 2020) (Figura 1). O PP é o segundo plástico mais amplamente produzido, e possui uma variedade de aplicações, incluindo embalagens, itens descartáveis, têxteis, equipamentos de laboratório e componentes automotivos (Mohanan *et al.*, 2020). Tanto a estrutura quanto as propriedades do PP são semelhantes às do PE, porém, o PP possui mais

rigidez, resistência ao calor, e alta resistência química (Danso; Chow; Streita, 2019; Mohanan *et al.*, 2020).

O polietileno (PE) é um termoplástico que consiste em cadeias longas de monômeros de etileno (Alshehrei, 2017) (Figura 1). Além de possuir a estrutura química mais simples, o PE também é o polímero plástico mais produzido no mundo (Danso; Chow; Streita, 2019). O PE possui diferentes métodos de produção, que resultam em polímeros com diferentes estruturas moleculares, e, conseqüentemente, com propriedades variáveis (Santacruz-Juárez *et al.*, 2021; Srikanth *et al.*, 2022).

O PE se destaca por ser majoritariamente empregado na indústria de embalagens (Danso; Chow; Streita, 2019). Estima-se que apenas o setor de embalagens constitua 39,9% do mercado de plásticos, e cerca de 42% dos plásticos nos resíduos sólidos urbanos provenha exclusivamente de materiais de embalagem (Sánchez, 2020).

2.2. Polietileno – História, produção, tipos e aplicações

O polietileno (PE) constitui um conjunto de polímeros com estrutura química semelhante, mas diferentes propriedades, determinadas por suas diversas arquiteturas moleculares (Santacruz-Juárez *et al.*, 2021). O PE é uma combinação de monômeros de etileno, sendo quimicamente representado como $(C_2H_4)_n$, com diferentes valores de n (Srikanth *et al.*, 2022). O PE está entre os primeiros polímeros sintéticos produzidos em massa (Shankar *et al.*, 2019).

A trajetória da produção do polietileno é brevemente abordada na revisão de Shankar e colaboradores (2019). O primeiro caso documentado de produção de plástico ocorreu em 1898, quando o químico alemão Hans von Pechmann acidentalmente sintetizou o diazometano, uma substância branca similar a uma cera.

Décadas mais tarde, em 1933, na Imperial Chemical Industries (ICI) em Northwich, Inglaterra, os químicos Eric Fawcett e Reginald Gibson, também por acidente, sintetizaram o diazometano. Eles obtiveram o material ceroso através da combinação de benzaldeído e etileno sob alta pressão. O diazometano era instável e inadequado para aplicações industriais devido à sua natureza volátil. Eles não puderam repetir o experimento devido à contaminação por traços de oxigênio.

No ano de 1935, Michael Perrin, outro químico da ICI, novamente acidentalmente reproduziu o experimento de seus colegas e sintetizou o mesmo material branco. Isso ocorreu

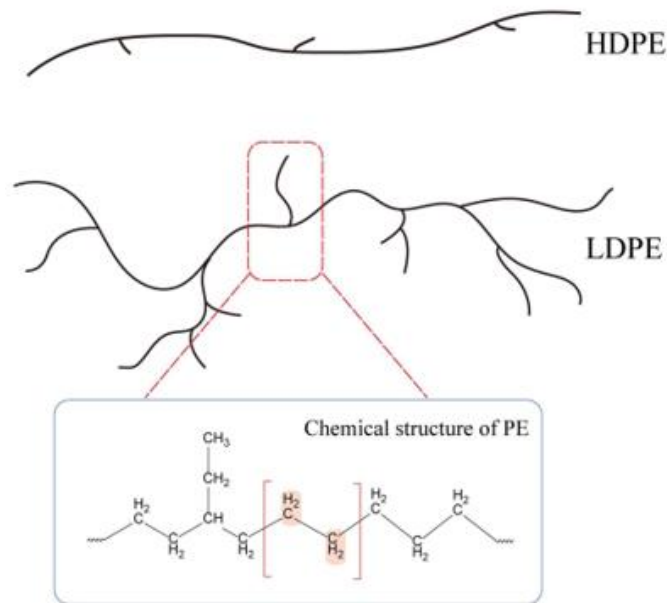
devido a um vazamento que introduziu mais etileno contaminado com oxigênio. Desta vez, Perrin identificou a necessidade de uma certa quantidade de oxigênio para iniciar a polimerização. A partir disso, Perrin converteu essas descobertas acidentais em um processo reproduzível para a síntese de polietileno com aplicações industriais, e, assim, a partir de 1939, iniciou-se a produção em massa do PE (Shankar *et al.*, 2019).

Atualmente, o PE é sintetizado quimicamente a partir do etano (Danso; Chow; Streita, 2019). O etano é submetido a altas temperaturas na presença de um catalisador, convertendo-se em etileno. Este, então, com o auxílio de catalizadores e aquecimento, sofre uma reação de polimerização em cadeia, formando o PE (Souza, 2023). Os processos de fabricação do PE resultam em diferentes estruturas tridimensionais e arranjos das cadeias do polímero, influenciando suas propriedades, como densidade, grau de ramificação, cristalinidade, e peso molecular (Danso; Chow; Streita, 2019; Mohanan *et al.*, 2020).

O PE é categorizado em tipos distintos com base em sua densidade e grau de ramificação (Danso; Chow; Streita, 2019). Os tipos mais comuns de PE são o PE de alta densidade (HDPE), PE de baixa densidade (LDPE) e PE linear de baixa densidade (LLDPE) (Sales *et al.*, 2021). Além destes, o PE apresenta outras variedades, como o PE de média densidade (MDPE), PE de densidade muito baixa (VLDPE), PE reticulado (PEX ou XLPE), PE de alto peso molecular (HMWPE), PE de ultra alto peso molecular (UHMWPE), PE clorado (CPE), entre outras (Shankar *et al.*, 2019). No mercado, os arranjos mais comercializados são o LDPE e o HDPE (Sales *et al.*, 2021).

A produção do LDPE e do HDPE envolve processos distintos. O LDPE é produzido sob alta pressão (1.000-5.000 atm) e alta temperatura (520 K), enquanto o HDPE é fabricado sob baixa pressão (6-7 atm) e temperaturas mais baixas (333-343 K) (Srikanth *et al.*, 2022). O LDPE é caracterizado por suas ramificações longas e irregulares e tem peso molecular de cerca de 40.000 Daltons, enquanto o HDPE é linear, com peso molecular variando de 100.000 a 250.000 Daltons (Santacruz-Juárez *et al.*, 2021) (Figura 2). Essas diferenças estruturais resultam em propriedades distintas: o LDPE é leve e flexível, enquanto o HDPE é mais rígido, resistente e tolerante ao calor (Santacruz-Juárez *et al.*, 2021).

Figura 2. Estrutura das cadeias poliméricas do HDPE e do LDPE.



Fonte: Adaptado de Zhang *et al.* (2023).

O LDPE, devido à sua natureza amorfa, possui características desejáveis, como transparência, atoxicidade, alta ductilidade, baixa permeabilidade ao vapor de água e vedação térmica (Ghatge *et al.*, 2020; Mohanan *et al.*, 2020). Isso o torna versátil para aplicações em embalagens de alimentos e não alimentos, além da fabricação de bandejas, sacolas e revestimentos para papel, têxteis e outros plásticos (Ghatge *et al.*, 2020).

Por outro lado, o HDPE, devido à sua rigidez, opacidade e resistência em altas temperaturas, é usado em aplicações industriais e cotidianas, como sacolas, jarras de leite, garrafas de detergente, potes de margarina, recipientes de lixo e tubulações de água (Ghatge *et al.*, 2020).

O PE se destaca como um dos plásticos mais utilizados em nosso cotidiano devido à sua fácil processabilidade, sendo fabricadas anualmente mais de 100 milhões de toneladas em todo o mundo (Danso; Chow; Streita, 2019; Srikanth *et al.*, 2022). Estima-se que apenas o PE constitua 64% de todos os plásticos sintéticos, e seu consumo está crescendo a uma taxa de aproximadamente 12% ao ano (Srikanth *et al.*, 2022).

O LDPE em específico tornou-se o polímero sintético mais abundante do planeta, representando 69,13% dos resíduos sólidos descartados em aterros sanitários, principalmente na forma de sacolas plásticas (Mohanan *et al.*, 2020). Anualmente, entre 500 bilhões e 1 trilhão de sacolas de PE são usadas em todo o mundo (Srikanth *et al.*, 2022).

O uso extensivo tanto do LDPE quanto do HDPE possui impactos abrangentes em escala global, e representa graves ameaças ambientais para diferentes ecossistemas, tanto terrestres como aquáticos. Os resíduos do PE também ameaçam de extinção várias centenas de espécies diferentes que compõem esses ecossistemas, principalmente devido à ingestão desses resíduos (Ghatge *et al.*, 2020).

2.3. Os impactos do polietileno e outros plásticos

Aproximadamente 90% dos produtos fabricados com plástico são usados uma única vez, e depois são descartados (Sánchez, 2020). Exemplos de produtos de uso único incluem garrafas plásticas, tampas, pontas de cigarro, sacolas de supermercado, copos, canudos, embalagens e máscaras descartáveis.

Uma grande fração da poluição plástica vem do uso excessivo de produtos descartáveis e da gestão inadequada de resíduos em áreas urbanas e rurais (Jimenez *et al.*, 2022). De acordo com o Programa das Nações Unidas para o Meio Ambiente (PNUMA), os produtos descartáveis são evidências de sistemas deficientes de gerenciamento de resíduos e de nossa atitude em relação aos ecossistemas naturais (Kumar *et al.*, 2021).

Considerando o total de resíduos plásticos gerados entre 1950 e 2015, apenas 9% foi reciclado e 60% está se acumulando em aterros ou no meio ambiente (Sales *et al.*, 2021). Atualmente, cerca de 76% da produção total de plástico é eventualmente tratada como resíduo. Destes, 9% são reciclados, 12% são incinerados e 79% são depositados em aterros ou descartados no meio ambiente (Bahl *et al.*, 2020). Até 2050, estima-se que haverá 12 bilhões de toneladas métricas de resíduos plásticos em aterros ou na natureza (Daly *et al.*, 2021).

Um dos problemas dos plásticos acumulados em aterros sanitários ou liberados no meio ambiente é o longo tempo que eles levam para se degradar. Essa recalcitrância deriva das propriedades físico-químicas inerentes dos plásticos, tais como alto peso molecular, cristalinidade e hidrofobicidade, agravadas pela origem dos monômeros a partir de hidrocarbonetos fósseis. O resultado é a acumulação e persistência desses materiais em ecossistemas terrestres e aquáticos por décadas (Ali *et al.*, 2021; Temporiti *et al.*, 2022).

O acúmulo persistente de resíduos plásticos no ambiente, agravado por práticas inadequadas de gerenciamento e descarte descontrolado, resultou em uma séria crise de poluição, representando uma ameaça grave para o planeta (Mishra; Das; Kandali, 2020). A diversidade de organismos afetados pela poluição plástica é expressiva, pois os plásticos são consumidos por uma ampla gama de seres vivos, levando a consequências como saciedade

falsa, estresse patológico, diminuição do crescimento e complicações reprodutivas (Yuan *et al.*, 2020).

Os resíduos de PE representam um grande fator de risco para os animais, tanto terrestres quanto aquáticos. Esses resíduos causam obstrução abdominal em peixes, aves, répteis e mamíferos. O PE não digerido tem sido a principal causa de problemas em vários animais. Foi relatado que animais terrestres mortos após o parto tinham sacolas de PE em seus intestinos, o que foi considerado a principal causa de sua morte (Venkatesh *et al.*, 2021).

A poluição por plástico é uma perturbação da biosfera muito recente. Os plásticos foram introduzidos nos ecossistemas naturais há apenas algumas décadas, um tempo insuficiente para que a natureza selecione novos sistemas enzimáticos capazes de degradar esses polímeros (Ali *et al.*, 2021; Jimenez *et al.*, 2022). Estima-se que a degradação natural de resíduos plásticos possa levar de dezenas a milhares de anos, variando de acordo com o tipo de plástico e as circunstâncias ambientais específicas (Jimenez *et al.*, 2022; Taghavi *et al.*, 2021).

Todos os plásticos são suscetíveis a algum tipo de degradação no meio ambiente, seja ela físico-química ou biológica. No âmbito físico-químico, incluem-se processos como intemperismo (degradação pela exposição à luz solar, vento ou ondas), hidrólise e oxidação. Tais fenômenos afetam todos os tipos de plásticos e são o principal mecanismo responsável pela geração dos microplásticos e nanoplásticos (MNPs). Os microplásticos são partículas plásticas com dimensões entre 1 µm e 5 mm, enquanto os nanoplásticos são menores que 1 µm. Essas partículas apresentam uma diversidade de tipos, tamanhos, formas e composições poliméricas (Filiciotto; Rothenberg, 2021; Miri *et al.*, 2022).

Os MNPs possuem uma alta relação entre área de superfície/volume e hidrofobicidade, o que permite que absorvam outras substâncias poluentes nocivas e persistentes (Jimenez *et al.*, 2022). Os MNPs podem conter substâncias incorporadas durante a sua fabricação, como pigmentos, plastificantes e retardantes de chama, ou acumuladas durante sua interação com o ambiente, como patógenos, hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (PAHs) e metais pesados (Miri *et al.*, 2022). Portanto, a sua presença no meio ambiente representa potenciais impactos na saúde de diversos ecossistemas e de seus organismos.

Os MNPs atualmente se encontram disseminados por ecossistemas terrestres e aquáticos, sendo transportados pelas correntes oceânicas e atmosféricas (Mohanan *et al.*, 2020). Sua presença é abrangente, desde o sedimento das profundezas dos oceanos até áreas remotas em montanhas, onde se depositam como uma espécie de "neve" plástica (Gambarini *et al.*, 2021). Atualmente, muitos ecossistemas em todo o mundo estão ameaçados pela poluição por plásticos, como, por exemplo, oceanos, água doce, manguezais, recifes de coral, solos agrícolas,

florestas, regiões polares e a atmosfera (Jimenez *et al.*, 2022).

Os plásticos têm a capacidade de induzir transformações nos ecossistemas terrestres, agindo como estressores e agentes antropogênicos (Ren *et al.*, 2020). Os impactos dos plásticos nos ecossistemas terrestres se estendem profundamente, acarretando potenciais consequências significativas para a saúde do ambiente como um todo.

O descarte inadequado de embalagens usadas e sacolas plásticas impede a permeabilidade da água e do ar no solo, levando ao esgotamento dos lençóis freáticos e exercendo efeitos adversos sobre a fauna do solo (Shankar *et al.*, 2019). Nas áreas de despejo, os animais terrestres geralmente consomem resíduos de sacolas plásticas junto com alimentos, o que perturba seus sistemas digestivos, resultando na morte de milhões de animais (Khruengsai; Sripahco; Pripdeevech, 2021).

Os relatos do estudo do sistema digestivo de vacas mortas demonstram o impacto do consumo de PE por estes animais (Venkatesh *et al.*, 2021). Foi relatado que sacolas de PE ingeridas causam indigestão, ao bloquear a mistura do alimento com sucos gástricos e enzimas. O bloqueio da abertura entre o rúmen e o omaso se torna altamente fatal para o animal, se o PE não for removido. Além disso, os sais digestivos reagem com o PE e formam complexos que obstruem o caminho dos alimentos no trato digestivo, causando irritação no rúmen e dor devido à imunossupressão. O plástico acumulado no canal alimentar reduz a imunidade e pode levar a infecções secundárias, como a septicemia hemorrágica (Venkatesh *et al.*, 2021).

Nos sistemas agrícolas, o PE é utilizado para a cobertura (mulching) de campos e na construção de estufas (Ghatge *et al.*, 2020). O uso do PE para aumentar a produtividade agrícola em pequenas áreas reduz a mobilidade de materiais essenciais no solo, como ar, umidade e nutrientes, bem como a mobilidade de organismos do solo, incluindo minhocas. Isso leva a uma diminuição na qualidade do solo, distúrbios fisiológicos no crescimento das plantas, como germinação de sementes e crescimento das raízes, afetando diretamente a produtividade agrícola (Ghatge *et al.*, 2020).

A presença crescente de MNPs no ambiente agrícola representa um problema ambiental de significativa gravidade, com implicações tanto para a saúde do solo quanto para a produção de alimentos. A presença dos MNPs no solo pode impactar a teia trófica, com consequências adversas para o desenvolvimento das raízes das culturas agrícolas (Ren *et al.*, 2020). Os MNPs também podem se acumular nos tecidos vegetais, afetando diretamente a fotossíntese, resultando em efeitos adversos na produtividade das plantas, e, por consequência, na produção agrícola (Allouzi *et al.*, 2021).

As partículas de MNPs têm a capacidade de se incorporar aos agregados do solo,

desencadeando alterações estruturais significativas. Essas mudanças estruturais têm o potencial de afetar profundamente as propriedades do solo, perturbando processos delicados, como as atividades microbianas, a emissão de gases de efeito estufa e os ciclos de nutrientes (Ren *et al.*, 2020).

Os MNPs têm o potencial de influenciar a temperatura do solo, especialmente em setores agrícolas suscetíveis a condições climáticas extremas. Essas mudanças térmicas podem afetar as taxas de decomposição no solo e, por conseguinte, os benefícios ecossistêmicos a elas associados (Kumar *et al.*, 2021).

As alterações nos parâmetros físico-químicos do solo pelos MNPs também podem ter um impacto notável em áreas florestais, desencadeando erosão, incêndios florestais e desertificação em níveis sem precedentes (Kumar *et al.*, 2021). Essas consequências podem levar a uma imensa perda de biodiversidade e a um declínio nos serviços ecossistêmicos. Portanto, biomas florestais, como a Amazônia, podem estar altamente vulneráveis aos impactos da contaminação do solo por plásticos.

Na região Amazônica, rica em ecossistemas fluviais, a poluição plástica também se faz presente. No Estado do Amazonas, localizado na Amazônia brasileira, os solos dos municípios e comunidades são inteiramente drenados por rios e córregos, estes denominados igarapés (Souza; Silva; Oliveira, 2023). Recentemente, foi relatada a presença de microplásticos no igarapé do Mindu, localizado na região metropolitana de Manaus, e em peixes comercializados no município de Itacoatiara (Azevedo, 2023; Souza; Silva; Oliveira, 2023). Também foram detectados microplásticos tanto nos sedimentos de rios como Solimões, Negro e Amazonas, como nos tratos digestivos e nas brânquias de pelo menos quatorze espécies de peixes coletados em doze rios de água doce da Bacia Amazônica (Gerolin *et al.*, 2020; Ribeiro-Brasil *et al.*, 2020).

Figura 3. Tracajás em meio à poluição no Igarapé do Mindu, em Manaus-AM.



Fonte: Em Tempo (2021).

Dos ambientes impactados pela poluição por plástico, os sistemas fluviais se destacam por exercer protagonismo no transporte de resíduos plásticos descartados e outros poluentes aos oceanos, principalmente por estarem em conexão íntima com o ambiente terrestre (Souza; Silva; Oliveira, 2023). Anualmente, apenas o rio Amazonas deposita 38.900 toneladas de resíduos plásticos no oceano Atlântico, oriundos do lixo e dos poluentes descartados nos igarapés (Souza; Silva; Oliveira, 2023). Apesar da importância dos ecossistemas de água doce no problema da poluição por plásticos, os sistemas fluviais menores são menos estudados em comparação aos grandes rios e ecossistemas marinhos, onde a presença dos plásticos e seu impacto são bem documentados (Souza; Silva; Oliveira, 2023).

A poluição plástica nos oceanos é uma preocupação global, manifestando-se em todas as partes do mundo e exibindo uma concentração de aproximadamente 580.000 fragmentos plásticos por quilômetro quadrado (Bahl *et al.*, 2020). Cerca de 12,7 milhões de toneladas de plástico chegam aos oceanos anualmente, o que equivale a cerca de 4,6% do total de resíduos plásticos gerados por 192 países costeiros (Sáenz *et al.*, 2019).

A predominância dos plásticos no lixo marinho é notável, representando 62,31% da composição geral, contribuindo para 49% do lixo no leito oceânico e 81% do material suspenso na superfície (Santacruz-Juárez *et al.*, 2021). Em regiões marinhas onde estão reunidas grandes quantidades de lixo por ação das correntes oceânicas, a grande massa de plástico suspensa na água resulta na atenuação da transmissão de luz solar na superfície do mar, afetando negativamente a eficiência fotossintética das microalgas e a produtividade dos organismos

marinhos (Ghatge *et al.*, 2020).

Os impactos dos resíduos plásticos na vida oceânica são vastos, afetando mais de 600 espécies marinhas, desde microrganismos até baleias, predominantemente por meio da ingestão (Bahl *et al.*, 2020). Nos animais marinhos, os impactos podem ser aparentes, como emaranhamento, impedimento da alimentação e morte, ou imperceptíveis, como alterações comportamentais ou redução de aptidão reprodutiva (Bahl *et al.*, 2020).

A jornada dos MNPs nos oceanos inclui a absorção por organismos filtradores e plânctons, os quais, por sua vez, são ingeridos por diversos grupos de animais, como peixes, mamíferos, crustáceos e moluscos, gerando a bioacumulação de partículas plásticas na teia trófica (Sharma, 2018). Eventualmente, essas partículas e suas toxinas associadas contaminam os seres humanos (Sharma, 2018). Até o presente momento, MNPs já foram identificados em uma grande variedade de tecidos e fluidos humanos, como pele, sangue, saliva, rins, fezes, fígado, pulmões, placenta, baço, intestino, escarro, cabelo, leite materno, mecônio e coração (Kutralam-Muniasamy *et al.*, 2023; Yang *et al.*, 2023; Zhu *et al.*, 2023).

Produtos químicos e aditivos suplementares frequentemente são adicionados aos polímeros plásticos para aumentar a qualidade dos produtos finais. Esses aditivos, como bisfenol A, bisfenol S, octilfenol e nonilfenol, compostos semelhantes a dioxina e metais pesados, podem causar efeitos negativos na saúde humana e de outros organismos. Anormalidades reprodutivas, perturbação do sistema endócrino, diabetes e obesidade podem estar relacionados à presença de aditivos em plásticos (Temporiti *et al.*, 2022).

Os impactos do consumo e exposição aos microplásticos por longos períodos de tempo na saúde humana ainda não são totalmente compreendidos, porém podem incluir alterações cromossômicas e também podem levar à obesidade, infertilidade e até ao câncer (Bahl *et al.*, 2020; Stapleton, 2021). Investigações em linhagens celulares humanas revelaram que a exposição a microplásticos causa respostas inflamatórias, inibe o crescimento celular, provoca mudanças na morfologia celular e alterações na microbiota intestinal (Kutralam-Muniasamy *et al.*, 2023).

Além dos impactos na saúde humana, a poluição plástica também causa significativos impactos socioeconômicos. O lixo plástico causa desconforto visual em jardins, praias e espaços públicos, tornando-os esteticamente menos agradáveis e indiretamente aumentando os custos sociais devido à contaminação e poluição (Kumar *et al.*, 2021). Globalmente, o lixo plástico causa perdas econômicas nos setores de turismo, pesca e transporte marítimo. Esses impactos tornam o custo futuro para a remediação de todos os plásticos dos diferentes ecossistemas financeiramente inviável e dispendioso (Kumar *et al.*, 2021).

O impacto global do plástico é tão acentuado que contribuiu para a definição do Antropoceno, uma era geológica marcada pela atividade humana em que o lixo plástico se tornou uma característica distintiva (Gambarini *et al.*, 2021; Kumar *et al.*, 2021). O uso e o tratamento de resíduos plásticos se tornaram um problema global. Portanto, é de necessidade inevitável minimizar o uso do PE e de outros plásticos e desenvolver métodos eficientes para manejar os plásticos e seus impactos (Ghatge *et al.*, 2020).

2.4. Métodos de descarte e manejo de plásticos

Os principais métodos atualmente empregados para o manejo e descarte de plásticos abrangem várias abordagens, como a deposição em aterro sanitário, a incineração e a reciclagem. Além desses métodos convencionais, também existem alternativas emergentes, como a produção de plásticos biodegradáveis e bioplásticos, e a aplicação da biodegradação para remediação de áreas contaminadas (Jimenez *et al.*, 2022; Mishra; Das; Kandali, 2020).

Nos aterros sanitários, os plásticos e outros resíduos sólidos são enterrados em uma cova fechada com camadas espessas de proteção para minimizar a lixiviação no solo e nos lençóis freáticos (Taghavi *et al.*, 2021). Nos países em desenvolvimento, o aterramento ainda é o método de descarte preferido para resíduos plásticos devido às suas vantagens como opção de baixo custo de gerenciamento de resíduos (Ali *et al.*, 2021).

Figura 4. Aterro sanitário municipal de Manaus–AM.



Fonte: A Crítica (2018).

A implementação de aterros sanitários requer vários hectares de terra, porque a degradação dos plásticos aterrados pode se estender por muitos séculos (Chaudhary *et al.*, 2021). A persistência dos resíduos plásticos nos aterros por tanto tempo se deve principalmente à disponibilidade limitada de oxigênio, criando uma condição anaeróbica (Mishra; Das; Kandali, 2020). Devido à falta de luz e oxigênio, a degradação dos plásticos via foto-oxidação e oxidação térmica não é viável (Taghavi *et al.*, 2021).

Embora as condições dos aterros sanitários possam estimular os microrganismos anaeróbicos, a degradação dos plásticos por essa via é quase nula devido à produção de energia ser muito baixa em relação à condição aeróbica (Taghavi *et al.*, 2021). Um estudo demonstrou que o polietileno, quando enterrado em condições anaeróbicas, não sofreu degradação, mantendo sua massa e propriedades mecânicas inalteradas mesmo após um período de incubação de 72 dias (Iwanczuk *et al.*, 2015).

A incineração é um processo térmico no qual ar e altas temperaturas (mais de 800 °C) são usados para reduzir mais de 90% dos resíduos plásticos, com consequente produção de energia (Taghavi *et al.*, 2021). Quando aplicada com a finalidade de recuperação de energia, a incineração é denominada “reciclagem quaternária” (Chen *et al.*, 2021). A incineração geralmente é considerada uma alternativa eficaz para lidar com o problema do plástico; no entanto, esse processo também tem impactos negativos no meio ambiente devido à liberação de poluentes na atmosfera (Ali *et al.*, 2021).

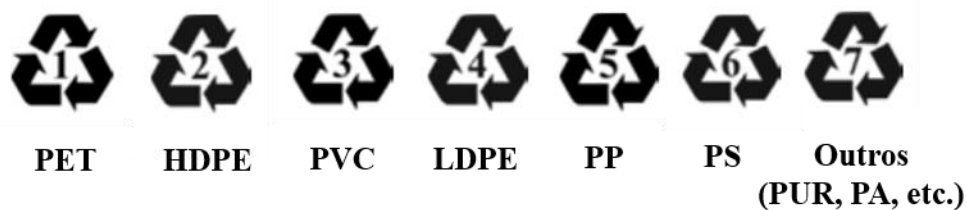
A combustão incompleta de plásticos e de outros resíduos sólidos municipais pode causar sérios problemas de saúde devido à formação de gases tóxicos, como dioxinas ($C_4H_8O_2$), furanos (C_4H_4O), monóxido de carbono (CO), dióxido de carbono (CO_2), sulfeto de hidrogênio (H_2S), metais pesados e hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (PAHs) (Taghavi *et al.*, 2021). Um estudo demonstrou que apenas a incineração do PE produz cerca de 460 mg/Kg de PAHs, quantidade suficiente para causar problemas carcinogênicos em humanos (Li *et al.*, 2001).

Devido à presença de plásticos nos resíduos urbanos, muitos países não permitem a sua incineração. Em vez disso, os plásticos são eliminados através de queimas abertas e descontroladas e de deposição em aterros sanitários (Alshehrei, 2017). As desvantagens ambientais significativas do descarte de plástico por meio de aterros sanitários e de incineração estimularam o desenvolvimento dos processos de reciclagem de plástico (Mishra; Das; Kandali, 2020).

Os plásticos mais comuns podem ser classificados em sete categorias de acordo com os códigos de reciclagem da Society of the Plastics Industry (SPI), de 1 a 7 (Chen *et al.*, 2021)

(Figura 5). Após serem coletados e classificados no centro de reciclagem, os resíduos plásticos de diferentes tipos passam por diferentes estratégias de reciclagem para desbloquear seu valor potencial. Atualmente, existem quatro métodos diferentes de reciclagem de plásticos, referidos como "reciclagem primária", "reciclagem secundária", "reciclagem terciária", e "reciclagem quaternária" (Chen *et al.*, 2021).

Figura 5. Códigos de reciclagem dos polímeros plásticos.



Fonte: O autor (2023).

Tanto a reciclagem primária quanto a reciclagem secundária podem ser chamadas de reciclagem mecânica, onde os plásticos são classificados, lavados, triturados, derretidos e remodelados. A principal diferença entre as duas é que a reciclagem mecânica primária trata apenas de plásticos não contaminados, como resíduos de polímeros pós-industriais ou resíduos pós-consumidor de origem conhecida, para produzir produtos com qualidades e propriedades semelhantes às do plástico original. Um exemplo deste tipo de reciclagem é a produção de garrafas plásticas a partir de uma mistura de PET reciclado e PET virgem (Chen *et al.*, 2021).

A reciclagem mecânica secundária, por sua vez, é o principal processo empregado em escala industrial para reciclar plásticos pós-consumidor que contêm contaminantes, incluindo resíduos de alimentos, corantes e aditivos, bem como outros plásticos. No entanto, os produtos feitos dessa maneira frequentemente têm suas propriedades seriamente deterioradas em decorrência dos processos empregados na sua produção, como, por exemplo, reações de reticulação, reações de quebra de cadeia causadas por degradação térmica, ácidos residuais e incompatibilidade com outros plásticos (Chen *et al.*, 2021).

A presença de aditivos e contaminantes nos polímeros diminui tanto o rendimento quanto a qualidade do produto recuperado durante o processo de reciclagem mecânica, acarretando riscos potenciais à saúde (Mishra; Das; Kandali, 2020). As propriedades físico-químicas da maioria dos plásticos são seriamente comprometidas após muitos ciclos de reciclagem, e, assim, o valor comercial dos polímeros produzidos é eventualmente limitado (Ali *et al.*, 2021).

Uma abordagem versátil em constante evolução para combater o desafio global do plástico é a reciclagem terciária, também conhecida como reciclagem química. Estratégias químicas, como a glicólise e a pirólise, têm o potencial de expandir os tipos de plásticos reciclados e converter polímeros pós-consumo em seus monômeros originais, oligômeros ou novas matérias-primas químicas. A despolimerização de plásticos reciclados pode gerar monômeros iniciais, e sua repolimerização pode produzir materiais com qualidades de grau virgem, desde que os monômeros tenham uma pureza suficiente (Chen *et al.*, 2021).

Atualmente, somente polímeros que contêm oxigênio em sua cadeia, como poliésteres, policarbonatos e poliamidas, podem ser facilmente despolimerizados em monômeros por meio de ataques nucleofílicos na ligação C=O para facilitar a quebra da ligação C-O ou C-N (Chen *et al.*, 2021). Esse processo também é chamado de solvólise, e, dependendo do grupo funcional alvo, pode ser subdividido em hidrólise, alcoólise, metanólise, glicólise, fosforólise, amonólise e aminólise, por exemplo (Chen *et al.*, 2021).

Em contraste, alguns polímeros não podem ser facilmente despolimerizados em seus monômeros originais por meio de reações de síntese reversa. Além disso, alguns métodos de reciclagem química ainda são intensivos em energia e não são seletivos, resultando em misturas complexas de óleos, ceras, gases e carvão, que precisam ser processadas posteriormente. O progresso na reciclagem de polímeros que contém apenas ligações C-C em sua cadeia principal, como PE, PP, PVC e PS, é muito mais lento devido ao alto consumo de energia (Chen *et al.*, 2021).

Na reciclagem quaternária, realizada por incineração, os plásticos descartados são queimados para gerar calor para a geração de eletricidade, pois possuem um valor de aquecimento alto, entre 20 e 40 MJ/Kg, que é comparável ao do petróleo bruto (45 MJ/Kg) (Chen *et al.*, 2021). A recuperação de energia por meio da incineração de resíduos plásticos é adotada por muitos países para economizar espaço em aterros sanitários e fornecer algum benefício ambiental, compensando a produção de energia à base de combustíveis fósseis. No entanto, essa abordagem é altamente controversa devido à baixa eficiência na recuperação de energia, juntamente com o risco de emissões perigosas de compostos potencialmente carcinogênicos e gases de efeito estufa. Além disso, a distribuição desigual de usinas de incineração pode levantar preocupações sobre justiça ambiental (Chen *et al.*, 2021).

Dentre os sete códigos de reciclagem SPI para plásticos, o PET e o PE são os polímeros mais reciclados (Chen *et al.*, 2021). A coleta seletiva, seguida de triagem mecânica e reciclagem, tornou-se gradualmente o método preferencial para a reutilização dos resíduos de termoplásticos (Ali *et al.*, 2021). No entanto, os seus processos de reciclagem são dispendiosos

e relativamente ineficientes, principalmente devido à presença de aditivos e impurezas nos plásticos e à redução da qualidade dos produtos finais (Mishra; Das; Kandali, 2020).

Um estudo recente quantificou a substitutibilidade de PE reciclado em diferentes aplicações. Fatores de qualidade de reciclagem e valores de substitutibilidade foram calculados para três tipos de PE reciclado em quatro categorias de aplicação: filme, garrafa, injetado rígido e injetado flexível. Os resultados variaram de bons a excelentes para as aplicações previstas, mas mostraram baixa substitutibilidade em outras aplicações, indicando funcionalidade significativamente reduzida, ou até mesmo inadequação (Demets *et al.*, 2021).

A reciclagem é considerada uma estratégia viável para lidar com o PE; no entanto, os dados sobre as taxas de reciclagem mostram que apenas cerca de 10% do HDPE e 6% do LDPE são adequadamente reciclados (Spina *et al.*, 2021). Infelizmente, a atual taxa geral de reciclagem de plásticos é decepcionantemente baixa (Chen *et al.*, 2021). No Brasil, estima-se que em 2020 apenas 23,1% dos plásticos produzidos foram reciclados, o restante tendo como destino aterros sanitários, lixões a céu aberto, vias públicas, solo e corpos hídricos (Queiroz *et al.*, 2022).

O impacto negativo do acúmulo de plásticos pós-consumo pode ser minimizado substituindo os plásticos sintéticos por plásticos biodegradáveis, e por bioplásticos (Bacha *et al.*, 2023; Jimenez *et al.*, 2022). Os plásticos biodegradáveis são polímeros desenvolvidos com o propósito de se degradarem em ambientes naturais ou unidades de tratamento de resíduos biológicos, apresentando potencial para novas abordagens na gestão de resíduos (Alshehrei, 2017).

Os plásticos biodegradáveis podem ser derivados tanto de biomassa quanto de petróleo (Jimenez *et al.*, 2022). Atualmente, diversas indústrias locais têm fabricado sacolas plásticas biodegradáveis ou parcialmente biodegradáveis, utilizando aditivos como carboidratos, como o amido. Esses materiais se degradam quando expostos à radiação UV e também são suscetíveis à decomposição por microrganismos (Bahl *et al.*, 2020).

Os bioplásticos, por sua vez, são materiais inteiramente ou parcialmente derivados de biomassa ou outras fontes renováveis, como culturas alimentares, mantendo a mesma função dos plásticos convencionais (Chia *et al.*, 2020). Os bioplásticos podem desempenhar um papel vital no desenvolvimento sustentável de uma sociedade, pois utilizam recursos renováveis, reduzem as emissões de CO₂ durante a sua fabricação e têm um menor impacto no ambiente após o descarte (Bacha *et al.*, 2023).

Os bioplásticos podem ser compostos por diversos materiais com propriedades distintas e são geralmente divididos em três grupos principais: 1. Plásticos baseados em biomassa, não-

biodegradáveis, como PE, PP, PET, politereftalato de trimetileno (PTT) ou elastômeros de poliéster (TPC-ET); 2. Plásticos baseados em biomassa e degradáveis, como ácido polilático (PLA), PHA, amido, celulose; 3. Plásticos derivados de recursos fósseis, mas biodegradáveis, como poliadipato de butileno tereftalato (PBAT) (Chia *et al.*, 2020).

Diversas fontes biológicas podem ser empregadas na fabricação de bioplásticos, notavelmente culturas agrícolas como milho, trigo, proteínas de soja, proteínas do leite, colágeno e gelatina (Chia *et al.*, 2020). Contudo, a utilização dessas matérias-primas levanta questões sobre a sua sustentabilidade, especialmente em relação à competição pelos recursos terrestres e hídricos para o consumo humano. Além disso, a extração de compostos, sobretudo polímeros de plantas para a síntese de bioplásticos, é desafiada pela presença da parede celular vegetal (Chia *et al.*, 2020).

A taxa de sucesso na substituição dos plásticos tradicionais por plásticos biodegradáveis ainda é limitada, devido às suas estruturas complexas e ao conhecimento limitado sobre as condições ideais para a sua degradação rápida e eficiente (Mishra; Das; Kandali, 2020). Além disso, a produção global de plásticos biodegradáveis ainda é restrita, estimada em apenas cerca de 4 milhões de toneladas (Bahl *et al.*, 2020).

Embora a tecnologia dos bioplásticos possibilite a redução da produção de plásticos sintéticos, ela não representa uma solução melhor para a lenta taxa de degradação destes últimos e seu acúmulo na natureza (Ekanayaka *et al.*, 2022). Como alguns bioplásticos não são biodegradáveis e outros se degradam naturalmente até certo ponto, também será necessário estudar e desenvolver métodos de biodegradação efetivos para eles, assim como para os plásticos sintéticos (Ekanayaka *et al.*, 2022).

A variedade de métodos empregados para manejar os resíduos plásticos evidencia a busca do ser humano por soluções para minimizar os efeitos nocivos causados pelo acúmulo destes polímeros. Neste sentido, a biodegradação surgiu como alternativa de manejo que busca abordar esta problemática de modo a contornar as limitações e impactos sócio-econômicos e ambientais dos métodos convencionais.

2.5. Biodegradação de plásticos – Aspectos gerais

A degradação de plásticos é um processo que envolve mudanças nas propriedades do polímero, acompanhadas por uma perda de funcionalidade devido a processos químicos, físicos e biológicos. Isso resulta na quebra das ligações das cadeias poliméricas (Oliveira *et al.*, 2023). A degradação é limitada e depende das características do plástico, além de fatores bióticos e abióticos.

A degradação abiótica pode ser subdividida em várias categorias, como fotodegradação (causada pela luz), degradação térmica (devido ao calor), degradação mecânica (por forças externas) e degradação química (incluindo hidrólise e oxidação) (Oliveira *et al.*, 2023).

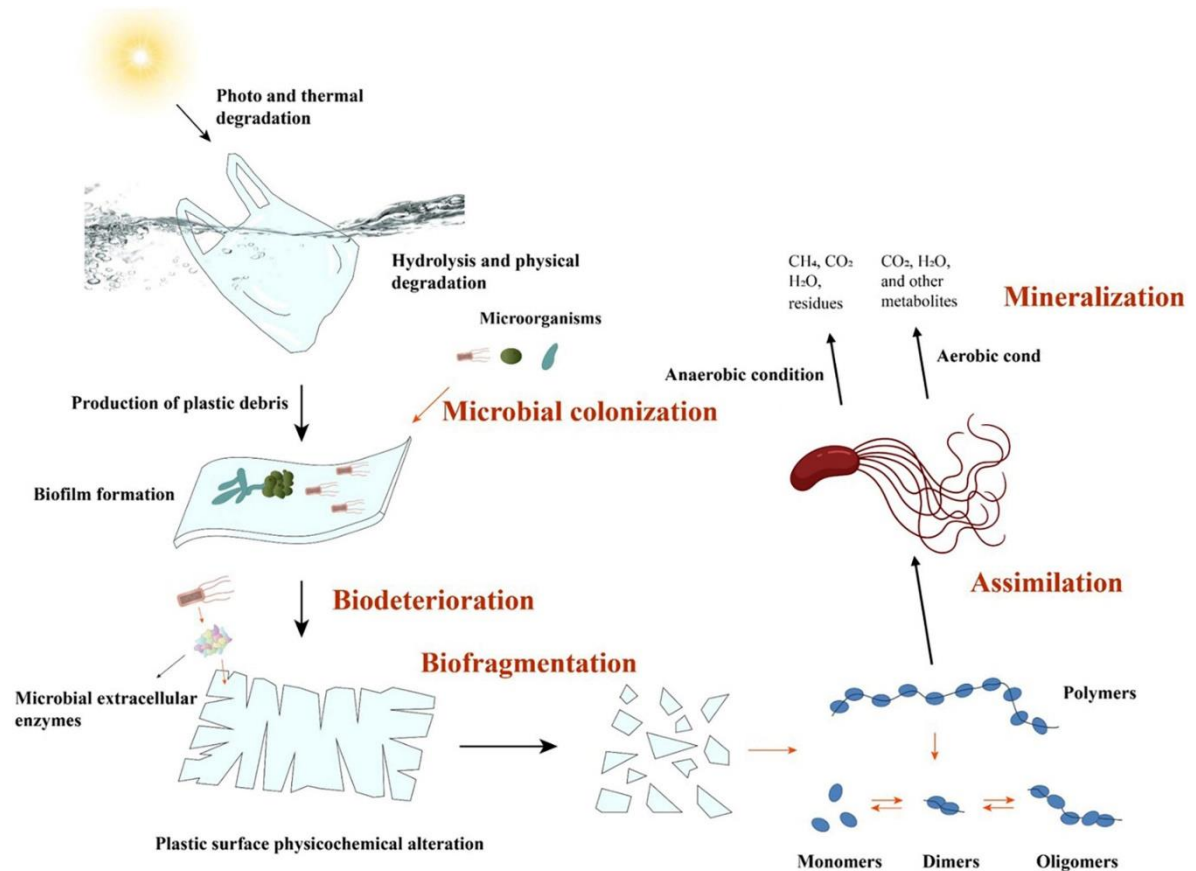
A degradação biótica, ou biodegradação, por outro lado, é definida como o processo que envolve a decomposição de um material por organismos vivos, principalmente microrganismos, onde as cadeias poliméricas servem como substrato orgânico. Nesse processo, os monômeros que compõem o plástico passam por modificações através da mineralização, transformando-se através do metabolismo do organismo (Oliveira *et al.*, 2023; Yasin; Akkermans; Van Impe, 2022).

A biodegradação de plásticos normalmente ocorre em quatro etapas: biodeterioração, biofragmentação, bioassimilação e mineralização (Mohanani *et al.*, 2020; Zhang *et al.*, 2023) (Figura 6). Durante a biodeterioração, os microrganismos colonizam o plástico, formando um biofilme ou uma rede micelial. Nesta fase, ocorre uma degradação superficial, fragmentando o plástico em partículas menores.

A biofragmentação ocorre quando os microrganismos secretam enzimas extracelulares, catalisando as cadeias poliméricas em oligômeros, dímeros ou monômeros. Na etapa de bioassimilação, as moléculas resultantes da biofragmentação são absorvidas pela célula microbiana, levando à produção de metabólitos.

Finalmente, na mineralização, esses metabólitos são transformados e entram no ciclo do ácido cítrico (Ciclo de Krebs) para geração de energia, biomassa e produtos metabólicos, enquanto os microrganismos entram em uma fase de escassez (La Fuente; Maniglia; Tadini, 2022; Mohanani *et al.*, 2020). A biodegradação é considerada completa apenas quando ocorre a mineralização (Yasin; Akkermans; Van Impe, 2022).

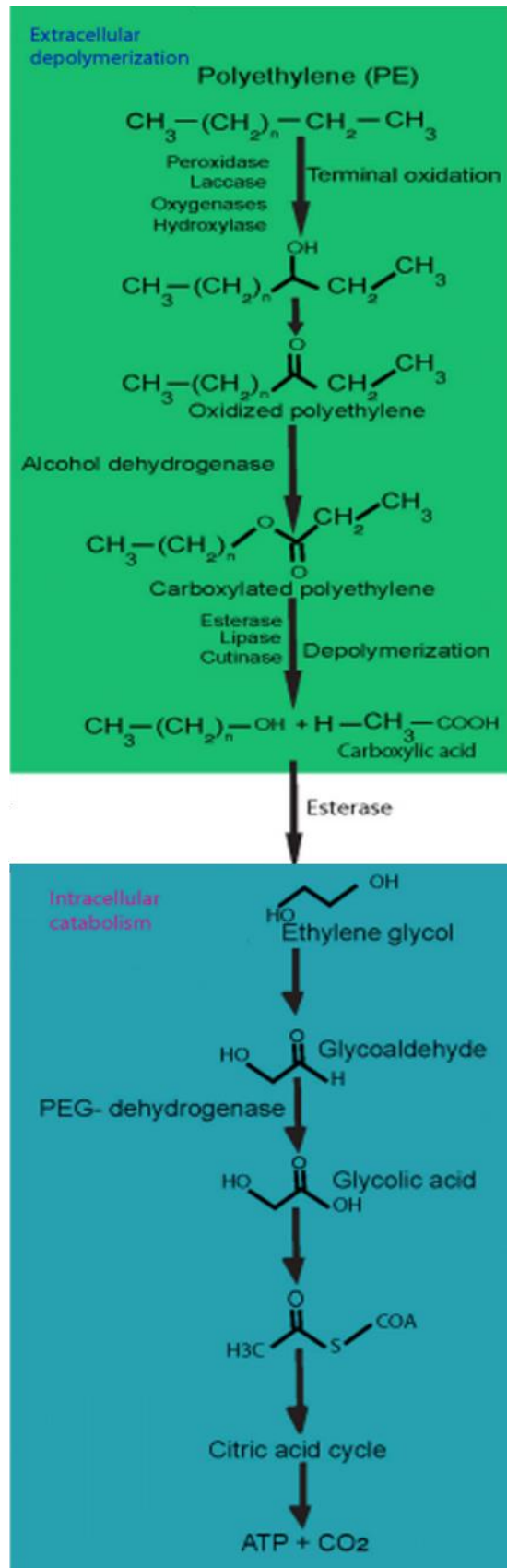
Figura 6. Etapas da biodegradação microbiana de plásticos.



Fonte: Zhang et al. (2023).

O processo catabólico dos plásticos envolve etapas sequenciais com diferentes compostos monoméricos, como etilenoglicol, ácido adípico, ácido tereftálico (TPA) e metilenodianilina (MDA), que podem facilmente entrar nas células microbianas (Okal *et al.*, 2023). Esses compostos são então atacados por oxidases e hidrolases intracelulares produzidas por vacúolos no citosol, sendo convertidos em acetil-CoA, um metabólito crucial que entra no ciclo do ácido cítrico, onde é oxidado para gerar energia (ATP), e produtos metabólicos finais (Okal *et al.*, 2023) (Figura 7).

Figura 7. Via metabólica de degradação fúngica de Polietileno.



Fonte: Adaptado de Okal *et al.* (2023).

Na biodegradação aeróbica, que ocorre na presença de oxigênio, os polímeros são convertidos em CO₂, H₂O e biomassa. Na biodegradação anaeróbica, na ausência de oxigênio, os produtos finais incluem CH₄, CO₂, H₂O e biomassa (La Fuente; Maniglia; Tadini, 2022; Oliveira *et al.*, 2023). Plásticos geralmente se degradam aerobicamente na natureza, anaerobicamente em sedimentos e aterros sanitários, e parcialmente aerobicamente no solo (Alshehrei, 2017).

As propriedades físico-químicas dos plásticos tornam sua biodegradação desafiadora, pois eles são um substrato de crescimento fraco, que requer uma quantidade maior de energia para despolimerizar (Ali *et al.*, 2021; Jimenez *et al.*, 2022). No entanto, certos microrganismos têm mostrado potencial para degradar rapidamente polímeros sob condições de estresse, produzindo enzimas como proteases, lipases e cutinases, entre outras (Mishra; Das; Kandali, 2020).

Quando expostos a uma pressão seletiva alta, os microrganismos tendem a evoluir muito rapidamente devido à sua alta plasticidade genômica, versatilidade, capacidade de trocar eficientemente materiais genéticos e de combinar adequadamente as vias catabólicas desejadas (Okal *et al.*, 2023).

Devido à produção em massa e ao descarte de plásticos desde a década de 1950, Jimenez *et al.* (2022) sugerem que as enzimas microbianas que naturalmente degradam substratos orgânicos como a lignocelulose evoluíram e adaptaram novas estratégias para atuar nos plásticos.

Ainda existem muitas questões em aberto sobre a evolução de microrganismos que degradam plásticos e suas enzimas. No entanto, a maioria dos geneticistas microbianos apoia o conceito de enzimas já existentes terem mudado e adquirido a capacidade de quebrar ligações de polímeros plásticos (Okal *et al.*, 2023).

Considerando que os microrganismos também demonstraram ter adquirido exclusivamente a capacidade de metabolizar poluentes antropogênicos usados na agricultura (como pesticidas e herbicidas) por meio da evolução, a ideia de uma mudança evolutiva que auxiliou as enzimas microbianas a utilizar substratos sintéticos tem sido bem aceita e atualmente é considerada uma explicação aceitável para o fenômeno da biodegradação de plásticos (Okal *et al.*, 2023).

Entre outras estratégias para reduzir os impactos negativos dos plásticos à base de petróleo na biosfera, a exploração da diversidade microbiana para atividades de transformação de plásticos é um tópico oportuno e altamente relevante em todo o mundo (Jimenez *et al.*, 2022). A transformação microbiana de polímeros sintéticos é amplamente discutida pela comunidade

científica. No entanto, a nossa compreensão ecológica e mecanicista holística da transformação de plásticos por comunidades microbianas e suas enzimas ainda está em seus estágios iniciais (Jimenez *et al.*, 2022).

As pesquisas científicas em biodegradação do polietileno e outros plásticos podem ser divididas em três vertentes. A biodegradação é estudada em: 1. Laboratório, com o plástico sendo cultivado com microrganismos em meio artificial e condições controladas e definidas; 2. Enterro simulado, ainda realizado em laboratório, mas com o plástico sendo enterrado em meio complexo constituído de amostras ambientais como solo ou composto, e condições controladas; e 3. Campo, com o plástico enterrado em diferentes tipos de solo e em condições naturais (Haider *et al.*, 2018; Montazer; Najafi; Levin, 2020).

Cada abordagem de estudo da biodegradação apresenta vantagens e desvantagens. Os estudos de enterro simulado e de campo possuem maior relevância prática por estarem mais próximos das condições naturais de biodegradação, mas são mais difíceis de monitorar e avaliar. Os estudos laboratoriais, por sua vez, estão mais distantes das condições reais de degradação devido à sua ambientação artificial, portanto têm menor relevância prática. No entanto, as suas condições controladas e bem definidas permitem uma melhor compreensão dos mecanismos moleculares envolvidos na biodegradação do PE e de outros plásticos (Haider *et al.*, 2018). Nesse sentido, os estudos laboratoriais têm sido mais abundantes na literatura científica.

Os estudos laboratoriais de degradação de polietileno e outros plásticos em geral são realizados através do cultivo de amostras do plástico com microrganismos isolados ou consórcios de microrganismos em fermentação submersa (Perera *et al.*, 2022; Shanahwaz *et al.*, 2019). Menos frequentemente, alguns experimentos também são realizados em meio sólido (Brunner *et al.*, 2018; Munir *et al.*, 2018). O meio de cultura empregado em geral é composto de sais minerais e as fontes de nitrogênio e carbono são significativamente limitadas ou ausentes, de modo a estimular o uso do plástico pelos microrganismos como fonte de energia.

Segundo Okal e colaboradores (2023), o pré-tratamento do plástico com fatores abióticos como radiação UV e calor e o uso de surfactantes como Tween 80 podem acelerar o processo de degradação, facilitando o acesso dos microrganismos às cadeias poliméricas dos plásticos. O pré-tratamento inicia a degradação e cria pontos de acesso para a ação das enzimas microbianas na estrutura do polímero, enquanto o surfactante aumenta a solubilidade dos plásticos mais hidrofóbicos (Okal *et al.*, 2023). Variavelmente, estudos de degradação tem empregado estas abordagens para acelerar os experimentos (Gomez-Méndez *et al.*, 2018; Iiyoshi; Tsutsumi; Nishida, 1998).

A biodegradação de plásticos é um processo complexo e sequencial, onde cada estágio é influenciado por uma gama de fatores bióticos e abióticos. Portanto, não há uma metodologia única capaz de avaliar com precisão o processo em sua totalidade. Dessa forma, múltiplos métodos analíticos são empregados para avaliar e evidenciar os diferentes estágios da biodegradação.

Segundo Alshehrei (2017), em linhas gerais, exemplos de diferentes metodologias empregadas nos estudos de biodegradação incluem:

1. Observações visuais: A avaliação de mudanças visíveis em plásticos pode ser realizada em quase todos os testes. Os efeitos usados para descrever a degradação incluem o enrugamento da superfície, formação de buracos ou rachaduras, desfragmentação e mudanças na cor ou formação de biofilmes na superfície. Essas mudanças não comprovam a presença de um processo de biodegradação em termos de metabolismo, mas o parâmetro de mudanças visuais pode ser usado como uma primeira indicação de ataque microbiano. Para obter informações sobre o mecanismo de degradação, observações mais sofisticadas podem ser feitas usando microscopia eletrônica de varredura (MEV), microscopia óptica de transmissão ou microscopia de força atômica (AFM);

2. Avaliação das mudanças nas propriedades físicas: Propriedades como densidade, ângulo de contato, viscosidade, distribuição de peso molecular, temperatura de fusão, temperatura de transição vítrea, e mudanças nas regiões cristalinas e amorfas podem ser medidas usando diversas técnicas analíticas, como, por exemplo, a difração de raios-X. A biodegradabilidade também é avaliada pela perda de peso, perda de resistência à tração, mudanças na elongação e mudanças na massa molar do polímero;

3. Avaliação das mudanças nas propriedades químicas: Em meios sintéticos, a formação ou desaparecimento de grupos funcionais no polímero podem ser medidas, principalmente por espectroscopia em infra-vermelho por transformada de Fourier (FTIR). O peso molecular e a distribuição do peso molecular dos produtos ou intermediários de degradação podem ser observados por técnicas como cromatografia em camada delgada (TLC), cromatografia gasosa acoplada à espectroscopia de massas (GCMS) e ressonância magnética nuclear (NMR);

4. Evolução de CO₂ e consumo de O₂: Em condições aeróbicas, os micróbios usam oxigênio para oxidar o carbono e formar dióxido de carbono como um importante produto metabólico. O consumo de oxigênio (teste de respirometria) ou a formação de dióxido de carbono (teste de strum) são os métodos mais comumente usados para avaliar a mineralização em testes de laboratório, pois fornece informações diretas sobre a bioconversão da estrutura de

carbono do polímero para produtos metabólicos. Quando são utilizados organismos anaeróbicos, a técnica de cromatografia gasosa pode ser utilizada para avaliar os gases produzidos pela bioconversão metabólica;

5. Marcação radioativa: é uma técnica usada principalmente para investigar materiais de degradação lenta em uma matriz que contenha fontes de carbono diferentes dos plásticos;

6. Teste de "zona clara": Este é um teste biológico simples no qual o polímero é disperso como partículas muito finas em meio sintético de ágar, o que resulta em uma aparência opaca no ágar. Após a inoculação com microrganismos, a formação de um halo claro ao redor da colônia indica que os organismos são pelo menos capazes de realizar a biodeterioração. Esse método é geralmente aplicado para rastrear organismos que podem degradar um determinado composto sintético.

Apesar da diversidade de metodologias laboratoriais empregadas, elas ainda não são adequadamente padronizadas e otimizadas, enfrentando dificuldades de reprodutibilidade de seus resultados (Jimenez *et al.*, 2022).

Embora apresente desafios e esteja em constante aprimoramento, a biodegradação ainda é vista como um método apropriado para eliminar plásticos do ambiente, proporcionando um descarte mais limpo e com impacto ambiental mínimo (Oliveira *et al.*, 2023). A degradação por processos microbianos e enzimáticos é uma estratégia promissora para despolimerizar resíduos plásticos em monômeros para reciclagem ou para mineralizá-los em dióxido de carbono, água e biomassa, enquanto produz bioprodutos de maior valor (Mohan *et al.*, 2020). A biodegradação, portanto, pode ser considerada a estratégia mais vantajosa para manejar os impactos do PE.

2.6. Biodegradação do polietileno – Desafios e perspectivas

O polietileno é um material notoriamente recalcitrante e inerte, o que o torna de difícil degradação no ambiente, mesmo após longos anos de sepultamento em aterros (Ghatge *et al.*, 2020). O PE e o PP são coletivamente conhecidos como poliolefinas, materiais inertes que não são propensos à degradação devido às suas estruturas hidrofóbicas, alto peso molecular e aos antioxidantes e estabilizadores adicionados durante sua fabricação (Mohan *et al.*, 2020). O PE é considerado não-biodegradável, como determinado por métodos de padrão internacional (por exemplo, ISO 17556, ISO 14851 e ASTM D6991) (Jimenez *et al.*, 2022).

A degradação do PE é mais complexa em comparação com outros tipos de plástico,

devido a três fatores principais: a estrutura linear de carbono, que confere ao polímero alta hidrofobicidade; a presença de antioxidantes e estabilizadores que proporcionam resistência à oxidação abiótica; e o elevado peso molecular, que dificulta o processo de degradação (Sangale; Shahnawaz; Ade, 2019).

Dentre os tipos de PE, o HDPE é considerado mais recalcitrante devido ao seu processo de fabricação catalítico e à sua estrutura pouco ramificada, o que resulta em interações intermoleculares mais fortes e maior resistência em comparação com o LDPE (Ghatge *et al.*, 2020). Além disso, a massa molar do HDPE é significativamente maior, o que dificulta o acesso de microrganismos e suas enzimas às suas cadeias poliméricas (Mohanani *et al.*, 2020). Por outro lado, o LDPE é menos resistente do que o HDPE, devido à sua estrutura ramificada, que torna suas cadeias mais acessíveis, e aos carbonos terciários nos pontos de ramificação, que são mais suscetíveis à ação microbiana (Mohanani *et al.*, 2020).

Desde a descoberta do PE, diversas estratégias têm sido adotadas para sua eliminação, como a deposição em aterros, incineração, reciclagem, produção de plásticos biodegradáveis, fabricação de concreto com base em plástico para a construção de estradas, obtenção de combustível e biodegradação (Sangale; Shahnawaz; Ade, 2019). Como discutido anteriormente, estes métodos em geral apresentam vantagens e desvantagens, mas ainda se mostram desafiadores e com taxas de sucesso insuficientes para remediá-lo de forma efetiva em escalas reais. Além disso, eles têm impactos negativos no meio ambiente e na economia (Sangale; Shahnawaz; Ade, 2019).

Nos últimos anos, a biodegradação microbiana tem sido explorada como uma alternativa ecologicamente amigável e economicamente viável para o gerenciamento de resíduos plásticos (Okal *et al.*, 2023). Esse método é considerado mais aceitável e ambientalmente correto, resultando em substâncias menos tóxicas em comparação com abordagens físico-químicas de descarte (Sangale; Shahnawaz; Ade, 2019; Shankar *et al.*, 2019).

A literatura científica contém um número considerável de relatórios sobre a biodegradação de plásticos, com destaque para o PE (Montazer; Najafi; Levin, 2020). A biodegradação do PE envolve o uso de microrganismos ou comunidades microbianas que transformam e consomem o polímero como fonte de energia, resultando em alterações em suas propriedades físico-químicas, como perda de peso, mudanças na estrutura e, por fim, transformação do carbono em biomassa (Ghatge *et al.*, 2020).

O primeiro estudo de biodegradação do PE usando culturas puras foi conduzido por Lee e colaboradores (1991), que utilizaram cepas de bactérias *Streptomyces* e o fungo basidiomiceto *Phanerochaete chrysosporium*. As cepas bacterianas *Streptomyces setonii* 75Vi2, *Streptomyces*

badius 252 e *Streptomyces viridosporus* T7A degradaram ativamente a amostra de teste, com redução de 50% na resistência à tração. No entanto, virtualmente nenhuma degradação foi observada pelo fungo.

Posteriormente, em 1998, Iiyoshi, Tsutsumi e Nishida investigaram a degradação de PE por fungos basidiomicetos, incluindo *Trametes versicolor*, *P. chryso sporium* e uma cepa de basidiomiceto não identificada. Foram observadas mudanças significativas no peso molecular, na resistência à tração e no alongamento relativo do plástico, bem como a produção de enzimas oxidativas pelos fungos. Esses foram os primeiros indícios da deterioração do PE por fungos.

Desde então, vários pesquisadores têm estudado a biodegradação de PE por microrganismos em laboratório. Em muitos desses estudos, os microrganismos são cultivados com o plástico em meios de cultura com disponibilidade limitada de nutrientes (Aderiye *et al.*, 2019, Chaudhary *et al.*, 2021, Perera *et al.*, 2022). Nestes estudos, em geral os principais métodos empregados para avaliar a degradação do PE são a perda de massa da amostra, as mudanças estruturais do polímero sob Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e modificações químicas de grupos funcionais usando Espectroscopia em Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR) (Ghatge *et al.*, 2020).

A medida da perda de massa é o método mais simples para monitorar a biodegradação do polietileno (Montazer; Najafi; Levin, 2020). Outros métodos analíticos também são empregados para avaliar a biodegradação do PE em um nível quantitativo, como medidas de mudanças na resistência à tração, cristalinidade e absorção de água do PE (Eldin *et al.*, 2022; Malachová *et al.*, 2020; Munir *et al.*, 2018; Perera *et al.*, 2022; Sangale; Shahnawaz; Ade, 2019). Alguns autores também avaliaram a produção de CO₂ durante o cultivo, a quantidade de biomassa após o crescimento e a produção de enzimas de diferentes tipos, principalmente enzimas oxidativas (Khruengsai; Sripahco; Pripdeevech, 2021; Perera *et al.*, 2022; Singh; Gupta, 2014).

Conforme apontado por Santacruz-Juárez *et al.* (2021), fatores enzimáticos e abióticos podem mediar a oxidação inicial das cadeias de polietileno. As condições ambientais influenciam os microrganismos e a via de degradação envolvidos no processo (Sangale; Shahnawaz; Ade, 2019). Dependendo do microrganismo, as condições de cultura, cepas e enzimas envolvidas na degradação do PE podem variar (Venkatesh *et al.*, 2021).

O pré-tratamento abiótico de polímeros usando agentes físicos e químicos acelera consideravelmente o processo de biodegradação, especialmente para poliolefinas (Okal *et al.*, 2023). Para que o processo de biodegradação do PE possa ser estudado em condições controladas, é essencial acelerá-lo por meio do pré-tratamento das amostras de plástico com

fatores abióticos, como calor e luz ultravioleta, para que os microrganismos possam degradar as cadeias dos polímeros em um curto espaço de tempo (Montazer; Najafi; Levin, 2020).

A degradação das cadeias poliméricas do PE é iniciada por luz ultravioleta, calor térmico e produtos químicos oxidantes. Estudos de degradação microbiana, particularmente em poliolefinas, frequentemente realizam um pré-tratamento abiótico, onde o polímero é primeiro oxidado sob luz UV ou pró-oxidantes antes de ser hidrolisado por microrganismos (Okal *et al.*, 2023). Essa oxidação gera grupos funcionais de carbonila e éster, que servem como alvos para enzimas microbianas como peroxidase, oxidase, hidrolase, cutinase e lipase (Okal *et al.*, 2023). A exposição dos plásticos ao pré-tratamento abiótico também cria radicais e produtos oxidados que desencadeiam reações químicas, resultando na deterioração do polímero (Malachová *et al.*, 2020).

Uma outra abordagem menos frequente nos estudos de degradação do PE é o uso de surfactantes no meio de cultura. Sendo o PE altamente hidrofóbico, os surfactantes podem aumentar a sua solubilidade, facilitando o contato com as células microbianas e suas enzimas (Okal *et al.*, 2023). Além disso, foi sugerido que o surfactante pode aumentar a atividade de enzimas oxidativas (Iiyoshi; Tsutsumi; Nishida, 1998). Como muitos microrganismos são capazes de produzir surfactantes biológicos naturalmente, essa abordagem necessita de maior investigação.

A literatura sugere que a biodegradação do PE pelo efeito combinado de fatores abióticos e bióticos tem se mostrado produtiva, e que microrganismos potenciais degradadores de PE precisam ser isolados de todas as fontes disponíveis, seguidos de triagem e confirmação dos isolados mais eficientes (Chaudhary *et al.*, 2021; Sangale; Shahnawaz; Ade, 2019). Microrganismos capazes de degradar o PE foram isolados de amostras de solo contaminado, água do mar, composto e de lodo ativado (Mohanani *et al.*, 2020). Na maioria dos estudos realizados, os microrganismos são identificados por meio de técnicas de biologia molecular (Aderiyé *et al.*, 2019; Malachová *et al.*, 2020; Perera *et al.*, 2022).

Entre os polímeros sintéticos mais estudados, o PE foi relatado como sendo degradado pelo maior número de táxons degradadores de plástico conhecidos até o momento, incluindo 55 espécies bacterianas e 24 fúngicas (Gambarini *et al.*, 2021). Exemplos de gêneros de bactérias degradadoras de polietileno incluem *Pseudomonas*, *Ralstonia*, *Stenotrophomonas*, *Rhodococcus*, *Staphylococcus*, *Streptomyces*, *Bacillus*, *Micrococcus*, *Serratia* e *Streptococcus* (Danso; Chow; Streita, 2019; Venkatesh *et al.*, 2021). Exemplos de gêneros de fungos degradadores de polietileno, por sua vez, incluem *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Penicillium*, *Rhizopus*, *Pleurotus*, *Phanerochaete* e *Trametes* (Danso; Chow; Streita, 2019; Venkatesh *et al.*,

2021).

Em meio à grande variedade de microrganismos citados na literatura científica, os fungos se destacam por apresentar grande potencial para a biodegradação de PE e de outros plásticos (Montazer; Najafi; Levin, 2020). Este potencial os tornam alguns dos microrganismos mais extensivamente estudados para esta aplicação biotecnológica, além das bactérias (Okal *et al.*, 2023).

2.7. Biodegradação de polietileno por fungos e suas enzimas

A biodegradação de polietileno por fungos é um tema de interesse crescente, explorando as características únicas do Reino Fungi. Este táxon abrange uma ampla diversidade de organismos eucarióticos, notáveis por serem heterotróficos, não possuem clorofila, possuem nutrição absorptiva por endocitose e exocitose, e reproduzem-se por meio de esporos (Li *et al.*, 2023; Sánchez, 2020).

Os fungos são um grupo taxonomicamente diverso, com um número estimado de 1,5 milhão de espécies, das quais foram identificadas cerca de 69 mil (Akpassi *et al.*, 2023; Fortuna, 2020). Classificações taxonômicas recentes têm se baseado em análises moleculares e filogenéticas para determinar as relações evolutivas entre os diferentes grupos de fungos, complementando os métodos tradicionais baseados em caracteres morfológicos (Tedersoo *et al.*, 2018). Com base nessas análises, o Reino Fungi atualmente subdivide-se em nove sub-reinos e 18 filos, dos quais os que abrangem o maior número de espécies descritas são Chytridiomycota, Neocallimastigomycota, Blastocladiomycota, Zoopagomycota, Glomeromycota, Mucoromycota, Ascomycota e Basidiomycota (Fortuna, 2020; Tedersoo *et al.*, 2018).

No Reino Fungi, os filos Ascomycota e Basidiomycota cobrem cerca de 97% de todas as espécies de fungos (He *et al.*, 2019). O filo Ascomycota compreende o maior grupo do reino Fungi, constituindo aproximadamente 75% de todos os fungos descritos (Fortuna, 2020). O filo Basidiomycota, por sua vez, é o grupo mais icônico do reino Fungi, incluindo fungos popularmente conhecidos como cogumelos e orelhas de pau (Fortuna, 2020).

A morfologia fúngica é diversificada, abrangendo formas unicelulares, como leveduras, e pluricelulares, como bolores, mofos e cogumelos (Fortuna, 2020). Os fungos pluricelulares não possuem tecidos verdadeiros, sendo a sua estrutura composta por hifas e micélio. As hifas são células cilíndricas alongadas, que podem ser apocíticas (septadas) ou cenocíticas (sem septos). O micélio é um conjunto de hifas, dividindo-se em micélio vegetativo, para fixação e

absorção de nutrientes, e micélio reprodutivo, responsável pela formação de estruturas reprodutivas (Fortuna, 2020). Morfologicamente, os fungos também podem ser classificados em microfungos e macrofungos, com base em seu tamanho e visibilidade macroscópica (Fortuna, 2020).

Os fungos exibem um crescimento contínuo das hifas, ocorrendo principalmente nas suas extremidades (crescimento apical). Eles são notáveis por seu crescimento lento e hábito heterotrófico, dependendo da absorção de nutrientes para obtenção de energia. Sua respiração é predominantemente aeróbica, mas alguns grupos, como as leveduras, são anaeróbios facultativos, adaptando-se a diferentes condições de oxigênio. Eles são aclorofilados, mas apresentam diversos tipos de pigmentos. Os fungos reproduzem-se tanto assexuadamente, quanto sexualmente (Fortuna, 2020).

Os fungos possuem um amplo repertório de estratégias reprodutivas. Na reprodução assexuada, podem formar estruturas de resistência, como artrósporos, resultantes da fragmentação de uma hifa em células menores, ou clamidósporos, onde células terminais ou intercaladas aumentam de tamanho e desenvolvem paredes espessas. A fissão celular, o brotamento e a esporulação por mitose são outras estratégias de reprodução fúngica assexuada (Fortuna, 2020).

Na reprodução sexuada, os esporos são produzidos por meiose celular e envolvem etapas de plasmogamia e cariogamia. Na plasmogamia, duas hifas de micélios haplóides de tipos reprodutivos compatíveis se encontram e seus citoplasmas se fundem. Em seguida, na cariogamia, ocorre a fusão dos núcleos, formando um micélio diplóide, que dará origem a estruturas de reprodução onde são produzidos esporos haplóides através da meiose (Fortuna, 2020).. Dependendo do grupo taxonômico, diferentes tipos de esporos sexuais podem ser produzidos, como zoósporos, zigósporos, ascósporos e basidiósporos, cada um com seu próprio mecanismo de formação e disseminação (Fortuna, 2020). Essa variedade de estratégias reprodutivas contribui para a diversidade e adaptação dos fungos em seu ambiente.

Os fungos são organismos ubíquos, ou seja, podem ser encontrados em todos os tipos de ambientes, desde solos, rios, mares, até dentro do corpo humano (Fortuna, 2020). Esses organismos podem ser saprotrofícos, ou seja, decompositores de matéria morta, ou associados obrigatórios ou oportunistas, mutualistas, parasitas ou patógenos (Sánchez, 2020). Alguns são simbióticos com plantas ou com algas, formando líquens, e alguns são parasitas de plantas, animais ou outros organismos (He *et al.*, 2022).

Os fungos são organismos essenciais nos ecossistemas, pois decompõem a matéria morta e reciclam nutrientes, quebrando compostos orgânicos complexos em moléculas simples

(HE *et al.*, 2022). Muitos fungos são notáveis pelo seu hábito lignícola, decompondo madeira e outros materiais de origem vegetal. A degradação biológica da madeira na natureza é principalmente causada por ascomicetos e basidiomicetos. Como as plantas lenhosas reservam uma quantidade enorme de carbono fixado fotossinteticamente na Terra, os fungos lignícolas têm um impacto ecológico significativo no ciclo global do carbono (Mäkelä; Hildén; Kuuskeri, 2021).

Os fungos são uma rica fonte de enzimas e têm a capacidade de sobreviver em ambientes hostis, com pH ácido, baixa disponibilidade de nutrientes e baixo teor de umidade (Montazer; Najafi; Levin, 2020). Em consonância com sua alta capacidade de adaptação, os fungos desenvolveram várias estratégias para neutralizar numerosos compostos complexos para obtenção de energia e nutrientes, alguns deles substâncias poluentes e tóxicas (Sánchez, 2020). Essas estratégias incluem: a capacidade de adsorção e penetração hifal, a produção de biosurfactantes naturais, e um poderoso sistema enzimático, que lhes permitem usar polímeros como fonte de carbono e elétrons, fornecendo-lhes materiais celulares e energia (Sánchez, 2020).

A maioria dos fungos pode decompor numerosos poluentes devido à sua capacidade de sintetizar enzimas extracelulares para digerir carboidratos complexos (Akpasi *et al.*, 2023). Algumas dessas enzimas podem ajudá-los a se adaptar a diferentes ambientes e promover a degradação de plásticos (Li *et al.*, 2023). Além disso, a ampla distribuição e capacidade reprodutiva características dos fungos, fornece certo suporte para que eles possam degradar plásticos (Sánchez, 2020). A biodegradação de plásticos sintéticos por fungos é considerada o resultado da evolução metabólica após uma exposição prolongada dos fungos a polímeros xenobióticos liberados no ambiente devido às atividades humanas (Okal *et al.*, 2023).

Figura 8. Basidiomiceto amazônico crescendo em área poluída por plásticos.



Fonte: O autor (2021).

Dentre os microrganismos, os fungos apresentam maior potencial para biodegradação do PE devido à sua capacidade de sobreviver em condições desfavoráveis e por produzirem enzimas capazes de degradar polímeros complexos (Montazer; Najafi; Levin, 2020; Sánchez, 2020). Tem sido relatado que, em geral, os fungos são melhores degradadores de PE do que as bactérias (Sánchez, 2020). Os fungos podem crescer mais rápido do que as bactérias no solo e podem penetrar na superfície do PE, pois tem a capacidade de estender hifas que penetram em rachaduras e fendas (Montazer; Najafi; Levin, 2020).

Os fungos são capazes de produzir hidrofobinas para auxiliar a colonização do PE (Sánchez, 2020). As hidrofobinas são proteínas de superfície hidrofóbicas que facilitam a adesão das hifas a uma superfície plástica (Temporiti *et al.*, 2022). As hidrofobinas são cruciais para o processo de biorremediação devido ao seu papel como biossurfactantes, que melhoram a biodisponibilidade do substrato (Santacruz-Juárez *et al.*, 2021).

Além das hidrofobinas, os fungos apresentam dois sistemas enzimáticos: o intracelular

e o extracelular (Sánchez, 2020). O sistema enzimático intracelular atua como mecanismo interno de desintoxicação e desempenha um papel importante na adaptação fúngica. O sistema enzimático extracelular, por sua vez, consiste em um sistema hidrolítico responsável pela degradação de polissacarídeos, e um sistema oxidativo não-específico, envolvido na quebra de estruturas complexas (Sánchez, 2020).

As principais classes de enzimas envolvidas na biodegradação de plásticos são as hidrolases e as oxidoreduções. Essas enzimas têm sido extensivamente estudadas devido à sua participação tanto em processos naturais quanto industriais. Por exemplo, na natureza e na indústria, elas são essenciais na degradação da lignocelulose, na patogênese fúngica e na hidrólise de triacilglicerol para ácidos graxos. Essas enzimas também têm aplicações nas indústrias alimentícia e têxtil, e em processos de biorremediação (Temporiti *et al.*, 2022).

Nos fungos, as enzimas extracelulares do sistema ligninolítico contêm oxidoreduções do tipo fenoloxidase e catalases que produzem o peróxido de hidrogênio extracelular (Venkatesh *et al.*, 2021). As maiores famílias de enzimas produzidas por fungos ligninolíticos são as fenoloxidasas: manganês peroxidase (MnP) (E.C:1.11.1), lacase (Lac) (E.C:1.10.3.2) e lignina peroxidase (LiP) (E.C:1.11.1.14) (Lasmar; Damasceno, 2017). A decomposição da lignina envolve MnP, LiP e Lac (Venkatesh *et al.*, 2021).

A lacase (Lac) é uma glicoproteína polifenoloxidase que contém cobre (Cu) no seu sítio ativo e catalisa a redução de O₂ para água, com simultânea oxidação de substratos fenólicos (Freire *et al.*, 2015). A importância tecnológica das lacases é resultante da capacidade de catalisar a transformação de um grande número de compostos aromáticos fenólicos e não fenólicos (Freire *et al.*, 2015).

A lignina peroxidase (LiP) contém ferro (Fe) como grupo prostético. A lignina peroxidase é uma proteína heme com um elevado potencial de oxidação e pode oxidar substratos fenólicos e não fenólicos (Lasmar; Damasceno, 2017). Tanto Lac quanto LiP são as enzimas mais importantes nos processos de degradação da lignina, possuindo grandes aplicações industriais (Lasmar; Damasceno, 2017). A manganês peroxidase (MnP) possui estrutura similar à LiP, no entanto, ela necessita de manganês (Mn) para realizar a sua atividade catalítica. A MnP tem sido considerada a enzima chave na degradação do PE (Ameen *et al.*, 2015; Iiyoshi; Tsutsumi; Nishida, 1998).

A biodegradação efetiva do PE por microrganismos enfrenta desafios devido ao seu alto peso molecular. Os sistemas enzimáticos microbianos, geralmente adaptados para substratos com 10 a 50 carbonos, exigem a redução do peso molecular do PE para facilitar a ação enzimática e a passagem através da membrana celular. Essa redução pode ocorrer por fatores

abióticos, como luz UV e calor, ou através de enzimas microbianas. A biodegradação fúngica se destaca pela produção de oxidases e hidrolases, que promovem a oxidação ou hidrólise das cadeias poliméricas, facilitando o subsequente metabolismo do polímero (Temporiti *et al.*, 2022).

As principais enzimas fúngicas envolvidas na biodegradação do PE são as enzimas ligninolíticas lacases (Lac, EC 1.10.3.2) e peroxidases (EC 1.11.1.7) (Malachová *et al.*, 2020; Santacruz-Juárez *et al.*, 2021). Essas enzimas realizam a clivagem oxidativa de regiões amorfas do PE e proporcionam acesso aos grupos carbonila formados na sua cadeia polimérica (Li *et al.*, 2023). O efeito dessas enzimas no PE tem sido estudado extensivamente em Basidiomycota, mas elas também estão presentes em Ascomycota (Temporiti *et al.*, 2022).

O fungo ascomiceto *Trichoderma harzianum* demonstrou a capacidade de produzir lacase e peroxidase durante o processo de biodegradação do polietileno (PE) (Sowmia; Krishnappa; Thippeswamy, 2014). O tratamento do PE com 0,01071 U/mL de lacase resultou em uma redução de massa de 0,5% após 10 dias de incubação, enquanto o tratamento com 0,01080 U/mL de peroxidase causou uma perda de massa de 0,6%. Essa ação enzimática levou à formação de ácidos carboxílicos, aldeídos, aromáticos, álcoois, ésteres, éteres e haletos alquilois, conforme evidenciado pela análise de FTIR.

No estudo de Ameen *et al.* (2015), que investigou a degradação do polietileno por vários isolados de fungos, observou-se que a MnP apresentou a maior atividade, seguida por LiP e Lac. Esses resultados estão em consonância com o estudo de Iiyoshi, Tsutsumi e Nishida (1998), que também destacou a maior atividade da MnP na degradação do PE.

Outro ascomiceto relevante na biodegradação é a cepa *Aspergillus flavus* PEDX3, isolada do intestino da traça-de-cera *Galleria mellonella* (Zhang *et al.*, 2020). Essa cepa demonstrou a capacidade de depolimerizar cadeias longas de HDPE, produzindo fragmentos de menor peso molecular após 28 dias de incubação. A ação de *A. flavus* PEDX3 foi atribuída à produção de lacases e oxidases com múltiplos átomos de cobre em seu sítio catalítico, semelhantes à lacase. A análise de sequenciamento de genes identificou dois genes, AFLA_006190 e AFLA_053930, como potenciais codificadores de enzimas degradantes de PE.

Um estudo recente conduzido por Santacruz-Juárez *et al.* (2021) utilizou simulações moleculares computacionais para investigar as interações entre o PE e diversas fenoloxidases fúngicas conhecidas por sua eficácia na degradação do polímero. O estudo avaliou as enzimas MnP, LiP, Lac, UnP (peroxidase não-específica) e Cut (cutinase). A UnP apresentou a maior afinidade de ligação (34,34 μ M), seguida por Lac (40,11 μ M), LiP (66,93 μ M), MnP (82,16

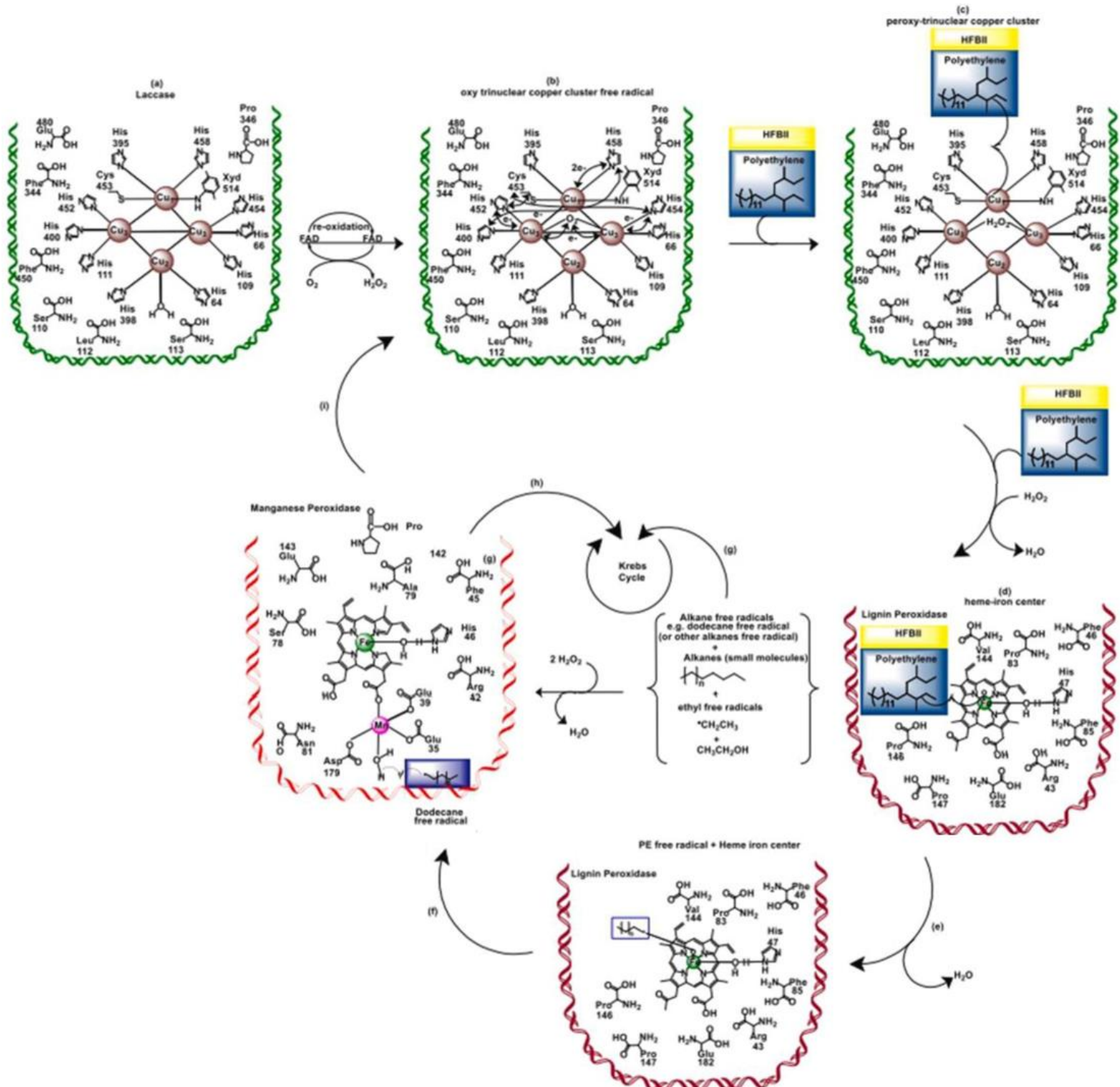
μM) e Cut (5590 μM). A cavidade catalítica da UnP foi sugerida como responsável pela forte interação com o PE, refletida pelos escores de energia de ligação.

Tem sido sugerido que as vias metabólicas fúngicas para degradação de hidrocarbonetos podem ser utilizadas assim que o tamanho das moléculas de PE é reduzido para um nível adequado para ação enzimática (Santacruz-Juárez *et al.*, 2021). Também tem sido sugerido que as enzimas fúngicas são capazes de diminuir o comprimento das cadeias de PE e que, uma vez que isso ocorra, uma via metabólica para a degradação de PE pode ser proposta (Sánchez, 2020).

Diferentes autores sugeriram caminhos de degradação utilizando enzimas específicas, como Lac, LiP e MnP, cada uma requerendo a adição de H_2O_2 para a oxidação do PE em condições ácidas (Temporiti *et al.*, 2022). Também tem sido demonstrada a possibilidade de sinergia entre essas enzimas na degradação do PE, como indicado por estudos de Ameen *et al.* (2015) e Sánchez (2020).

No estudo *in silico* de Santacruz-Juárez *et al.* (2021), foram propostas cinco vias hipotéticas para a degradação enzimática do PE. Essas vias envolveram enzimas fúngicas individuais (Lac, MnP, LiP ou UnP) ou uma combinação sinérgica de Lac, MnP e LiP, todas utilizando uma hidrofobina fúngica como biossurfactante. A via sinérgica (Figura 9) foi destacada como iniciada pela ação catalítica de Lac, seguida por LiP e MnP, indicando a participação significativa dessas enzimas na degradação eficiente do PE.

Figura 9. Via hipotética de degradação do PE, utilizando uma combinação sinérgica de Lac, MnP e LiP.



Fonte: Santacruz-Juárez *et al.* (2021).

Em resumo, as observações computacionais de Santacruz-Juárez *et al.* (2021) destacam o potencial das peroxidases, especialmente UnP, na biodegradação do PE. A proposta de vias

sinérgicas, envolvendo Lac, LiP e MnP, apresenta uma abordagem promissora para a degradação eficaz do PE, explorando a complementaridade dessas enzimas em diferentes etapas do processo de degradação.

No reino Fungi, os ascomicetos foram os mais estudados para a degradação de plásticos, seguidos pelos basidiomicetos e mucoromicetos (Sánchez, 2020). Os gêneros fúngicos mais estudados, pertencentes a Ascomycota, incluem *Aspergillus*, *Penicillium*, *Trichoderma* e *Fusarium*, enquanto Basidiomycota e Mucoromycota são menos explorados nesse contexto. Há relatos do envolvimento de fungos basidiomicetos como *Phanerochaete chrysosporium*, *Bjerkandera adusta* e *Trametes versicolor*, e o mucoromiceto *Rhizopus oryzae* na biodegradação do PE (Temporiti *et al.*, 2022).

Apesar de os basidiomicetos terem sido os primeiros fungos degradadores de plástico relatados na literatura, sua investigação para esse fim é significativamente menos abrangente em comparação com os ascomicetos (Iiyoshi; Tsutsumi; Nishida, 1998; Kang *et al.*, 2019). Segundo Spina *et al.* (2021), os dados sobre a degradação de PE por basidiomicetos são escassos, com muitas poucas cepas estudadas. Destaca-se a necessidade de maior investigação do potencial deste filo na degradação do PE e outros plásticos.

2.8. O potencial biotecnológico de fungos lignícolas amazônicos na degradação do polietileno – Dados e perspectivas

Dentre as diversas espécies fúngicas relatadas como capazes de degradar o PE, destacam-se os fungos ligninolíticos, adaptados à degradação eficiente da madeira (lignocelulose). Vários tipos de resíduos lignocelulósicos são degradados por fungos, como palha de trigo ou arroz, lascas de madeira ou serragem. A lignocelulose é composta por polissacarídeos (celulose, hemiceluloses e pectina) ligados ao polímero aromático lignina, que reveste os polissacarídeos para endurecer e fortalecer as paredes celulares vegetais (Daly *et al.*, 2021).

Segundo Daly *et al.* (2021), a lignocelulose e os plásticos possuem similaridades no que toca aos seus processos de degradação. Ambos possuem regiões amorfas e cristalinas, e ambos necessitam de atividades hidrolíticas e oxidativas para serem degradados. Os usos avançados das pesquisas de degradação de lignocelulose por fungos para degradação de plástico são escassos, portanto, estudos sobre como os fungos degradam a lignocelulose podem ajudar a entender como eles podem degradar o PE e outros plásticos (Daly *et al.*, 2021).

Figura 10. Fungos amazônicos em diferentes substratos lignocelulósicos.



Fonte: O autor (2023).

A degradação da madeira pode ser artificialmente categorizada em três tipos, com base no processo de degradação da parede celular vegetal e da morfologia resultante: podridão branca, podridão marrom, e podridão macia (Bari *et al.*, 2022). A podridão macia é geralmente causada por ascomicetos e é consideravelmente menos estudada, enquanto a podridão branca e a podridão marrom, por sua vez, são características do filo Basidiomycota, muito embora ascomicetos da família Xylariaceae possam causar a podridão branca sob determinadas condições (Bari *et al.*, 2022; Nghi *et al.*, 2012).

Os fungos de podridão marrom têm boa capacidade de decompor a celulose e fazer com que a madeira fique mais frágil e com uma cor marrom. Os fungos de podridão branca, por sua vez, atacam principalmente a celulose e a lignina, fazendo com que a madeira adquira um aspecto esbranquiçado (Hadibarata; Yuniarto, 2020).

Os fungos de podridão branca são os degradadores de lignina mais eficientes na produção de fenoloxidasas, que desempenham um importante papel na decomposição de muitos compostos aromáticos, corantes sintéticos e compostos organoclorados (Hadibarata; Yuniarto, 2020).

As espécies de fungos de podridão branca capazes de degradar PE mais mencionadas

na literatura são *Phanerochaete chrysosporium* e *Pleurotus ostreatus* (Da Luz *et al.* 2020; Venkatesh *et al.*, 2021). Outras espécies com o potencial para degradar polietileno incluem *Trametes versicolor*, *Schizophyllum commune*, *Bjerkandera adusta*, *Pleurotus tuber-regium* e *Pleurotus pulmonarius* (Iiyoshi; Tsutsumi; Nishida, 1998; Kang *et al.*, 2019; Nwogu; Atuanya; Akpaja, 2012; Perera *et al.*, 2022).

De acordo com Iiyoshi, Tsutsumi e Nishida (1998), cepas fúngicas como *T. versicolor* IFO 7043 e *P. chrysosporium* ME-446 degradaram ativamente o PE, com a MnP parcialmente purificada de *P. chrysosporium* ME-446 mostrando notável eficácia. Foi observada a redução da resistência à tração do PE em $100,0 \pm 1,3\%$ e da alongação relativa em $91,2 \pm 9\%$. A presença de Tween 80 e $MnSO_4$ no meio de cultura potencializou esse efeito, reduzindo significativamente o peso molecular do PE de 716.000 para 89.500 Daltons. Também foi observado que, enquanto o suprimento exógeno de H_2O_2 não é um requisito essencial para a degradação do PE, sua presença é crucial para o sistema de reação da MnP.

Outra pesquisa realizada por Fujisawa, Hirai e Nishida explorou os efeitos de um sistema mediador de lacase (LMS) de *Trametes versicolor* IFO 6482 na biodegradação do PE. O LMS conseguiu reduzir a alongação do PE em 20% em apenas 3 dias, enquanto a adição de 0,2 mM de 1-hidroxibenzotriazol (HBT) ao meio não apenas reduziu a alongação, mas também resultou em uma diminuição de 60% na resistência à tração relativa. Adicionalmente, o peso molecular do PE passou de 242.000 para 28.300 Daltons após 3 dias de tratamento com LMS e mediador HBT a 30 °C. Esses resultados destacam a eficácia desses sistemas enzimáticos na modificação das propriedades do PE (Fujisawa; Hirai; Nishida, 2001).

Recentemente, Perera *et al.* (2022) investigaram 31 cepas de fungos basidiomicetos e ascomicetos provenientes de líquens em áreas de manguezal. O foco do estudo foi avaliar a capacidade dessas cepas em degradar filmes de LDPE em meio líquido. Entre os basidiomicetos isolados, *Phanerochaete chrysosporium* e *Schizophyllum commune* se destacaram na degradação do LDPE. *P. chrysosporium* reduziu a massa e a resistência à tração do LDPE em 15,1% e 16%, respectivamente, enquanto *S. commune* apresentou redução de 10,5% na massa e 15,9% na resistência à tração.

Neste mesmo estudo, dentre os ascomicetos isolados, destacaram-se *Chaetomium globosum*, *Neofusicoccum occulatum*, *Xylaria feejensis* e *Daldinia eschscholtzii* na degradação do LDPE. Foi observada a redução de massa de 13,69%, 11,31%, 13,84% e 13,71% por *C. globosum*, *N. occulatum*, *D. eschscholtzii* e *X. feejensis*, respectivamente. Estes isolados também promoveram a redução da resistência à tração do LDPE em 8,4%, 5,23%, 5,74% e 2,55%, respectivamente. Além disso, os autores detectaram atividade de enzimas como Lac, LiP e MnP

nas cepas de ambos os filos, juntamente com outras enzimas como amilases, lipases e esterases.

A cepa *P. chrysosporium* MTCC-787 degradou em 70% um PE pré-oxidado de alto peso molecular (Mukherjee; Kundu, 2014). Kang *et al.* (2019) utilizaram lascas de madeira como um indutor enzimático no fungo de podridão branca *Bjerkandera adusta* para posterior degradação de HDPE. Através de MEV, constatou-se a formação de rachaduras na superfície do plástico após 90 dias de tratamento. Os basidiomicetos *Pleurotus tuber-regium* e *Pleurotus pulmonarius* reduziram o peso de tiras de PE em 13,26% e 9,67%, respectivamente (Nwogu; Atuanya; Akpaja, 2012). Estes estudos evidenciam a variedade de abordagens e resultados observados na degradação do PE por basidiomicetos.

Uma espécie notável por seu envolvimento na degradação de PE é o basidiomiceto comestível *Pleurotus ostreatus*. Ele demonstrou a capacidade de degradar diversos tipos de sacolas de LDPE, conforme evidenciado por estudos conduzidos por Da Luz *et al.* (2013; 2015; 2020). Nesses experimentos, observaram-se alterações significativas na estrutura e composição química das sacolas após o tratamento com *P. ostreatus*, reveladas por meio de MEV e FTIR.

Em um estudo realizado com *P. ostreatus* em meio semissólido modificado de Radha, na presença de filmes de LDPE, observou-se uma alta produção de enzimas durante o crescimento do fungo. As maiores atividades registradas foram de 2,817 U/g para Lac e 70,755 U/g para LiP após 30 e 90 dias, respectivamente, enquanto a maior produção de MnP foi observada no dia 120 (1,097 U/g) (Gomez-Méndez *et al.*, 2018). Os resultados destes estudos indicam a o potencial biotecnológico da aplicação de *P. ostreatus* na gestão de resíduos plásticos.

A transformação microbiana do PE e outros polímeros vem sendo extensivamente estudada nas últimas décadas. No entanto, ainda existem perguntas em aberto que precisam ser abordadas em escala internacional e por meio da integração de diferentes ramos da ciência. Para abordar essas questões e os desafios no desenvolvimento de polímeros sustentáveis no âmbito de uma bioeconomia circular, a Rede Transnacional de Pesquisa e Inovação em Biodiversidade Microbiana, Tecnologia de Enzimas e Ciência de Polímeros (MENZYPOL-NET) foi criada em 2021 por cientistas em início de carreira do Helmholtz-Zentrum Hereon (Alemanha), da Universidade dos Andes e da Corporação Colombiana de Pesquisa Agrícola (Agrosavia) (Colômbia).

No contexto da MENZYPOL-NET e de seu primeiro workshop internacional ("Síntese e Degradação Microbiana de Polímeros: Rumo a uma Bioeconomia Sustentável", realizado em 27 de setembro de 2021), Jimenez e diversos outros pesquisadores (2022) identificaram várias prioridades de pesquisa para melhor compreender a transformação de plásticos duráveis,

incluindo sua biodegradação, reciclagem e as consequências de sua presença na biosfera. Essas prioridades incluem:

1. Revelar as relações entre as estruturas das cadeias poliméricas e as propriedades físico-químicas dos materiais plásticos e sua biodegradabilidade;
2. Utilizar e padronizar técnicas modernas para quantificar com precisão a biodegradação de plásticos em condições do mundo real;
3. Desenvolver novos plásticos biodegradáveis sintetizados utilizando monômeros derivados de plantas e resíduos plásticos;
4. Explorar estratégias para reciclar/degradar de maneira mais eficiente tanto os plásticos à base de petróleo quanto os plásticos de base biológica;
5. Explorar enzimas-chave e vias metabólicas envolvidas na biodegradação de diferentes tipos de plásticos, tanto à base de petróleo como de base biológica;
6. Descobrir o modo de ação e substratos naturais de enzimas degradantes de plástico;
7. Projetar estratégias inovadoras para a evolução direcionada de enzimas;
8. Engenheirar novas enzimas degradantes de plástico para aprimorar a degradação e melhorar a viabilidade econômica da bioreciclagem de plásticos;
9. Projetar ensaios de triagem em larga escala que abordem diretamente a atividade de degradação de plásticos, em vez da atividade em outros compostos modelo;
10. Explorar a evolução de microrganismos e enzimas degradantes de plástico e de microbiomas impactados por plásticos;
11. Compreender o impacto da entrada de microplásticos nos microbiomas ambientais e associados aos hospedeiros;
12. Determinar o papel de fato na degradação desempenhado pelos microrganismos dentro da plastisfera;
13. Isolar/recuperar novos fungos e bactérias degradantes de plástico e projetar/caracterizar consórcios microbianos de diferentes ecossistemas.

Com base no princípio postulado na ecologia microbiana de que "tudo está em toda parte", os microrganismos com potencial para degradar plásticos podem ser encontrados em diversos ambientes, não sendo necessário procurar por eles em lugares especiais (Jimenez *et al.*, 2022). No entanto, o ambiente seleciona microrganismos melhor adaptados, de modo que é provável que microrganismos degradadores de plástico possam ser encontrados com mais

frequência em locais com alta abundância de resíduos plásticos ou outros compostos químicos com estruturas semelhantes, como aterros sanitários, lixões, e corpos de água poluídos. Seguindo esse princípio, ambientes abundantes em polímeros vegetais, hidrocarbonetos de cadeia longa, petróleo e outros xenobióticos poderiam ser excelentes lugares para isolá-los (Jimenez *et al.*, 2022).

A lignina é um polímero natural que é relativamente inerte à degradação, sendo atacada apenas por fungos que destroem a madeira e algumas bactérias do solo que desenvolveram estratégias enzimáticas para sua depolimerização. As enzimas que atuam em compostos derivados de plantas apresentam o potencial para transformar diferentes tipos de plásticos. Essas enzimas ligninolíticas podem ser candidatas para o design de enzimas degradadoras de plástico (Jimenez *et al.*, 2022). Dessa forma, microbiomas com alta abundância de polímeros vegetais como a floresta Amazônica podem ser excelentes locais para procurar fungos e enzimas degradadores de PE.

O Bioma Amazônico é reconhecido como detentor da maior diversidade biológica e riqueza florestal do planeta. Sendo a maior extensão de floresta tropical úmida contínua, caracteriza-se por uma notável riqueza de espécies e altos índices de endemismo. Sua imensa biodiversidade, recursos hídricos, minérios, espécies animais e vegetais, assim como fungos macro e microscópicos, leveduras e bactérias, são extensivamente estudados e manipulados pela ciência e tecnologia modernas (Mendoza *et al.*, 2022).

Com sua biodiversidade singular, a Amazônia emerge como uma das maiores potencialidades do Brasil no novo milênio. Além de desempenhar um papel crucial na conservação da diversidade, ela se destaca no cenário econômico e estratégico do país. Isso motiva a crescente concentração de estudos científicos na região, impulsionada pelas grandes probabilidades de aproveitamento econômico dos recursos, com a biotecnologia como eixo estruturante desse modelo de desenvolvimento econômico na Amazônia (Mendoza *et al.*, 2022).

A biotecnologia destaca-se como uma das tecnologias essenciais do século XXI, oferecendo inovação radical, impacto e potencial para resolver problemas globais, além de prometer um desenvolvimento industrial sustentável. Simultaneamente, a produção de enzimas, uma área em expansão na biotecnologia, tem incentivado pesquisas e movimentado o mercado financeiro. Suas propriedades são amplamente utilizadas em diversas áreas, desde a fabricação de produtos tecnológicos até o tratamento de resíduos. Nesse contexto, a Amazônia apresenta um valor elevadíssimo para a busca de novos extratos enzimáticos com potencial aplicação biotecnológica. Diante desse panorama, urge a necessidade de realizar novas pesquisas sobre a

biotecnologia dos fungos na Amazônia. Na Amazônia brasileira, as pesquisas ainda são incipientes em comparação com a vasta biodiversidade existente no bioma (Mendoza *et al.*, 2022).

Apesar dos avanços nos estudos sobre a degradação de plásticos por fungos, ainda são escassas as pesquisas realizadas na região amazônica para este fim. Considerando a diversidade biológica da Amazônia e sua importância estratégica para a conservação ambiental e o desenvolvimento sustentável, é fundamental investigar o potencial de biodegradação de plásticos nessa região. Portanto, é necessário realizar estudos específicos na Amazônia para identificar fungos com potencial na degradação de plásticos, compreender melhor este potencial e buscar soluções adequadas para o problema dos plásticos.

Como mencionado anteriormente, os fungos têm sido investigados para a biodegradação do PE porque esses organismos produzem enzimas degradantes e polímeros extracelulares que podem ajudar a colonizar a superfície do polímero. Os fungos ligninolíticos apresentam o potencial para degradar o PE, através dos mesmos mecanismos enzimáticos usados para degradar a lignina. Esses fungos são conhecidos por produzirem as fenoloxidasas ligninolíticas Lac, MnP e LiP, relatadas como capazes de degradar o PE. Gêneros relatados com o potencial de degradar o PE, como *Phanerochaete*, *Pleurotus*, *Daldinia* e *Xylaria*, são amplamente encontrados em meio à rica diversidade microbiana da região Amazônica.

Em conclusão, os fungos lignícolas amazônicos e suas enzimas apresentam grande potencial para a degradação de plásticos como o polietileno. É de grande importância investigar as aplicações biotecnológicas destes organismos na região amazônica, possibilitando a tomada de rumos mais sustentáveis e viáveis na gestão dos resíduos plásticos. Nesse sentido, um estudo de degradação fúngica de PE na Amazônia pode ser conduzido através do isolamento e identificação de fungos lignícolas regionais, seguido do seu cultivo com PE em um bioprocessamento para investigar o seu potencial de degradação através de métodos analíticos, juntamente à avaliação da produção de fenoloxidasas.

A identificação e triagem de fungos amazônicos com potencial de degradar PE pode nortear futuros estudos de biodegradação de plásticos na região, possibilitando o desenvolvimento de metodologias de pesquisa otimizadas que possam abrir caminhos para novas soluções no manejo sustentável do problema dos plásticos e na mitigação de seus impactos.

3. OBJETIVOS

3.1. Geral

Avaliar a capacidade de fungos isolados do Bosque da Ciência do INPA (Manaus–AM) de degradar LDPE.

3.2. Específicos

1. Realizar a coleta e isolamento de fungos do bosque do INPA;
2. Identificar os isolados por sequenciamento da região ITS1–5.8S–ITS4;
3. Investigar o potencial de degradação de filmes de LDPE pelos isolados;
4. Avaliar a produção de fenoloxidasas pelos isolados.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Coleta e isolamento de amostras

A coleta dos fungos foi realizada nas trilhas do Bosque da Ciência do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), em Manaus, Amazonas (GPS -3.0942, -59.9870). A coleta dos fungos seguiu o protocolo de coleta de macrofungos de Fortuna (2020). Amostras de esporomas de macrofungos foram retiradas de substratos lignocelulósicos com o auxílio de pinça e bisturi, acondicionadas em placas de Petri estéreis e levadas ao Laboratório de Micologia do INPA.

Para o isolamento, foram retirados de cada amostra de esporoma três fragmentos de aproximadamente 1 cm². Esses fragmentos foram higienizados através de lavagens consecutivas por um minuto em etanol 70%, em solução de hipoclorito de sódio a 2% e em água destilada esterilizada. Em seguida, os fragmentos foram transferidos para placas de Petri contendo meio Ágar Malte (MEA: 3% extrato de malte, 0,02% cloranfenicol, 1,5% Ágar, p/v) e mantidos a 28 °C por sete dias (Fortuna, 2020). Os fungos passaram por sucessivos repiques em meio Ágar Batata Dextrose (BDA) até a obtenção de culturas puras e os isolados foram transferidos para tubos de ensaio para a formação de culturas estoque, visando a realização dos experimentos e a identificação molecular.

4.2. Identificação e filogenia dos isolados

A identificação e análise filogenética dos isolados foram realizadas por meio de técnicas de biologia molecular. Inicialmente, foi efetuada a extração do DNA dos isolados, seguindo o protocolo modificado de Ferrer *et al.* (2001). Em seguida, realizou-se a amplificação por PCR das regiões ITS1–5.8S–ITS4 do DNA ribossômico nuclear, conforme a metodologia de White *et al.* (1990). As regiões amplificadas foram submetidas a sequenciamento e, posteriormente, as sequências obtidas foram comparadas com as de espécies registradas no banco de dados NCBI (Altschul *et al.*, 1990). Uma vez identificados os isolados, as suas sequências foram analisadas para a construção da árvore filogenética (Kumar *et al.*, 2018).

4.2.1. Extração de DNA

Os isolados foram cultivados durante sete dias em meio Extrato de Malte líquido. Após o crescimento, a biomassa dos isolados foi transferida para microtubos de 2 mL e homogeneizada em vórtex por um minuto com 300 µL de tampão de lise. Em seguida, os tubos foram submetidos a um choque térmico, a -70°C em ultrafreezer por 30 minutos e a 100°C em banho-maria por 15 minutos. Após isso, a biomassa foi macerada com sílica por dois minutos e incubada em termobloco com 20 µL de Proteinase K a 56°C por 30 minutos. Logo depois, foram adicionados 500 µL de uma solução de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (50:48:2) à mistura para a extração do DNA. A solução foi homogeneizada em vórtex por um minuto e incubada em um agitador orbital a 100 rpm por 30 minutos.

Após o término do tempo de incubação e extração, a solução foi centrifugada a 13.500 rpm e 4°C por 15 minutos e o sobrenadante contendo DNA foi transferido para novos tubos. Foram adicionados ao sobrenadante 500 µL de isopropanol gelado e, em seguida, os tubos foram centrifugados a 13.500 rpm e 4°C por cinco minutos. Após isso, todo o sobrenadante foi descartado e 500 µL de etanol 70% foram adicionados aos pellets precipitados no fundo dos tubos, para a lavagem de resíduos da extração. Os tubos foram novamente centrifugados conforme descrito para o isopropanol, o etanol foi descartado, e os tubos foram incubados em termobloco a 56°C por 30 minutos, para a evaporação completa do etanol. Todo o procedimento de lavagem com etanol 70% foi efetuado uma segunda vez. Em seguida, foram adicionados 100 µL de tampão de eluição ao DNA precipitado.

A quantificação e determinação da pureza do DNA extraído foram realizadas em espectrofotômetro (BioSpectrometer basic, Eppendorf), usando alíquotas de 4 µL de DNA

homogeneizado em 196 μL de água Milli Q esterilizada, em tubos de 2 mL. Foram consideradas adequadas para amplificação as amostras de DNA com índice de pureza inferior a 1,8. Por fim, as amostras foram armazenadas a -20°C .

4.2.2. Amplificação por PCR

Após a extração, as amostras de DNA dos isolados foram amplificadas por PCR. Foram utilizados os primers ITS1 (5'-CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA-3') e ITS4 (5'-CAGGAGACTTGTACACGGTCCAG-3'). Para a PCR, foi preparado um mix de soluções contendo, para cada reação, 14,5 μL de água Milli-Q, 3 μL de tampão para PCR, 1,2 μL de MgCl_2 , 3,0 μL de dNTPs, 1,5 μL de cada primer (ITS1 e ITS4), 0,3 μL de Taq Polimerase (Platinum, Invitrogen) e 5,0 μL de DNA fúngico. Assim, cada reação teve um volume final de 30 μL .

As reações de amplificação foram realizadas em termociclador (Veriti, Thermo Fisher Scientific). As condições de amplificação consistiram em uma desnaturação inicial a 94°C por cinco minutos, seguida por 35 ciclos de: desnaturação a 94°C por um minuto; anelamento dos primers a 58°C por um minuto; e extensão a 72°C por dois minutos; seguidos de uma extensão final a 72°C por 10 minutos.

Os produtos da PCR foram avaliados por eletroforese em gel de agarose (40 minutos, 100 V, 100 A), preparado a 1,5% em tampão TAE 1x e corado com 6 μL de Sybergreen SYBR® Safe (Invitrogen). Foram utilizadas alíquotas de 8 μL dos amplificados, que foram coradas com 2 μL de Orange 6X para visualização dos fragmentos em um visualizador UV. A purificação dos produtos da PCR foi realizada utilizando polietilenoglicol 8000 (PEG) a 20%, com incubação em termobloco a 37°C por 15 minutos. Os produtos foram lavados com etanol 80%, transferidos para um tampão de eluição e armazenados a -20°C .

4.2.3. Sequenciamento e análise filogenética

O sequenciamento nucleotídico foi conduzido com os produtos da PCR purificados, usando os primers ITS1 e ITS4, empregando o kit BigDye Terminator versão 3.1 conforme as orientações do fabricante e, posteriormente, precipitados com solução de Etanol/EDTA. As amostras foram então eletroinjetadas em analisador automático (ABI PRISM 3130xL, Thermo Fisher Scientific) localizado no Laboratório Temático de Biologia Molecular do INPA (LTBM).

As sequências de DNA obtidas foram comparadas às de espécies relacionadas, obtidas do banco de dados do National Center for Biotechnology Information (NCBI), usando a ferramenta BLASTN, considerando valores acima de 97% de similaridade. Após a identificação ao nível de espécie dos isolados, a árvore de distância filogenética foi construída empregando o método de agrupamento de vizinhos (Neighbor Joining), por meio do software Molecular Evolutionary Genetics Analysis versão 10.0 (MEGA X). As porcentagens de similaridade das árvores em que os táxons associados se agruparam foram determinadas a partir de testes de bootstrap (1.000 réplicas).

4.3. Estudos de biodegradação de LDPE

Os isolados foram submetidos a dois experimentos de biodegradação de LDPE, um em meio sólido, e outro em meio líquido. Nestes experimentos, empregaram-se sacolas transparentes de LDPE fornecidas pela empresa Polynorte Embalagens.

4.3.1. Biodegradação de LDPE em meio sólido

Os isolados foram submetidos a um experimento de biodegradação em meio sólido, seguindo uma metodologia adaptada de Munir *et al.* (2018). Neste experimento, os isolados foram cultivados sobre filmes de LDPE recortados em tiras de 3x8 cm, em placas de Petri contendo o meio Ágar Mineral, em condições estacionárias a temperatura ambiente por 21 dias.

4.3.1.1. Meio Ágar Mineral

O meio de cultura utilizado neste experimento foi o Ágar Mineral, acrescido do surfactante Tween 80 como fonte suplementar de carbono. A composição do meio para 1 litro de água destilada e pH 7 consistiu de: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (1 g); $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,5 g); NaCl (1 g); $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (0,002 g); $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,001 g); $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (0,001 g); K_2HPO_4 (1 g); KH_2PO_4 (0,2 g); $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,001 g); $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (0,001 g); Ágar (15 g); e Tween 80 (0,1% v/v), sendo este último adicionado após a autoclavagem do meio (Iiyoshi; Tsutsumi; Nishida, 1998; Shrestha *et al.*, 2019).

4.3.1.2. Bioprocesso

Após a pesagem e a assepsia, cada tira de LDPE foi transferida assepticamente para uma placa de Petri contendo 30 mL de meio Ágar Mineral, dentro de uma câmara de fluxo laminar. Em seguida, dois discos miceliais de 0,8 cm de cada isolado, cultivados em BDA por 8 dias, foram inoculados em cada tira, um em cada extremidade. As placas foram então armazenadas em estufa a temperatura ambiente por 21 dias. Como controle negativo, foram utilizadas placas contendo meio de cultura e tiras de LDPE sem inóculo fúngico, e como controle positivo, foi utilizada uma cepa de *Pleurotus ostreatus* da coleção de culturas do INPA.

Ao término do experimento, as tiras de LDPE foram manualmente removidas dos cultivos e separadas do micélio. Posteriormente, as tiras foram lavadas sucessivamente com etanol 70% e água destilada esterilizada (Khruengsai; Sripahco; Pripdeevech, 2021). As tiras foram então secas em estufa a 60°C por 24 horas e armazenadas em sacolas do tipo “ziplock” rotuladas, para a posterior avaliação da degradação do plástico.

A extração das enzimas fúngicas foi conduzida seguindo uma metodologia adaptada de Nakajima, Soares e Queiroz (2018). O meio de cultura e a biomassa presentes nas placas foram misturados com 30 mL de água destilada esterilizada em frascos Erlenmeyer de 125 mL. Essas misturas foram incubadas à temperatura ambiente por uma hora, utilizando um agitador orbital a 180 rpm. Posteriormente, as misturas foram filtradas através de oito camadas de gaze e submetidas a uma centrifugação a 10.000 rpm e 4°C durante 10 minutos. Os extratos resultantes foram então armazenados a -20°C, para serem utilizados nos ensaios de atividade das fenoloxidasas.

4.3.2. Biodegradação de LDPE em meio líquido

Os isolados foram submetidos a um experimento de biodegradação em meio líquido, seguindo uma metodologia adaptada de Perera *et al.* (2022). Neste experimento, os isolados foram cultivados em fermentação submersa sobre filmes de LDPE de 10x11 cm, em frascos Erlenmeyer contendo meio Caldo Mineral, em condições estacionárias a temperatura ambiente por 21 dias.

4.3.2.1. Meio Caldo Mineral

O meio de cultura utilizado neste experimento foi o Caldo Mineral, livre de fontes de

carbono. A composição do meio para 1 litro de água destilada e pH 7 consistiu de: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (1 g); $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,5 g); NaCl (1 g); $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (0,002 g); $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,001 g); $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (0,001 g); K_2HPO_4 (1 g); KH_2PO_4 (0,2 g); $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,001 g); e $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (0,001 g) (Shrestha *et al.*, 2019).

4.3.2.2. Bioprocesso

Após a pesagem e a assepsia em etanol 70% por 24h, cada filme de LDPE foi transferido assepticamente para um Erlenmeyer contendo 50 mL de meio Caldo Mineral autoclavado, dentro de uma câmara de fluxo laminar. Em seguida, três discos miceliais de 0,8 cm de cada isolado, cultivados em MEA por oito dias, foram inoculados em cada frasco. Os cultivos foram então armazenados à temperatura ambiente por 21 dias. Como controle negativo, foram utilizados frascos contendo meio de cultura e filmes sem inóculo fúngico.

Ao término do experimento, os filmes de LDPE foram manualmente removidos dos cultivos e separados do micélio. Posteriormente, os filmes foram lavados sucessivamente com etanol 70% e água destilada esterilizada (Khruengsai; Sripahco; Pripdeevech, 2021). As tiras foram então secas em estufa a 60°C por 24 horas e armazenadas em sacolas do tipo “ziplock” rotuladas, para a posterior avaliação da degradação do plástico.

A extração das enzimas fúngicas foi conduzida seguindo uma metodologia adaptada de Nakajima, Soares e Queiroz (2018). O meio de cultura foi coletado e submetido a uma centrifugação a 10.000 rpm e 4°C durante 10 minutos. Os extratos resultantes foram então armazenados a -20°C, para serem utilizados nos ensaios de atividade das fenoloxidasas.

4.3.2.3. Quantificação de biomassa

Ao término do experimento, o micélio dos cultivos foi separado do meio líquido, filtrado a vácuo e seco em estufa por 24h, seguindo a metodologia de Khruengsai, Sripahco e Pripdeevech (2021). O peso seco do micélio foi obtido com auxílio de balança digital (Shimadzu), e a biomassa foi determinada em gramas por litro de meio de cultura (g/L).

4.3.3. Avaliação da redução de massa

Após o tratamento fúngico e assepsia, as tiras e filmes de LDPE foram pesados em uma balança digital (Shimadzu) para a determinação do peso final. Em seguida, o percentual de

redução de massa do plástico (% RM) foi calculado utilizando a seguinte fórmula (Khruengesai; Sripahco; Pripdeevech, 2021):

$$\% \text{ RM} = [(\text{peso inicial} - \text{peso final}) / \text{peso inicial}] \times 100$$

4.4. Determinação da atividade de fenoloxidasas

Após a obtenção dos extratos enzimáticos, procedeu-se à determinação da atividade de fenoloxidasas em espectrofotômetro (BioSpectrometer basic, Eppendorf), seguindo a metodologia adaptada de Szklarz *et al.* (1989), utilizando o-dianisidina (3,3'-dimetoxibenzidina) como substrato. Preparou-se uma solução de o-dianisidina a 1 mM e dimetilsulfóxido (DMSO) a 1% (v/v), dissolvendo 24,4 mg de o-dianisidina sólida em 1 mL de DMSO. A solução foi ajustada para um volume de 100 mL com água destilada e armazenada em um frasco escuro.

Para a determinação da atividade da lacase, a reação consistiu em 800 µL de tampão citrato-fosfato (pH 5, 0,05 M), 100 µL de solução de o-dianisidina (1 mM) e 100 µL do extrato enzimático, totalizando 1 mL de reação. A oxidação da o-dianisidina foi medida pelo aumento da absorvância a 460 nm ($\epsilon_{460} = 11300 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) durante três minutos. Para determinar a atividade das fenoloxidasas totais, seguiu-se o mesmo procedimento anterior, porém subtraindo-se 200 µL de tampão e adicionando-se 200 µL de peróxido de hidrogênio (2 mM) à reação. A atividade das peroxidases foi determinada pela diferença entre a atividade das fenoloxidasas totais e a atividade da lacase (Souza, 2004).

Neste estudo, definiu-se uma unidade de atividade enzimática (U) como a quantidade de enzima capaz de oxidar 1 µmol de substrato por minuto. Essa determinação é baseada na Lei de Lambert-Beer, seguindo a equação abaixo (Leonowicz; Grzywnowicz, 1981):

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

$\Delta \text{ Abs.}$ = Variação na absorvância (final - inicial).

ϵ = coeficiente de absorvidade molar ou coeficiente de extinção.

R = volume de extrato enzimático utilizado.

t = tempo de reação em minutos.

A atividade das fenoloxidasas obtidas do experimento sólido foi determinada em U/Kg, enquanto a atividade das fenoloxidasas do experimento líquido foram expressas em U/L.

4.5. Análise estatística

Os experimentos foram realizados em triplicata para os cálculos de média e desvio padrão. Os dados obtidos foram analisados por meio de análise de variância (ANOVA), seguida pelo teste de Tukey para comparação de médias, com nível de significância de $p < 0,05$, utilizando o software Prism Graphpad versão 10.1.0.316.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados do presente mestrado estão apresentados na forma de artigo que será encaminhado ao Brazilian Journal of Biology:

Identificação, filogenia e potencial de biodegradação de filme plástico de polietileno de baixa densidade por fungos isolados do Bosque do INPA, Manaus–Amazonas

Daniel Saraiva Roessing^{1,3}, Flávia da Silva Fernandes^{2,4}, Jacqueline da Silva Batista⁴, Érica Simplício de Souza^{1,5}, João Vicente Braga de Souza³.

1. Programa de Pós-graduação em Biotecnologia e Recursos Naturais da Amazônia – Escola Superior de Ciências da Saúde, Universidade do Estado do Amazonas – UEA. Amazonas, Brasil.
2. Programa de Pós-graduação em Genética, Conservação e Biologia Evolutiva – GCBev – Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – INPA. Amazonas, Brasil.
3. Laboratório de Micologia, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – INPA. Amazonas, Brasil.
4. Laboratório Temático de Biologia Molecular, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – INPA. Amazonas, Brasil.
5. Escola Superior de Tecnologia, Universidade do Estado do Amazonas – UEA. Amazonas, Brasil.

RESUMO

Este artigo descreve um estudo que teve como objetivo isolar e identificar fungos lignícolas do Bosque da Ciência do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), localizado em Manaus, Amazonas, Brasil, e avaliar sua capacidade de degradação de filmes de polietileno de baixa densidade (LDPE) em meio com ágar e em meio líquido. Foram coletadas 38 amostras de esporomas de macrofungos ligninolíticos associados a amostras lignocelulósicas em decomposição. A partir dessas amostras, foram isolados oito fungos, sendo quatro pertencentes ao filo Basidiomycota e quatro ao filo Ascomycota, sendo estes quatro últimos contaminantes dos Basidiomycota. A análise filogenética baseada na sequência da região ITS revelou a identificação precisa das espécies dos isolados, que foram identificadas como *Schizophyllum commune*, *Irpex laceratus*, *Phlebiopsis flavidoalba*, *Peniophora crassitunicata*, *Endomelanconiopsis endophytica*, *Annulohyphoxylon stygium*, *Xylaria heliscus* e *Xylaria plebeja*. Quanto aos resultados da avaliação da degradação de filmes de LDPE, todos os isolados demonstraram potencial na degradação do plástico, dependendo das condições de cultivo. Em meio com ágar mineral, após 21 dias de cultivo estacionário em temperatura ambiente, todos os isolados salvo *Xylaria plebeja* XPM090323 promoveram a redução da massa do plástico, destacando-se *Pleurotus ostreatus* CPOINPA1, usado como controle positivo (3,7%), *Irpex laceratus* ILM050722 (3%), *Endomelanconiopsis endophytica* EEM140223 (3,2%) e *Annulohyphoxylon stygium* ASS170223 (3,8%). *E. endophytica* EEM140223 exibiu a atividade de lacase mais elevada (18,1 U/Kg), enquanto *Schizophyllum commune* SCM050722 se destacou na atividade de peroxidases (5,9 U/Kg). Em contraste, em meio líquido caldo mineral, após 21 dias de cultivo estacionário em temperatura ambiente, *X. plebeja* XPM090323 destacou-se como o mais eficiente na redução da massa do LDPE (1,5%). Por fim, o isolado *Xylaria heliscus* XHS310123 apresentou a maior produção de biomassa (4,1 g/L) e de peroxidases (13,3 U/L), enquanto *S. commune* SCM050722 apresentou a maior atividade de lacase (25,2 U/L). Este estudo contribui para a compreensão da diversidade de fungos lignícolas na região amazônica e sua capacidade de degradação de polietileno, apresentando potencial relevância em aplicações ambientais e de remediação de resíduos plásticos.

Palavras-chave: Basidiomycota; Ascomycota; Biodegradação; Plástico LPDE; Fenoloxidasas.

INTRODUÇÃO

O termo "plástico" (derivado do grego *plastikos*) refere-se a um grupo de materiais sintéticos e semissintéticos de alto peso molecular com maleabilidade para moldagem (Temporiti *et al.*, 2022). Apresentando alta durabilidade e versatilidade, esses materiais desempenham papéis essenciais em diversas áreas da atividade humana, incluindo agricultura, construção, saúde, indústria e embalagens (Bahl *et al.*, 2020). Sua produção pode ser baseada em recursos naturais ou sintéticos, sendo a maioria derivada do petróleo (Daly *et al.*, 2021; Ekanayaka *et al.*, 2022). A produção global de plásticos vem crescendo anualmente, com estimativas indicando um aumento da sua produção para quase 600 milhões de toneladas por ano até 2050 após a pandemia de COVID-19 (Jimenez *et al.*, 2022).

O polietileno (PE) foi um dos primeiros plásticos a ser produzido em massa, tendo sua produção iniciada acidentalmente em 1935 por Michael Perrin, que desenvolveu um processo reproduzível para a síntese de PE com aplicações industriais (Shankar *et al.*, 2019). Classificado em tipos como PE de alta densidade (HDPE) e PE de baixa densidade (LDPE), cada tipo possui propriedades distintas influenciadas por processos de fabricação específicos (Sales *et al.*, 2021).

O PE é aplicado principalmente na fabricação de embalagens e materiais descartáveis, e é um dos plásticos mais consumidos globalmente, representando 64% de todos os plásticos sintéticos, com estimativas de crescimento anual de 12% em sua produção (Srikanth *et al.*, 2022). O LDPE em específico é o polímero sintético mais abundante do planeta, representando 69% dos resíduos sólidos descartados em aterros sanitários, principalmente na forma de sacolas plásticas (Mohanam *et al.*, 2020). Anualmente, entre 500 bilhões e 1 trilhão de sacolas de PE são usadas em todo o mundo (Srikanth *et al.*, 2022). O uso extensivo do PE, especialmente do LDPE, apresenta sérios impactos ambientais e ameaça diversos ecossistemas e organismos, incluindo o ser humano (Ghatge *et al.*, 2020).

A problemática dos plásticos, especialmente do PE, tem implicações significativas no meio ambiente. Cerca de 90% dos produtos plásticos são utilizados uma única vez e então são descartados, contribuindo para a poluição generalizada e sobrecarregando sistemas de gestão de resíduos deficientes (Sánchez, 2020). A persistência dos plásticos no ambiente é agravada por sua lenta degradação, com estimativas de dezenas a milhares de anos para ocorrer (Ali *et al.*, 2021; Jimenez *et al.*, 2022; Taghavi *et al.*, 2021; Temporiti *et al.*, 2022). Os impactos da poluição plástica são amplos, afetando ecossistemas terrestres e aquáticos e uma grande diversidade de organismos, prejudicando a produtividade dos solos, causando problemas em

animais como obstruções intestinais e diminuição da imunidade, e oferecendo riscos à saúde humana, como disfunção endócrina e câncer (Bahl *et al.*, 2020; Venkatesh *et al.*, 2021; Yuan *et al.*, 2020).

Além disso, microplásticos e nanoplásticos (MNPs), formados pela fragmentação abiótica natural destes materiais, encontram-se disseminados globalmente, afetando ecossistemas agrícolas, florestais, fluviais e oceânicos (Jimenez *et al.*, 2022; Mohanan *et al.*, 2020). A saúde humana também está ameaçada pela ingestão de MNPs acumulados na teia trófica, que frequentemente contêm aditivos tóxicos e metais pesados incorporados em sua passagem pelo ambiente (Kutralam-Muniasamy *et al.*, 2023).

Além dos impactos ambientais e de saúde, a poluição plástica gera custos socioeconômicos, prejudicando setores como turismo, pesca e transporte marítimo (Kumar *et al.*, 2021). O lixo plástico tornou-se uma característica distintiva do Antropoceno, exigindo medidas urgentes para minimizar o uso de plásticos e desenvolver estratégias eficazes de manejo (Ghatge *et al.*, 2020).

Os principais métodos de descarte de plásticos incluem a deposição em aterro sanitário, a incineração e a reciclagem (Mishra; Das; Kandali, 2020). Esses métodos são relativamente limitados e dispendiosos, além de causarem impactos ambientais, tornando-os ineficazes no manejo do problema (Sangale; Shahnawaz; Ade, 2019). A reciclagem de plásticos enfrenta desafios significativos, como a degradação das propriedades físico-químicas destes após ciclos repetidos (Ali *et al.*, 2021).

A baixa taxa global de reciclagem de plásticos e as suas limitações destacam a necessidade contínua de soluções inovadoras e sustentáveis para lidar com o problema crescente do acúmulo de resíduos plásticos e seus impactos (Chen *et al.*, 2021; Queiroz *et al.*, 2022). Plásticos biodegradáveis e bioplásticos, provenientes de fontes renováveis como amido e resíduos agrícolas, apresentam potencial no manejo sustentável do problema (Bacha *et al.*, 2023; Jimenez *et al.*, 2022). No entanto, a substituição efetiva dos plásticos convencionais por biodegradáveis ainda é limitada, exigindo estudos sobre as condições ideais para sua degradação efetiva (Ekanayaka *et al.*, 2022; Mishra; Das; Kandali, 2020).

A degradação de plásticos é um processo complexo envolvendo mudanças nas propriedades poliméricas devido a processos químicos, físicos e biológicos. A degradação abiótica, incluindo fotodegradação, degradação térmica, mecânica e química, influencia a fragmentação inicial do polímero, ocorrendo principalmente nos ambientes naturais pela sua exposição prolongada às intempéries (Oliveira *et al.*, 2023).

A biodegradação de plásticos, realizada principalmente por microrganismos, é um

processo complexo e sequencial, seguindo quatro etapas: biodeterioração, biofragmentação, bioassimilação e mineralização (Mohanani *et al.*, 2020). Ao longo do processo, com o auxílio de sistemas enzimáticos, os polímeros são colonizados, fragmentados e assimilados pelas células microbianas, sendo eventualmente incorporados no seu metabolismo, gerando energia e produtos metabólicos (Okal *et al.*, 2023).

A introdução dos plásticos na biosfera é considerada muito recente, de modo que a natureza ainda não teve tempo de evoluir sistemas enzimáticos específicos à degradação destes materiais (Okal *et al.*, 2023). Como consequência, a nossa compreensão mecanicista e holística deste fenômeno ainda está em seus estágios iniciais (Jimenez *et al.*, 2022). A pesquisa científica tem destacado o potencial e a importância da diversidade microbiana na transformação de plásticos, abordando tanto métodos de pesquisa em laboratório como em campo para compreender o fenômeno sob diferentes perspectivas (Haider *et al.*, 2018).

Para avaliar a eficácia do processo de biodegradação, múltiplas abordagens analíticas como observações visuais, avaliações físicas e químicas, evolução de CO₂, consumo de O₂ e marcação radiativa são empregadas, embora estas ainda careçam de padronização e enfrentem dificuldades de reprodutibilidade de seus dados (Alshehrei, 2017; Jimenez *et al.*, 2022). Apesar dos desafios, a biodegradação é vista como uma estratégia promissora para mitigar os impactos ambientais dos plásticos, oferecendo uma alternativa mais limpa e sustentável, convertendo resíduos plásticos em produtos biotecnológicos valiosos (Oliveira *et al.*, 2023; Mohanani *et al.*, 2020).

O PE é conhecido por sua resistência à degradação devido à sua estrutura hidrofóbica, alto peso molecular e aditivos antioxidantes (Ghatge *et al.*, 2020; Mohanani *et al.*, 2020). Várias estratégias, como as mencionadas anteriormente, têm sido adotadas para manejar o PE, mas enfrentam graves desafios e impactos ambientais (Sangale; Shahnawaz; Ade, 2019). Abordagens alternativas como a produção de plásticos biodegradáveis e a biodegradação microbiana tem emergido como potenciais soluções para o problema, sendo tópicos altamente oportunos e relevantes, e amplamente discutidos na comunidade científica (Jimenez *et al.*, 2022).

A literatura científica revela avanços na biodegradação do PE por microrganismos, incluindo bactérias como *Pseudomonas* e fungos como *Aspergillus*, destacando a necessidade de isolamento e triagem de microrganismos eficientes (Danso; Chow; Streita, 2019; Venkatesh *et al.*, 2021). O uso de pré-tratamentos com fatores abióticos, como luz ultravioleta, tem se mostrado promissora na degradação inicial das cadeias de PE, acelerando significativamente o processo (Okal *et al.*, 2023). A combinação de fatores abióticos e bióticos tem mostrado eficácia

na degradação do PE, evidenciando o potencial destas pesquisas para o gerenciamento sustentável de resíduos plásticos (Chaudhary *et al.*, 2021; Sangale; Shahnawaz; Ade, 2019).

A biodegradação de PE por fungos, tema de crescente interesse, explora as características únicas do Reino Fungi. Esses organismos desempenham papéis cruciais nos ecossistemas, atuando como decompositores, simbiontes e até mesmo patógenos (Sánchez, 2020). A biodegradação do PE e de outros plásticos por fungos é resultado da evolução metabólica após exposição prolongada a polímeros xenobióticos introduzidos na natureza pela atividade humana (Jimenez *et al.*, 2022).

Embora os fungos do filo Ascomycota sejam mais estudados na biodegradação de plásticos, espécies de Basidiomycota e Mucoromycota também apresentam potencial, destacando a necessidade de mais investigações nesses grupos (Sánchez, 2020). Ascomicetos como *Trichoderma harzianum* e *Aspergillus flavus*, e basidiomicetos como *Phanerochaete chrysosporium* e *Pleurotus ostreatus* mostraram potencial na degradação do PE produzindo diversos tipos de enzimas, com destaque para as enzimas ligninolíticas do tipo fenoloxidase (Gomez-Méndez *et al.*, 2018; Iiyoshi; Tsutsumi; Nishida, 1998; Sowmia; Krishnappa; Thippeswamy, 2014; Zhang *et al.*, 2020).

As fenoloxidases, como lacase (Lac), lignina peroxidase (LiP) e manganês peroxidase (MnP), tem demonstrando grande potencial biotecnológico na degradação do PE, com estudos computacionais destacando os seus papéis essenciais na oxidação das cadeias poliméricas do PE (Santacruz-Juárez *et al.*, 2021). Propostas de vias sinérgicas envolvendo Lac, LiP e MnP apresentam abordagens promissoras para a degradação eficaz do PE (Santacruz-Juárez *et al.*, 2021).

Várias espécies de macrofungos tem demonstrado potencial na capacidade de degradar filmes de LDPE, com destaque para os fungos ligninolíticos, adaptados à decomposição da matéria vegetal e eficientes na degradação da lignina (Hadibarata; Yuniarto, 2020). Fungos lignícolas como os basidiomicetos *Phanerochaete chrysosporium*, *Trametes versicolor*, *Schizophyllum commune* e *Pleurotus ostreatus*, e os ascomicetos *Daldinia eschscholtzii*, *Xylaria feejensis*, *Chateomium globosum* e *Neofusicoccum occulatum* foram identificados como potenciais degradadores de LDPE, apresentando potencial biotecnológico para sua remediação (Gomez-Méndez *et al.*, 2018; Iiyoshi; Tsutsumi; Nishida, 1998; Perera *et al.*, 2022). Muitos destes grupos são amplamente encontrados em ambientes ricos em matéria vegetal, como a Floresta Amazônica.

A biodiversidade única da Amazônia oferece um campo promissor para a pesquisa biotecnológica, especialmente na busca por enzimas com aplicação potencial na degradação de

plásticos (Jimenez *et al.*, 2022; Mendoza *et al.*, 2022). Apesar dos avanços nos estudos sobre a degradação de plásticos por fungos, há uma lacuna significativa de pesquisas neste tema na região amazônica. Dada a rica diversidade biológica e a importância estratégica da Amazônia para a conservação ambiental e o desenvolvimento sustentável, é crucial conduzir estudos específicos na região para investigar o potencial dos fungos na biodegradação de plásticos e desenvolver soluções adequadas para o problema. Destaca-se a importância do isolamento e identificação de fungos amazônicos com potencial para degradação de PE, abrindo caminhos para futuras pesquisas que possibilitem a sua remediação sustentável.

Diante desse contexto, o presente estudo teve como objetivo identificar, analisar filogeneticamente e avaliar o potencial de degradação de filme de LPDE por fungos lignícolas isolados no Bosque do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), localizado em Manaus, Amazonas. Os resultados desta pesquisa podem fornecer *insights* sobre a degradação fúngica de PE e nortear futuros estudos que busquem a otimização da biodegradação deste plástico, bem como contribuir para a valorização do potencial biotecnológico da diversidade fúngica amazônica.

MATERIAIS E MÉTODOS

Materiais

Amostras de esporomas foram coletadas no Bosque do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), localizado em Manaus, Amazonas, Brasil, para o isolamento de macrofungos lignícolas (Fortuna, 2020). As coordenadas geográficas exatas da área de coleta foram registradas com o auxílio de um GPS.

Polietileno de Baixa Densidade (LDPE)

Filmes plásticos de polietileno de baixa densidade (LDPE) da marca Polynorte Embalagens foram utilizados para avaliar a capacidade de degradação dos isolados fúngicos.

Reagentes

Os reagentes empregados no estudo incluíram ágar puro, ágar malte e ágar batata dextrose (Difco), sais minerais, corante, solventes e surfactante (Merck), e soluções para

extração, purificação e amplificação de DNA (Wizard Genomic DNA Purification Kit, Promega, Invitrogen).

Isolamento dos fungos

Os esporomas coletados foram fragmentados a um tamanho aproximado de 1cm². Os fragmentos foram submetidos a um processo de desinfecção superficial com lavagens consecutivas em etanol 70% e solução de hipoclorito de sódio a 2% por 2 minutos e, posteriormente, enxaguados com água destilada estéril. Em seguida, os fragmentos foram inoculados em placas de ágar malte e incubados a 28°C por 7 dias. Após o crescimento micelial, os isolados foram transferidos para placas de ágar batata dextrose e incubados novamente a 28°C por 7 dias para obtenção de culturas puras.

Identificação e filogenia dos isolados

A identificação e análise filogenética dos isolados foram realizadas por meio de técnicas de biologia molecular. Inicialmente, foi efetuada a extração do DNA dos isolados, seguindo o protocolo modificado de Ferrer *et al.* (2001). Em seguida, realizou-se a amplificação por PCR das regiões ITS1–5.8S–ITS4 do DNA ribossômico nuclear, conforme a metodologia de White *et al.* (1990). As regiões amplificadas foram submetidas a sequenciamento e, posteriormente, as sequências obtidas foram comparadas com as de espécies registradas no banco de dados NCBI (Altschul *et al.*, 1990). Uma vez identificados os isolados, as suas sequências foram analisadas para a construção da árvore filogenética (Kumar *et al.*, 2018).

Extração de DNA

Os isolados foram cultivados durante sete dias em meio Extrato de Malte líquido. Após o crescimento, a biomassa dos isolados foi transferida para microtubos de 2 mL e homogeneizada em vórtex por um minuto com 300 µL de tampão de lise. Em seguida, os tubos foram submetidos a um choque térmico, a -70°C em ultrafreezer por 30 minutos e a 100°C em banho-maria por 15 minutos. Após isso, a biomassa foi macerada com sílica por dois minutos e incubada em termobloco com 20 µL de Proteinase K a 56°C por 30 minutos. Logo depois, foram adicionados 500 µL de uma solução de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (50:48:2) à mistura para a extração do DNA. A solução foi homogeneizada em vórtex por um minuto e

incubada em um agitador orbital a 100 rpm por 30 minutos.

Após o término do tempo de incubação e extração, a solução foi centrifugada a 13.500 rpm e 4°C por 15 minutos e o sobrenadante contendo DNA foi transferido para novos tubos. Foram adicionados ao sobrenadante 500 µL de isopropanol gelado e, em seguida, os tubos foram centrifugados a 13.500 rpm e 4°C por cinco minutos. Após isso, todo o sobrenadante foi descartado e 500 µL de etanol 70% foram adicionados aos pellets precipitados no fundo dos tubos, para a lavagem de resíduos da extração. Os tubos foram novamente centrifugados conforme descrito para o isopropanol, o etanol foi descartado, e os tubos foram incubados em termobloco a 56°C por 30 minutos, para a evaporação completa do etanol. Todo o procedimento de lavagem com etanol 70% foi efetuado uma segunda vez. Em seguida, foram adicionados 100 µL de tampão de eluição ao DNA precipitado.

A quantificação e determinação da pureza do DNA extraído foram realizadas em espectrofotômetro (BioSpectrometer basic, Eppendorf), usando alíquotas de 4 µL de DNA homogeneizado em 196 µL de água Milli Q esterilizada, em tubos de 2 mL. Foram consideradas adequadas para amplificação as amostras de DNA com índice de pureza inferior a 1,8. Por fim, as amostras foram armazenadas a -20°C.

Amplificação por PCR

Após a extração, as amostras de DNA dos isolados foram amplificadas por PCR. Foram utilizados os primers ITS1 (5'-CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA-3') e ITS4 (5'-CAGGAGACTTGTACACGGTCCAG-3'). Para a PCR, foi preparado um mix de soluções contendo, para cada reação, 14,5 µL de água Milli-Q, 3 µL de tampão para PCR, 1,2 µL de MgCl₂, 3,0 µL de dNTPs, 1,5 µL de cada primer (ITS1 e ITS4), 0,3 µL de Taq Polimerase (Platinum, Invitrogen) e 5,0 µL de DNA fúngico. Assim, cada reação teve um volume final de 30 µL.

As reações de amplificação foram realizadas em termociclador (Veriti, Thermo Fisher Scientific). As condições de amplificação consistiram em uma desnaturação inicial a 94°C por cinco minutos, seguida por 35 ciclos de: desnaturação a 94°C por um minuto; anelamento dos primers a 58°C por um minuto; e extensão a 72°C por dois minutos; seguidos de uma extensão final a 72°C por 10 minutos.

Os produtos da PCR foram avaliados por eletroforese em gel de agarose (40 minutos, 100 V, 100 A), preparado a 1,5% em tampão TAE 1x e corado com 6 µL de Sybergreen SYBR® Safe (Invitrogen). Foram utilizadas alíquotas de 8 µL dos amplificados, que foram coradas com

2 µL de Orange 6X para visualização dos fragmentos em um visualizador UV. A purificação dos produtos da PCR foi realizada utilizando polietilenoglicol 8000 (PEG) a 20%, com incubação em termobloco a 37°C por 15 minutos. Os produtos foram lavados com etanol 80%, transferidos para um tampão de eluição e armazenados a -20°C.

Sequenciamento e análise filogenética

O sequenciamento nucleotídico foi conduzido com os produtos da PCR purificados, usando os primers ITS1 e ITS4, empregando o kit BigDye Terminator versão 3.1 conforme as orientações do fabricante e, posteriormente, precipitados com solução de Etanol/EDTA. As amostras foram então eletroinjetadas em analisador automático (ABI PRISM 3130xL, Thermo Fisher Scientific) localizado no Laboratório Temático de Biologia Molecular do INPA (LTBM).

As sequências de DNA obtidas foram comparadas às de espécies relacionadas, obtidas do banco de dados do National Center for Biotechnology Information (NCBI), usando a ferramenta BLASTN, considerando valores acima de 97% de similaridade. Após a identificação ao nível de espécie dos isolados, a árvore de distância filogenética foi construída empregando o método de agrupamento de vizinhos (Neighbor Joining), por meio do software Molecular Evolutionary Genetics Analysis versão 10.0 (MEGA X). As porcentagens de similaridade das árvores em que os táxons associados se agruparam foram determinadas a partir de testes de bootstrap (1.000 réplicas).

Experimentos de biodegradação de LDPE

Os isolados foram submetidos a dois experimentos de biodegradação de LDPE, um em meio sólido (Munir *et al.*, 2018), e outro em meio líquido (Perera *et al.*, 2022).

Biodegradação de LDPE em meio sólido

Os isolados foram submetidos a um experimento de biodegradação em meio sólido, seguindo uma metodologia adaptada de Munir *et al.* (2018). Neste experimento, os isolados foram cultivados sobre filmes de LDPE recortados em tiras de 3x8 cm, em placas de Petri contendo o meio Ágar Mineral, em condições estacionárias a temperatura ambiente por 21 dias.

Meio ágar mineral

O meio de cultura utilizado neste experimento foi o Ágar Mineral, acrescido do surfactante Tween 80 como fonte suplementar de carbono. A composição do meio para 1 litro de água destilada e pH 7 consistiu de: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (1 g); $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,5 g); NaCl (1 g); $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (0,002 g); $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,001 g); $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (0,001 g); K_2HPO_4 (1 g); KH_2PO_4 (0,2 g); $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,001 g); $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (0,001 g); Ágar (15 g); e Tween 80 (0,1% v/v), sendo este último adicionado após a autoclavagem do meio (Iiyoshi; Tsutsumi; Nishida, 1998; Shrestha *et al.*, 2019).

Bioprocesso

Após a pesagem e a assepsia, cada tira de LDPE foi transferida assepticamente para uma placa de Petri contendo 30 mL de meio Ágar Mineral, dentro de uma câmara de fluxo laminar. Em seguida, dois discos miceliais de 0,8 cm de cada isolado, cultivados em BDA por 8 dias, foram inoculados em cada tira, um em cada extremidade. As placas foram então armazenadas em estufa a temperatura ambiente por 21 dias. Como controle negativo, foram utilizadas placas contendo meio de cultura e tiras de LDPE sem inóculo fúngico, e como controle positivo, foi utilizada uma cepa de *Pleurotus ostreatus* da coleção de culturas do INPA.

Ao término do experimento, as tiras de LDPE foram manualmente removidas dos cultivos e separadas do micélio. Posteriormente, as tiras foram lavadas sucessivamente com etanol 70% e água destilada esterilizada (Khruengsai; Sripahco; Pripdeevech, 2021). As tiras foram então secas em estufa a 60°C por 24 horas e armazenadas em sacolas do tipo “ziplock” rotuladas, para a posterior avaliação da degradação do plástico.

A extração das enzimas fúngicas foi conduzida seguindo uma metodologia adaptada de Nakajima, Soares e Queiroz (2018). O meio de cultura e a biomassa presentes nas placas foram misturados com 30 mL de água destilada esterilizada em frascos Erlenmeyer de 125 mL. Essas misturas foram incubadas à temperatura ambiente por uma hora, utilizando um agitador orbital a 180 rpm. Posteriormente, as misturas foram filtradas através de oito camadas de gaze e submetidas a uma centrifugação a 10.000 rpm e 4°C durante 10 minutos. Os extratos resultantes foram então armazenados a -20°C, para serem utilizados nos ensaios de atividade das fenoloxidasas.

Biodegradação de LDPE em meio líquido

Os isolados foram submetidos a um experimento de biodegradação em meio líquido, seguindo uma metodologia adaptada de Perera *et al.* (2022). Neste experimento, os isolados foram cultivados em fermentação submersa sobre filmes de LDPE de 10x11 cm, em frascos Erlenmeyer contendo meio Caldo Mineral, em condições estacionárias a temperatura ambiente por 21 dias.

Meio caldo mineral

O meio de cultura utilizado neste experimento foi o Caldo Mineral, livre de fontes de carbono. A composição do meio para 1 litro de água destilada e pH 7 consistiu de: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (1 g); $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,5 g); NaCl (1 g); $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (0,002 g); $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,001 g); $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (0,001 g); K_2HPO_4 (1 g); KH_2PO_4 (0,2 g); $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,001 g); e $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (0,001 g) (Shrestha *et al.*, 2019).

Bioprocesso

Após a pesagem e a assepsia em etanol 70% por 24h, cada filme de LDPE foi transferido assepticamente para um Erlenmeyer contendo 50 mL de meio Caldo Mineral autoclavado, dentro de uma câmara de fluxo laminar. Em seguida, três discos miceliais de 0,8 cm de cada isolado, cultivados em MEA por oito dias, foram inoculados em cada frasco. Os cultivos foram então armazenados à temperatura ambiente por 21 dias. Como controle negativo, foram utilizados frascos contendo meio de cultura e filmes sem inóculo fúngico.

Ao término do experimento, os filmes de LDPE foram manualmente removidos dos cultivos e separados do micélio. Posteriormente, os filmes foram lavados sucessivamente com etanol 70% e água destilada esterilizada (Khruengsai; Sripahco; Pripdeevech, 2021). As tiras foram então secas em estufa a 60°C por 24 horas e armazenadas em sacolas do tipo “ziplock” rotuladas, para a posterior avaliação da degradação do plástico.

A extração das enzimas fúngicas foi conduzida seguindo uma metodologia adaptada de Nakajima, Soares e Queiroz (2018). O meio de cultura foi coletado e submetido a uma centrifugação a 10.000 rpm e 4°C durante 10 minutos. Os extratos resultantes foram então armazenados a -20°C, para serem utilizados nos ensaios de atividade das fenoloxidasas.

Quantificação de biomassa

A biomassa dos isolados cultivados em meio líquido foi determinada através da filtração e pesagem do micélio seco. Ao término do experimento, o micélio dos cultivos foi separado do meio líquido, filtrado a vácuo e seco em estufa por 24h, seguindo a metodologia de Khruengsai, Sripahco e Pripdeevech (2021). O peso seco do micélio foi obtido com auxílio de balança digital (Shimadzu), e a biomassa foi determinada em gramas por litro de meio de cultura (g/L).

Perda de massa

Os filmes de LDPE usados em ambos experimentos foram pesados antes e após a exposição aos isolados fúngicos, usando uma balança digital uma balança digital (Shimadzu). O percentual de redução de massa do plástico (% RM) foi calculado utilizando a seguinte fórmula (Khruengsai; Sripahco; Pripdeevech, 2021):

$$\% \text{ RM} = [(\text{peso inicial} - \text{peso final}) / \text{peso inicial}] \times 100$$

Atividade de fenoloxidasas

Após a obtenção dos extratos enzimáticos, procedeu-se à determinação da atividade de fenoloxidasas em espectrofotômetro (BioSpectrometer basic, Eppendorf), seguindo a metodologia adaptada de Szklarz *et al.* (1989), utilizando o-dianisidina (3,3'-dimetoxibenzidina) como substrato. Preparou-se uma solução de o-dianisidina a 1 mM e dimetilsulfóxido (DMSO) a 1% (v/v), dissolvendo 24,4 mg de o-dianisidina sólida em 1 mL de DMSO. A solução foi ajustada para um volume de 100 mL com água destilada e armazenada em um frasco escuro.

Para a determinação da atividade da lacase, a reação consistiu em 800 µL de tampão citrato-fosfato (pH 5, 0,05 M), 100 µL de solução de o-dianisidina (1 mM) e 100 µL do extrato enzimático, totalizando 1 mL de reação. A oxidação da o-dianisidina foi medida pelo aumento da absorbância a 460 nm ($\epsilon_{460} = 11.300 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) durante três minutos. Para determinar a atividade das fenoloxidasas totais, seguiu-se o mesmo procedimento anterior, porém subtraindo-se 200 µL de tampão e adicionando-se 200 µL de peróxido de hidrogênio (2 mM) à

reação. A atividade das peroxidases foi determinada pela diferença entre a atividade das fenoloxidasas totais e a atividade da lacase (Souza, 2004).

Neste estudo, definiu-se uma unidade de atividade enzimática (U) como a quantidade de enzima capaz de oxidar 1 μmol de substrato por minuto. Essa determinação é baseada na Lei de Lambert-Beer, seguindo a equação abaixo (Leonowicz; Grzywnowicz, 1981):

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

$\Delta \text{ Abs.}$ = Variação na absorbância (final - inicial).

ε = coeficiente de absorvidade molar ou coeficiente de extinção.

R = volume de extrato enzimático utilizado.

t = tempo de reação em minutos.

A atividade das fenoloxidasas obtidas do experimento sólido foi determinada em U/Kg, enquanto a atividade das fenoloxidasas do experimento líquido foram expressas em U/L.

Análise estatística

Os dados obtidos foram analisados por meio de análise de variância (ANOVA), seguida pelo teste de Tukey para comparação de médias, utilizando o software GraphPad Prism versão 10.1.0.316. Um nível de significância de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

RESULTADOS

Isolamento de fungos do Bosque do INPA (Manaus–Amazonas)

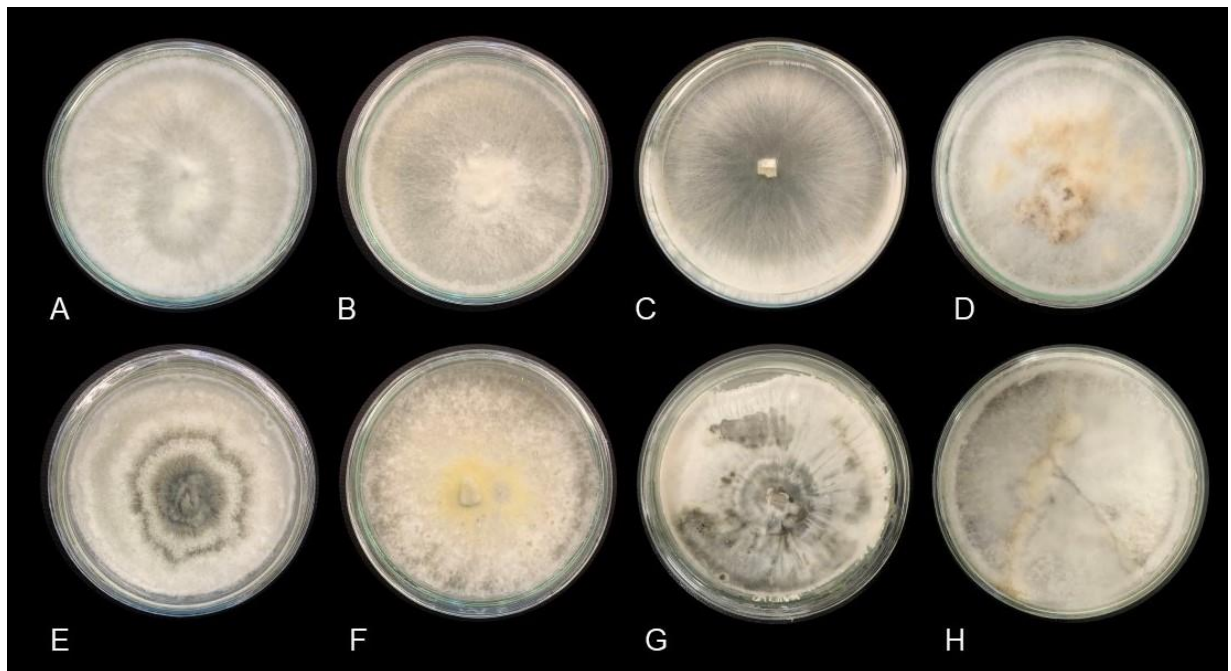
No presente estudo, 38 amostras de esporomas de macrofungos lignícolas foram coletadas no Bosque do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), associados a amostras lignocelulósicas em decomposição (Figura 1).

Figura 1. Esporomas de macrofungos do Bosque da Ciência do INPA em Manaus–AM submetidos a isolamento no presente trabalho.



A partir dessas amostras, foram obtidos quatro isolados pertencentes ao filo Basidiomycota, e quatro do filo Ascomycota. Os isolados de basidiomicetos representavam as ordens Agaricales, Polyporales e Russulales, enquanto os ascomicetos isolados pertenciam às ordens Botryosphaeriales e Xylariales. As colônias puras dos oito isolados (Figura 2) foram selecionadas para as demais etapas do presente trabalho.

Figura 2. Aspecto macromorfológico da cultura em BDA dos fungos isolados no presente trabalho, à parte de esporomas de macrofungos do Bosque da Ciência do INPA, em Manaus–AM.



A - SCM050722; B - ILM050722; C - PFM050722; D - PCS010223; E - EEM140223; F - ASS170223; G - XHS310123; H - XPM090323.

Análise Filogenética dos Isolados

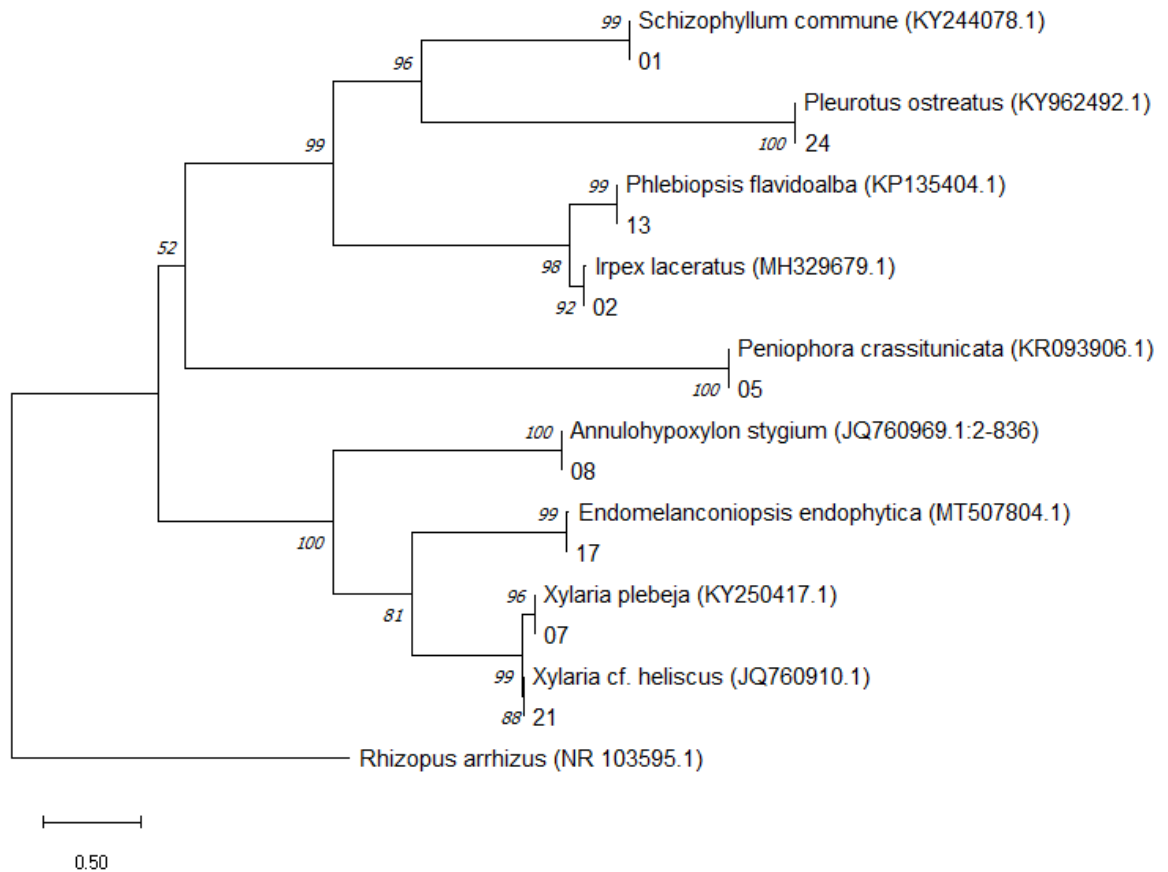
O sequenciamento da região ITS (ITS1–5.8S–ITS4) foi realizado nos oito isolados de interesse. Posteriormente, comparamos as sequências obtidas com as sequências-tipo disponíveis no NCBI para determinar os gêneros e espécies dos isolados. A análise está detalhada na Tabela 1.

Tabela 1. Resultados da avaliação de similaridade de sequências da região ITS1 (Internal Transcribed Spacer 1), 5.8S (Ribosomal RNA) e ITS4 (Internal Transcribed Spacer 4) dos oito fungos isolados neste estudo, comparadas com sequências-tipo depositadas no NCBI (Banco de dados do Instituto Nacional de Saúde dos Estados Unidos) e as espécies associadas a essas sequências.

Código do isolado	Coordenadas GPS	Espécie	Sequencia-tipo	Similaridade de Sequência de DNAr ITS
CPOINPA1	Cultura do INPA	<i>Pleurotus ostreatus</i>	KY962492.1	100%
SCM050722	-3.095935, -59.988687	<i>Schizophyllum commune</i>	KY244078.1	100%
ILM050722	-3.099829, -59.985103	<i>Irpex laceratus</i>	MH329679.1	95%
PFM050722	-3.094363, -59.988728	<i>Phlebiopsis flavidoalba</i>	KP135404.1	99%
PCS010223	-3.094364, -59.987947	<i>Peniophora crassitunicata</i>	KR093906.1	99%
EEM140223	-3.099458, -59.985039	<i>Endomelanconiopsis endophytica</i>	MT507804.1	100%
ASS170223	-3.094429, -59.987497	<i>Annulohypoxyylon stygium</i>	JQ760969.1	100%
XHS310123	-3.093971, -59.988704	<i>Xylaria heliscus</i>	JQ760910.1	95%
XPM090323	-3.094819, -59.988218	<i>Xylaria plebeja</i>	KY250417.1	98%

Os resultados da análise filogenética mostraram que todos os isolados apresentaram similaridade de DNA superior a 95% com as regiões ITS1–5.8S–ITS4 dos acessos-tipo. No presente trabalho, assumimos que os isolados de basidiomicetos foram identificados como *Schizophyllum commune* SCM050722, *Irpex laceratus* ILM050722, *Phlebiopsis flavidoalba* PFM050722, e *Peniophora crassitunicata* PCS010223. Devido às limitações taxonômicas da região ITS na identificação de algumas espécies do filo Ascomycota, assumimos que os isolados de ascomicetos foram identificados como pertencentes aos gêneros *Endomelanconiopsis* (EEM140223), *Annulohypoxyylon* (ASS170223), e *Xylaria* (XHS310123 e XPM090323). O estudo filogenético foi realizado com a finalidade de demonstrar a associação filogenética entre os isolados e as sequencias-tipo (Figura 3).

Figura 3. Reconstrução da árvore filogenética de nove isolados de Basidiomycota e Ascomycota e sequências-tipo do NCBI utilizando o modelo Neighbor-Joining: Uma Análise Comparativa da Diversidade Genética e das Relações Evolutivas.



01 - SCM050722; 24 - CPOINPA1; 13 - PFM050722; 02 - ILM050722; 05 - PCS010223; 08 - ASS170223; 17 - EEM140223; 07 - XPM090323; 21 - XHS310123.

Os números em cada nó indicam a probabilidade de semelhança (%).

Avaliação da degradação de LDPE pelos fungos em meio com ágar

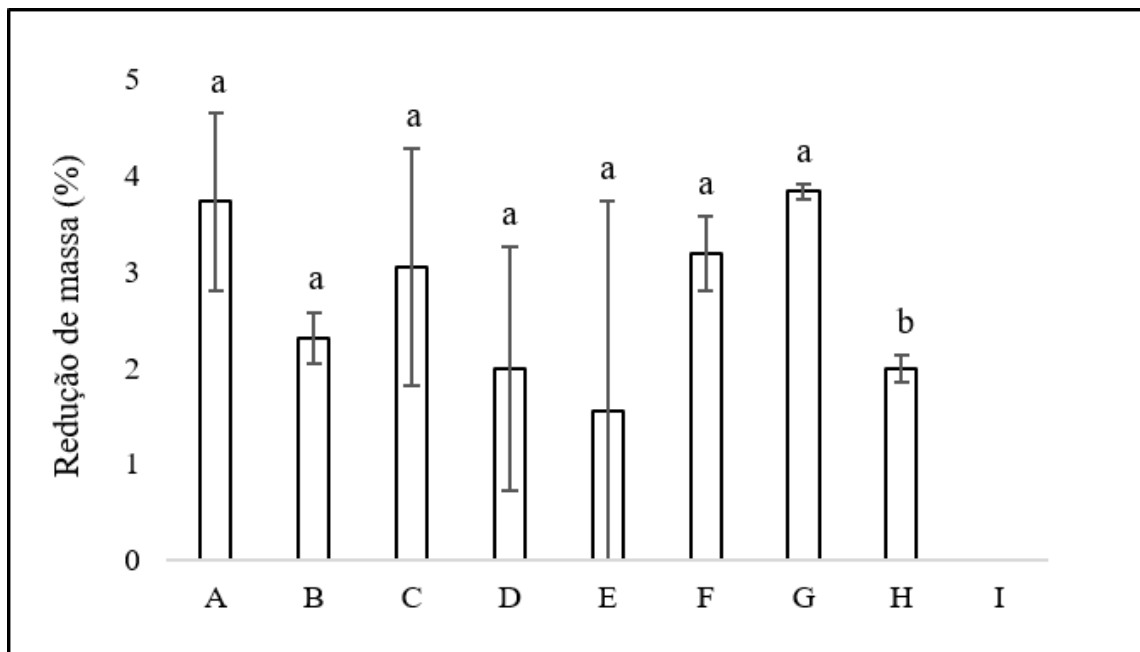
No presente estudo, foi investigada a capacidade de diferentes espécies de fungos isolados do Bosque da Ciência do INPA, Manaus-AM, em degradar plástico, bem como sua atividade enzimática de lacase e peroxidases, com o objetivo de determinar qual isolado seria mais adequado para degradar filmes de LDPE em meio sólido. Os resultados da avaliação estão detalhados na Tabela 2 e nas Figuras 4 e 5.

Tabela 2. Avaliação da redução de massa de filmes de LDPE, vigor micelial e produção de fenoloxidades (lacase e peroxidases) em superfície de meio ágar por fungos isolados do bosque do INPA, Manaus-AM.

Espécie	Redução de massa (%)	Vigor micelial	Atividade de Lacase ($\times 10^{-3} \text{ Ug}^{-1}$)	Atividade de Peroxidases ($\times 10^{-3} \text{ Ug}^{-1}$)
<i>Pleurotus ostreatus</i>	$3,7 \pm 0,9^a$	+++	$7,2 \pm 0,4^a$	$4,5 \pm 1,1^a$
<i>Schizophyllum commune</i>	$2,3 \pm 0,3^a$	++	$3,8 \pm 3^{a,b}$	$5,9 \pm 6,8^{a,b}$
<i>Irpex laceratus</i>	$3 \pm 1,2^a$	+++	$7,2 \pm 1,9^a$	n/d
<i>Phlebiopsis flavidoalba</i>	$2 \pm 1,3^a$	++	$3,2 \pm 0,8^b$	$0,8 \pm 1,1^b$
<i>Peniophora crassitunicata</i>	$1,5 \pm 2,2^a$	+	$1,3 \pm 1,1^b$	$2,4 \pm 1,9^{a,b}$
<i>Endomelanconiopsis endophytica</i>	$3,2 \pm 0,4^a$	+	$18,1 \pm 15,3^{a,b}$	$0,5 \pm 0,8^b$
<i>Annulohyphoxylon stygium</i>	$3,8 \pm 0,1^a$	+++	$1,6 \pm 1,5^b$	$0,3 \pm 0,4^b$
<i>Xylaria heliscus</i>	$2 \pm 0,1^b$	++	$4,8 \pm 1,5^a$	$2,7 \pm 3,8^{a,b}$
<i>Xylaria plebeja</i>	n/d	+	$11,9 \pm 3,4^{a,b}$	n/d

Letras diferentes indicam diferença estatística ao nível de segurança de 95% (ANOVA, Teste T).
n/d: não detectada.

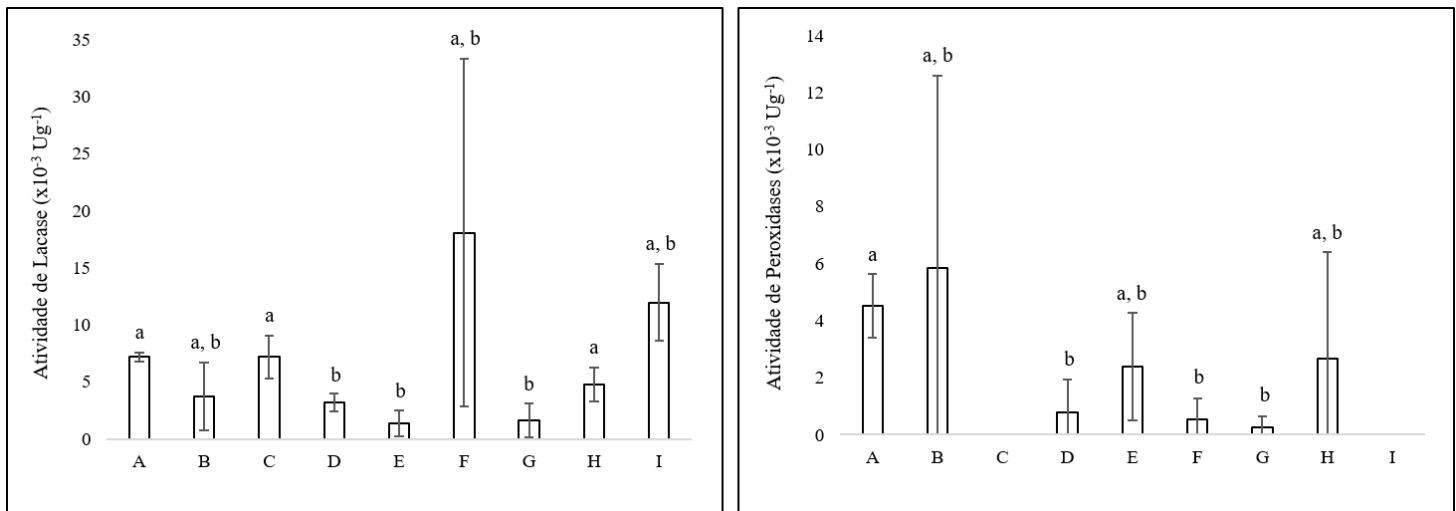
Figura 4. Redução de massa de filmes de LDPE (%) em superfície de meio ágar por fungos isolados do bosque do INPA, Manaus-AM.



A - *Pleurotus ostreatus* CPOINPA1; B - *Schizophyllum commune* SCM050722; C - *Irpex laceratus* ILM050722; D - *Phlebiopsis flavidoalba* PFM050722; E - *Peniophora crassitunicata* PCS010223; F - *Endomelanconiopsis endophytica* EEM140223; G - *Annulohyphoxylon stygium* ASS170223; H - *Xylaria heliscus* XHS310123; I - *Xylaria plebeja* XPM090323.

Letras diferentes indicam diferença estatística ao nível de segurança de 95% (ANOVA, Teste T).

Figura 5. Produção de fenoloxidas (lacase e peroxidases) (U/Kg) em superfície de meio ágar por fungos isolados do bosque do INPA, Manaus-AM.



A – *Pleurotus ostreatus* CPOINPA1; B - *Schizophyllum commune* SCM050722; C - *Irpex laceratus* ILM050722; D - *Phlebiopsis flavidoalba* PFM050722; E - *Peniophora crassitunicata* PCS010223; F - *Endomelanconiopsis endophytica* EEM140223; G - *Annulohyphoxylon stygium* ASS170223; H - *Xylaria heliscus* XHS310123; I - *Xylaria plebeja* XPM090323.

Letras diferentes indicam diferença estatística ao nível de segurança de 95% (ANOVA, Teste T).

Observamos que todos os isolados salvo *Xylaria plebeja* XPM090323 promoveram a redução de massa do plástico, com uma diminuição de 2-4%. Dentre estes, destacaram-se *Pleurotus ostreatus* CPOINPA1, *Irpex laceratus* ILM050722, *Endomelanconiopsis endophytica* EEM140223 e *Annulohyphoxylon stygium* ASS170223 (3-4%). Além disso, *E. endophytica* EEM140223 exibiu a atividade de lacase mais elevada, com um valor de 18,1 U/Kg. Por fim, em relação à atividade de peroxidases, *Schizophyllum commune* SCM050722 se destacou, apresentando a maior atividade com um valor de 5,9 U/Kg.

Avaliação da degradação de LDPE pelos fungos em meio líquido

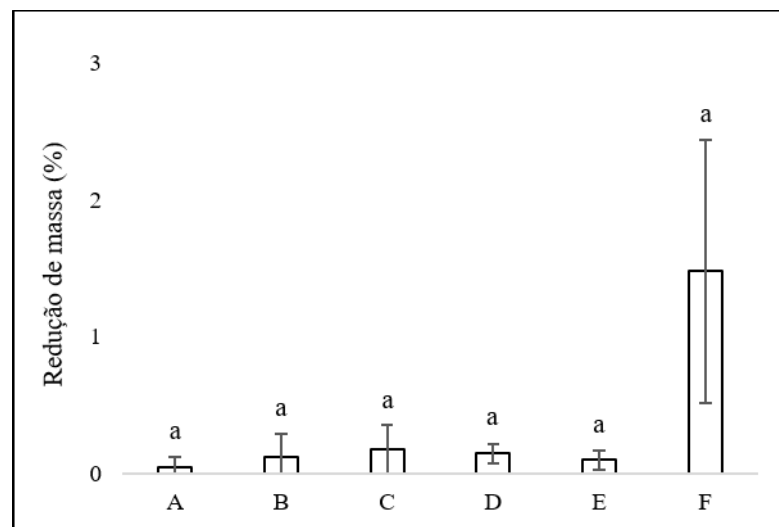
Neste estudo, alguns dos isolados foram submetidos a cultivo em meio líquido para avaliar sua capacidade de degradar filmes de LDPE. Os resultados mostram variações significativas na redução de massa, biomassa produzida, atividade de lacase e atividade de peroxidases entre as diferentes espécies de fungos analisadas. Os resultados do estudo estão detalhados na Tabela 3 e nas Figuras 6, 7 e 8.

Tabela 3. Avaliação da redução de massa de filmes de LDPE, biomassa produzida e produção de fenoloxidades (lacase e peroxidases) em meio líquido por fungos isolados do bosque do INPA, Manaus-AM.

Espécie	Redução de massa (%)	Biomassa (gL ⁻¹)	Atividade de Lacase (x10 ⁻³ UmL ⁻¹)	Atividade de Peroxidases (x10 ⁻³ UmL ⁻¹)
<i>Schizophyllum commune</i>	0,05 ± 0,07 ^a	2 ± 0,07 ^b	25,2 ± 16,9 ^a	n/d
<i>Irpex laceratus</i>	0,1 ± 0,2 ^a	1,9 ± 0,04 ^b	1,8 ± 0 ^b	0,9 ± 1,3 ^b
<i>Phlebiopsis flavidoalba</i>	0,2 ± 0,2 ^a	1,4 ± 0,15 ^b	13,7 ± 8,1 ^a	1,3 ± 1,9 ^b
<i>Endomelanconiopsis endophytica</i>	0,15 ± 0,07 ^a	2,8 ± 0,08 ^{a,b}	10,2 ± 5,6 ^a	n/d
<i>Xylaria heliscus</i>	0,1 ± 0,07 ^a	4,1 ± 0,5 ^a	4 ± 0,6 ^b	13,3 ± 3,8 ^a
<i>Xylaria plebeja</i>	1,5 ± 1 ^a	2,6 ± 0,4 ^{a,b}	15 ± 11,3 ^a	7,1 ± 10 ^{a,b}

Letras diferentes indicam diferença estatística ao nível de segurança de 95% (ANOVA, Teste T).
n/d: não detectada.

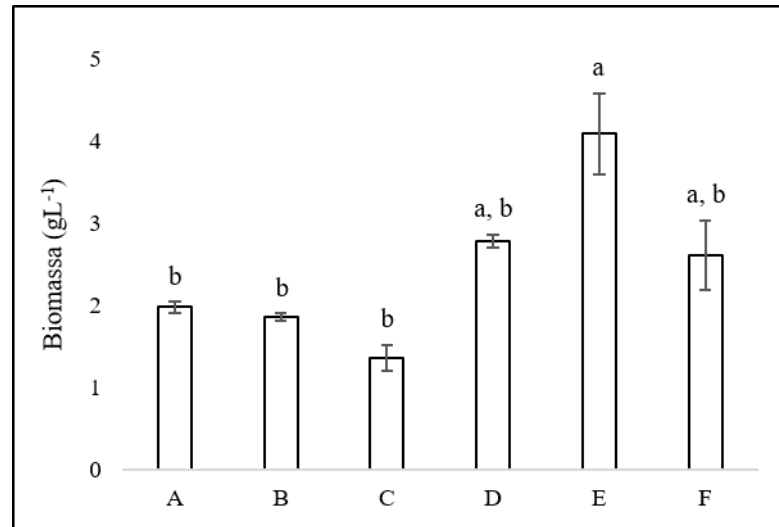
Figura 6. Redução de massa de filmes de LDPE (%) em meio líquido por fungos isolados do bosque do INPA, Manaus-AM.



A - *Schizophyllum commune* SCM050722; B - *Irpex laceratus* ILM050722; C - *Phlebiopsis flavidoalba* PFM050722; D - *Endomelanconiopsis endophytica* EEM140223; E - *Xylaria heliscus* XHS310123; F - *Xylaria plebeja* XPM090323.

Letras diferentes indicam diferença estatística ao nível de segurança de 95% (ANOVA, Teste T).

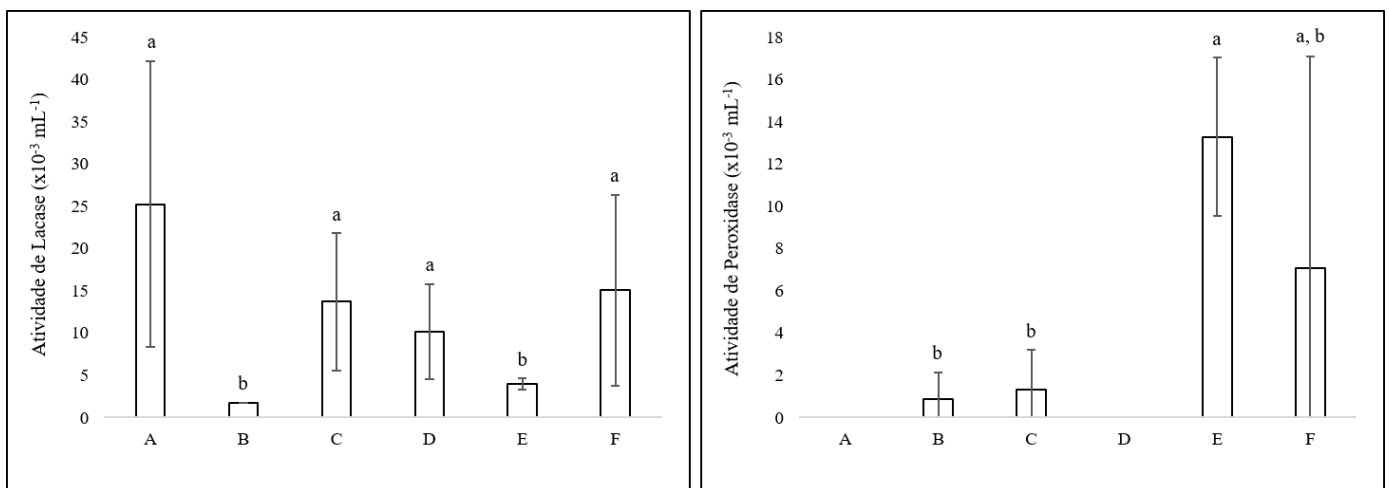
Figura 7. Biomassa produzida em cultivo com filmes de LDPE (g/L) em meio líquido por fungos isolados do bosque do INPA, Manaus-AM.



A - *Schizophyllum commune* SCM050722; B - *Irpex laceratus* ILM050722; C - *Phlebiopsis flavidoalba* PFM050722; D - *Endomelanconiopsis endophytica* EEM140223; E - *Xylaria heliscus* XHS310123; F - *Xylaria plebeja* XPM090323.

Letras diferentes indicam diferença estatística ao nível de segurança de 95% (ANOVA, Teste T).

Figura 8. Produção de fenoloxidades (lacase e peroxidases) (U/L) em meio líquido por fungos isolados do bosque do INPA, Manaus-AM.



A - *Schizophyllum commune* SCM050722; B - *Irpex laceratus* ILM050722; C - *Phlebiopsis flavidoalba* PFM050722; D - *Endomelanconiopsis endophytica* EEM140223; E - *Xylaria heliscus* XHS310123; F - *Xylaria plebeja* XPM090323.

Letras diferentes indicam diferença estatística ao nível de segurança de 95% (ANOVA, Teste T).

Observou-se que, no experimento em meio líquido, todos os isolados investigados promoveram alguma redução de massa do plástico, com *Xylaria plebeja* XPM090323 destacando-se como o mais eficiente na degradação do material (1,5%). O isolado *Xylaria heliscus* XHS310123 apresentou a maior produção de biomassa (4,1 g/L). Quanto à atividade de enzimas, *Schizophyllum commune* SCM050722 mostrou a maior atividade de lacase, com um valor de 25,2 U/L, enquanto *X. heliscus* XHS310123 exibiu a maior atividade de peroxidases, com um valor de 13,3 U/L.

DISCUSSÃO

Os resultados do presente estudo revelaram que foi possível isolar e identificar oito diferentes fungos a partir de amostras coletadas no Bosque do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA) em Manaus-AM. Esses fungos foram identificados como quatro pertencentes ao filo Basidiomycota e quatro ao filo Ascomycota. Esses achados constituem um passo importante na compreensão da diversidade microbiana desse ecossistema, fornecendo informações valiosas sobre a presença e a identidade de fungos que podem desempenhar um papel fundamental na degradação de materiais lignocelulósicos e plásticos.

A presença dos isolados de fungos obtidos a partir do Bosque do INPA está em consonância com estudos anteriores que identificaram uma ampla variedade de fungos lignocelulolíticos na região amazônica (Cavalcante et al., 2021; Patrício et al., 2021; Simões; Cavalcante; Lima, 2021). Isso indica que a microbiota fúngica desse ecossistema é rica e diversificada, o que é essencial para a degradação de materiais orgânicos complexos, como a lignina presente em materiais vegetais em decomposição. A identificação dos gêneros e espécies desses isolados por meio da região ITS é um avanço significativo, permitindo uma caracterização mais precisa das capacidades de degradação desses fungos em comparação com estudos anteriores (Lücking et al., 2020; Tekpinar; Kalmer, 2019).

No presente estudo consideramos que a análise filogenética baseada na região ITS permitiu a identificação dos isolados Basidiomycota até nível de espécie e Ascomycota até o nível de gênero, proporcionando uma base sólida para a compreensão de suas características e capacidades. A região ITS é amplamente utilizada em estudos de filogenia fúngica devido à sua alta variabilidade e capacidade de discriminação entre espécies. Os resultados obtidos neste estudo estão alinhados com estudos anteriores que demonstraram a eficácia dessa região para a identificação de fungos (Hofstetter et al., 2019; Perera et al., 2022; Sangale; Shahnawaz; Ade, 2019). Isso contribui para o conhecimento da biodiversidade fúngica na região e fornece

informações úteis para futuras investigações e estudos ecológicos.

Em relação à degradação de filmes de LDPE, considerando ambos experimentos, todos os isolados demonstraram capacidade similar de reduzir a massa dos filmes. Os resultados indicam que diferentes espécies de fungos apresentaram variabilidade na sua capacidade de degradar o material, em diferentes condições de cultivo. Em meio sólido, os isolados *Pleurotus ostreatus* CPOINPA1, *Irpex laceratus* ILM050722, *Endomelanconiopsis endophytica* EEM140223 e *Annulohyphoxylon stygium* ASS170223 demonstraram maior eficiência na degradação, e, em meio líquido, *Xylaria plebeja* XPM090323 destacou-se na redução de massa. Em ambos experimentos, os fungos exibiram diferentes níveis de atividade enzimática de lacase e peroxidases. Estes resultados evidenciam a complexidade do processo de biodegradação e como eles podem ser influenciados por diferentes fatores e variáveis. Os resultados sugerem que a degradação de LDPE por fungos ainda apresenta limitações, e destacam a necessidade de pesquisas adicionais para compreensão e otimização desse processo.

Foi possível constatar que a redução de massa pelos isolados foi baixa, em comparação com a literatura, onde os percentuais de redução de massa são variados. Tem sido argumentado que a medida da perda de massa não é um indicador preciso da biodegradação completa do polietileno, visto que a redução na massa pode indicar que outros compostos do material podem ter sido consumidos ao invés da cadeia principal do polímero, tais como cadeias laterais curtas e aditivos (Montazer; Najafi; Levin, 2020). Não obstante, a observação da redução da massa dos filmes de LDPE pelos isolados fornece evidência sólida da capacidade destes organismos de colonizar e exercer atividade biológica sobre este material, portanto fornecendo evidências da primeira etapa da biodegradação, a biodeterioração. Assim, a medida de perda de massa, ainda que apresente alta variabilidade entre estudos e indique apenas uma degradação parcial, permanece como um método simples e eficaz para monitorar o potencial de fungos de realizar a biodegradação do polietileno.

A avaliação da degradação de filmes de LDPE em meio líquido revelou que as condições experimentais empregadas neste estudo resultaram em uma degradação limitada do plástico. Isso sugere que, sob as condições testadas, a capacidade dos fungos isolados de degradar o LDPE em meio líquido foi restrita. Isso pode ser um desafio significativo na busca por soluções eficazes para a degradação de plásticos em ambientes aquáticos. Portanto, é importante investigar diferentes estratégias e condições para otimizar a degradação de plásticos nesse contexto.

Este estudo apresenta algumas limitações, incluindo uma amostragem relativamente baixa e a falta de representatividade da diversidade microbiana da floresta de terra firme típica

da Amazônia. Além disso, não foram conduzidos experimentos de otimização da biodegradação, o que poderia melhorar os resultados da degradação de plástico. Futuros estudos podem abordar essas limitações, expandindo a amostragem, considerando diferentes áreas da Amazônia na busca por isolados com potencial para degradar plástico, e explorando abordagens mais detalhadas para otimizar as metodologias de biodegradação. Além disso, a investigação de outras classes de polímeros e a interação de fungos com comunidades microbianas podem fornecer uma compreensão mais abrangente do processo de biodegradação.

Os resultados deste estudo têm implicações significativas em várias áreas. Do ponto de vista científico, contribuem para o conhecimento da biodiversidade microbiana na Amazônia, especialmente no que se refere à capacidade de degradação de materiais recalcitrantes. Economicamente, esses resultados podem abrir oportunidades para o desenvolvimento de tecnologias de biodegradação de plástico, o que é de grande relevância, dada a crescente preocupação com a poluição plástica em nível global. Ambientalmente, a pesquisa pode fornecer insights sobre a redução da acumulação de plásticos em ecossistemas naturais, como a Amazônia, com benefícios potenciais para a preservação da biodiversidade e a qualidade do solo e da água. Portanto, esses achados podem contribuir significativamente para a resolução do problema do plástico no mundo, bem como para o entendimento e preservação da Amazônia.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALI, S. S. *et al.* Plastic wastes biodegradation: Mechanisms, challenges and future prospects. **Science of the Total Environment**, Elsevier B.V., 1 ago. 2021.
- ALSHEHREI, F. Biodegradation of Synthetic and Natural Plastic by Microorganisms. **Journal of Applied & Environmental Microbiology**, v. 5, n. 1, p. 8–19, 2017.
- ALTSCHUL, S. F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E. W.; LIPMAN, D. J. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, v. 215, n. 3, p. 403-410, out. 1990.
- BACHA, A. U. R. *et al.* Biodegradation of macro- and micro-plastics in the environment: A review on mechanism, toxicity, and future perspectives. **Science of the Total Environment**, Elsevier B.V., 1 fev. 2023.
- BAHL, S. *et al.* Biodegradation of plastics: A state of the art review. **Materials Today: Proceedings**, Elsevier Ltd, 2020.
- CAVALCANTE, F. S. *et al.* Macrofungos pertencentes à família Polyporaceae no sudoeste da Amazônia, Brasil. **South American Journal of Basic Education, Technical and Technological**, v. 8, n. 1, 2021.
- CHAUDHARY, A. K. *et al.* Synergistic effect of UV, thermal, and chemical treatment on biological degradation of low-density polyethylene (LDPE) by *Thermomyces lanuginosus*.

Environmental Monitoring and Assessment, v. 193, n. 8, 1 ago. 2021.

CHEN, H. *et al.* Waste to Wealth: Chemical Recycling and Chemical Upcycling of Waste Plastics for a Great Future. **ChemSusChem**, John Wiley and Sons Inc, 5 out. 2021.

DALY, P. *et al.* From lignocellulose to plastics: Knowledge transfer on the degradation approaches by fungi. **Biotechnology Advances**, Elsevier Inc., 1 set. 2021.

DANSO, D.; CHOW, J.; STREITA, W. R. Plastics: Environmental and biotechnological perspectives on microbial degradation. **Applied and Environmental Microbiology**, American Society for Microbiology, 1 out. 2019.

EKANAYAKA, A. H. *et al.* A Review of the Fungi That Degrade Plastic. **Journal of Fungi**, MDPI, 1 ago. 2022.

FERRER, C. *et al.* Detection and identification of fungal pathogens by PCR and by ITS2 and 5.8S ribosomal DNA typing in ocular infections. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, n. 8, p. 2873–2879, 2001.

FORTUNA, J. L. **Protocolos de Coletas, Análises, Identificação e Armazenamento de Fungos Ambientais**. Teixeira de Freitas: Projeto Fungus Extremus, UNEB, Campus X. 2020, 37 p.

GHATGE, S. *et al.* Biodegradation of polyethylene: a brief review. **Applied Biological Chemistry**, Springer, 1 dez. 2020.

GÓMEZ-MÉNDEZ, L. D. *et al.* Biodeterioration of plasma pretreated LDPE sheets by *Pleurotus ostreatus*. **PLoS ONE**, v. 13, n. 9, 1 set. 2018.

HADIBARATA, T.; YUNIARTO, A. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by high-laccase basidiomycetes fungi isolated from tropical forest of Borneo. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 28, 1 set. 2020.

HAIDER, T. P. *et al.* Plastics of the Future? The Impact of Biodegradable Polymers on the Environment and on Society. **Angewandte Chemie - International Edition**, Wiley-VCH Verlag, 2 jan. 2019.

HOFSTETTER, V. *et al.* The unbearable lightness of sequenced-based identification. **Fungal Diversity**, v. 96, n. 1, p. 243–284, 1 maio 2019.

IYOSHI, Y.; TSUTSUMI, Y.; NISHIDA, T. Polyethylene degradation by lignin-degrading fungi and manganese peroxidase. **Journal of Wood Science**, v. 44, n. 3, p. 222–229, 1998.

JIMÉNEZ, D. J. *et al.* Merging Plastics, Microbes, and Enzymes: Highlights from an International Workshop. **Applied and Environmental Microbiology**, American Society for Microbiology, 1 jul. 2022.

KANG, B. R. *et al.* Accelerating the biodegradation of high-density polyethylene (Hdpe) using *bjerkandera adusta* tbb-03 and lignocellulose substrates. **Microorganisms**, v. 7, n. 9, 1 set. 2019.

- KHRUENGSAI, S.; SRIPAHCO, T.; PRIPDEEVECH, P. Low-density polyethylene film biodegradation potential by fungal species from thailand. **Journal of Fungi**, v. 7, n. 8, 1 ago. 2021.
- KUMAR, R. *et al.* Impacts of plastic pollution on ecosystem services, sustainable development goals, and need to focus on circular economy and policy interventions. **Sustainability** (Switzerland), MDPI, 1 set. 2021.
- KUMAR, S. *et al.* MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. **Molecular Biology and Evolution**, v. 35, n. 6, p. 1547–1549, 1 jun. 2018.
- KUTRALAM-MUNIASAMY, G. *et al.* Microplastic diagnostics in humans: “The 3Ps” Progress, problems, and prospects. **Science of the Total Environment**, Elsevier B.V., 15 jan. 2023.
- LEONOWICZ, A.; GRZYWNOWICZ, K. Quantitative estimation of laccase forms in some white-rot fungi using syringaldazine as a substrate. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 3, n. 1, p. 55-58, 1981.
- LÜCKING, R. *et al.* Unambiguous identification of fungi: Where do we stand and how accurate and precise is fungal DNA barcoding? **IMA Fungus**, v. 11, n. 1, 10 jul. 2020.
- MENDOZA, A. Y. G. *et al.* Potencialidades Biotecnológicas dos Fungos da Amazônia Brasileira: Uma Revisão Sistemática. **Diversitas Journal**, v. 7, n. 4, 2022.
- MISHRA, U. N.; DAS, S.; KANDALI, R. Bioremediation of Synthetic Polymers: Present and Future Prospects of Plastic Biodegradation. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, v. 9, n. 12, p. 1234–1247, 20 dez. 2020.
- MOHANAN, N. *et al.* Microbial and Enzymatic Degradation of Synthetic Plastics. **Frontiers in Microbiology**, Frontiers Media S.A., 26 nov. 2020.
- MONTAZER, Z.; NAJAFI, M. B. H.; LEVIN, D. B. Challenges with verifying microbial degradation of polyethylene. **Polymers**, MDPI AG, 1 jan. 2020.
- MUNIR, E. *et al.* Plastic degrading fungi *Trichoderma viride* and *Aspergillus nomius* isolated from local landfill soil in Medan. IOP Conference Series: **Earth and Environmental Science**. Anais... Institute of Physics Publishing, 19 mar. 2018.
- NAKAJIMA, V. M.; SOARES, F. E. DE F.; QUEIROZ, J. H. DE. Screening and decolorizing potential of enzymes from spent mushroom composts of six different mushrooms. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 13, p. 58–61, 1 jan. 2018.
- OKAL, E. J. *et al.* Insights into the mechanisms involved in the fungal degradation of plastics. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, Academic Press, 1 set. 2023.
- OLIVEIRA, A. M. *et al.* Current knowledge on the presence, biodegradation, and toxicity of discarded face masks in the environment. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 11, n. 2, 1 abr. 2023.
- PATRÍCIO, A. S. *et al.* Levantamento de macrofungos na Reserva Natural de Palmari, Atalaia do Norte, Amazonas. **Revista Biodiversidade**, v. 20, n. 3, 2021.

PERERA, T. W. N. K. *et al.* Biodeterioration of low-density polyethylene by mangrove-associated endolichenic fungi and their enzymatic regimes. **Letters in Applied Microbiology**, v. 75, n. 6, p. 1526–1537, 1 dez. 2022.

QUEIROZ, L. G *et al.* **Microplásticos: Há impacto potencial para a biota? Ensaios de toxicidade com modelos aquáticos.** Metais no sedimento em reservatórios . Disponível em: <http://ecologia.ib.usp.br/microplastico/>.2022

SALES, J. C. S. *et al.* A critical view on the technology readiness level (TRL) of microbial plastics biodegradation. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Springer Science and Business Media B.V., 1 jul. 2021.

SÁNCHEZ, C. Fungal potential for the degradation of petroleum-based polymers: An overview of macro- and microplastics biodegradation. **Biotechnology Advances**, Elsevier Inc., 1 maio 2020.

SANGALE, M. K.; SHAHNAWAZ, M.; ADE, A. B. Potential of fungi isolated from the dumping sites mangrove rhizosphere soil to degrade polythene. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, 1 dez. 2019.

SANTACRUZ-JUÁREZ, E. *et al.* Fungal enzymes for the degradation of polyethylene: Molecular docking simulation and biodegradation pathway proposal. **Journal of Hazardous Materials**, v. 411, 5 jun. 2021.

SHANKAR, S. *et al.* Microbial Degradation of Polyethylene: **Recent Progress and Challenges**. Em: [s.l: s.n.]. p. 245–262.

SHANKAR, S. *et al.* Microbial Degradation of Polyethylene: Recent Progress and Challenges. p. 245–262, 2019.

SHRESTHA, J. K. *et al.* Isolation and Identification of Low Density Polyethylene (LDPE) Degrading Bacillus spp. from a Soil of Landfill Site. 2. 30-34.. **ACTA SCIENTIFIC MICROBIOLOGY**. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/331702789>. 2019

SIMÕES, G. S.; CAVALCANTE, F. S.; LIMA, J. P. S. Contribuição aos conhecimentos da diversidade de fungos Basidiomycota no sul do Amazonas, Brasil. **Revista Gestão e Sustentabilidade Ambiental**, v. 10, n. 4, p. 203-217, dez. 2021.

SOUZA, João Vicente Braga de. **Seleção de fungos para tratamento de um efluente de deslignificação da indústria de nitrocelulose** – Lorena. 2004. 97 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Faculdade de Engenharia Química de Lorena, Universidade Estadual de São Paulo (USP).

SOWMYA, H. V. *et al.* Degradation of polyethylene by *Trichoderma harzianum*—SEM, FTIR, and NMR analyses. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 186, n. 10, p. 6577–6586, 1 out. 2014.

SRIKANTH, M. *et al.* Biodegradation of plastic polymers by fungi: a brief review. **Bioresources and Bioprocessing**, Springer Science and Business Media Deutschland GmbH, 1 dez. 2022.

SZKLARZ, G. D. *et al.* Production of Phenol Oxidases and Peroxidases by Wood-Rotting Fungi. **Mycologia**, v. 81, n. 2, p. 234–240, mar. 1989.

TAGHAVI, N. *et al.* Challenges in biodegradation of non-degradable thermoplastic waste: From environmental impact to operational readiness. **Biotechnology Advances**, Elsevier Inc., 1 jul. 2021.

TEKPINAR, A. D.; KALMER, A. Utility of various molecular markers in fungal identification and phylogeny. **Nova Hedwigia**, v. 109, n. 1, p. 187–224, 2019.

TEMPORITI, M. E. E. *et al.* Fungal Enzymes Involved in Plastics Biodegradation. **Microorganisms**, MDPI, 1 jun. 2022.

VENKATESH, S. *et al.* Microbial degradation of plastics: Sustainable approach to tackling environmental threats facing big cities of the future. **Journal of King Saud University - Science**, Elsevier B.V., 1 maio 2021.

YUAN, J. *et al.* Microbial degradation and other environmental aspects of microplastics/plastics. **Science of the Total Environment**, v. 715, 1 maio 2020

ZHANG, J.; GAO, D.; LI, Q.; ZHAO, Y.; LI, L.; LIN, H.; BI, Q.; ZHAO, Y. Biodegradação de partículas microplásticas de polietileno pelo fungo *Aspergillus flavus* proveniente dos intestinos da traça *Galleria mellonella*. **Science of The Total Environment**, v. 704, p. 135931, 2020.

6. CONCLUSÕES

Neste estudo, foram isoladas e identificadas oito cepas de fungos lignícolas do Bosque do INPA, Manaus–AM. Este é o primeiro estudo de biodegradação fúngica de plásticos voltado especificamente ao polietileno na região amazônica.

Todas as cepas estudadas mostraram potencial na degradação de LDPE, com destaque para os isolados *Pleurotus ostreatus* CPOINPA1, *Irpex laceratus* ILM050722, *Annulohyphoxylon stygium* ASS170223, *Endomelanconiopsis endophytica* EEM140223, e *Xylaria plebeja* XPM090323.

Todas as cepas estudadas demonstraram a capacidade de produzir fenoloxidasas, evidenciando o potencial para aplicações biotecnológicas.

Neste estudo, é relatado pela primeira vez o potencial de degradação de PE para as espécies *Irpex laceratus*, *Peniophora crassitunicata*, *Endomelanconiopsis endophytica*, *Annulohyphoxylon stygium*, *Xylaria heliscus* e *Xylaria plebeja*.

Para investigar este potencial, faz-se necessário conduzir estudos adicionais para otimizar os parâmetros de produção de fenoloxidasas e degradação de LDPE por estes isolados.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADERIYE, B. I. *et al.* Monitoring Fungal Biodegradation of Low-density Polyethylene [LDPE] from Plastic Wastes Dump Sites Using FT-IR Spectra. **Microbiology Research Journal International**, v. 26, n. 1, p. 1–15, 1 jan. 2019.
- AKPASI, S. O. *et al.* Mycoremediation as a Potentially Promising Technology: Current Status and Prospects—A Review. **Applied Sciences** (Switzerland) MDPI, 1 abr. 2023.
- ALI, M. I. *et al.* Isolation and molecular characterization of polyvinyl chloride (PVC) plastic degrading fungal isolates. **Journal of Basic Microbiology**, v. 54, n. 1, p. 18–27, jan. 2014.
- ALI, S. S. *et al.* Plastic wastes biodegradation: Mechanisms, challenges and future prospects. **Science of the Total Environment**, Elsevier B.V., 1 ago. 2021.
- ALLOUZI, M. M. A. *et al.* Micro (nano) plastic pollution: The ecological influence on soil-plant system and human health. **Science of the Total Environment**, v. 788, 20 set. 2021.
- ALSHEHREI, F. Biodegradation of Synthetic and Natural Plastic by Microorganisms. **Journal of Applied & Environmental Microbiology**, v. 5, n. 1, p. 8–19, 2017.
- ALTSCHUL, S. F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E. W.; LIPMAN, D. J. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, v. 215, n. 3, p. 403-410, out. 1990.
- AMEEN, F. *et al.* Biodegradation of low density polyethylene (LDPE) by mangrove fungi from the red sea coast. Progress in Rubber, **Plastics and Recycling Technology**, v. 31, n. 2, p. 125–144, 1 maio 2015.
- AZEVEDO, Isreele Jussara Gomes de. Microplásticos em peixes siluriformes comercializados em Itacoatiara (AM), Brasil. 2023. 56 f.: il. color; 31 cm. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia para Recursos Amazônicos) - Universidade Federal do Amazonas. Orientador: Gustavo Yomar Hattori. Coorientador: Gustavo Frigi Perotti.
- BACHA, A. U. R. *et al.* Biodegradation of macro- and micro-plastics in the environment: A review on mechanism, toxicity, and future perspectives. **Science of the Total Environment**, Elsevier B.V., 1 fev. 2023.
- BAHL, S. *et al.* Biodegradation of plastics: A state of the art review. **Materials Today: Proceedings**, Elsevier Ltd, 2020.
- BARI, E. *et al.* Decay capacity and degradation patterns of Xylaria hypoxylon on different wood species Decay capacity and degradation patterns of Xylaria hypoxylon on different wood species. [Disponível em: <www.irg-wp.com>.2022.
- CAVALCANTE, F. S. *et al.* Macrofungos pertencentes à família Polyporaceae no sudoeste da Amazônia, Brasil. **South American Journal of Basic Education, Technical and Technological**, v. 8, n. 1, 2021.
- CHAUDHARY, A. K. *et al.* Synergistic effect of UV, thermal, and chemical treatment on biological degradation of low-density polyethylene (LDPE) by *Thermomyces lanuginosus*. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 193, n. 8, 1 ago. 2021.

- CHEN, H. *et al.* Waste to Wealth: Chemical Recycling and Chemical Upcycling of Waste Plastics for a Great Future. **ChemSusChem** John Wiley and Sons Inc, , 5 out. 2021.
- CHIA, W. Y. *et al.* Nature's fight against plastic pollution: Algae for plastic biodegradation and bioplastics production. **Environmental Science and Ecotechnology** Elsevier B.V., 1 out. 2020.
- DA LUZ, J. M. R. *et al.* Degradation of green polyethylene by *Pleurotus ostreatus*. **PLoS ONE**, v. 10, n. 6, 15 jun. 2015.
- DA LUZ, J. M. R. *et al.* Degradation of Oxo-Biodegradable Plastic by *Pleurotus ostreatus*. **PLoS ONE**, v. 8, n. 8, 15 ago. 2013.
- DA LUZ, J. M. R. *et al.* Plastics Polymers Degradation by Fungi. *In*: BLUMENBERG, M.; SHAABAN, M.; ELGAML, A. **Microrganisms. IntechOpen**, 2020.
- DALY, P. *et al.* From lignocellulose to plastics: Knowledge transfer on the degradation approaches by fungi. **Biotechnology Advances**, Elsevier Inc., 1 set. 2021.
- DANSO, D.; CHOW, J.; STREITA, W. R. Plastics: Environmental and biotechnological perspectives on microbial degradation. **Applied and Environmental Microbiology**, American Society for Microbiology, 1 out. 2019.
- DEMETS, R. *et al.* Addressing the complex challenge of understanding and quantifying substitutability for recycled plastics. **Resources, Conservation and Recycling**, v. 174, 1 nov. 2021.
- EKANAYAKA, A. H. *et al.* A Review of the Fungi That Degrade Plastic. **Journal of Fungi**, MDPI, 1 ago. 2022.
- FERRER, C. *et al.* Detection and identification of fungal pathogens by PCR and by ITS2 and 5.8S ribosomal DNA typing in ocular infections. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, n. 8, p. 2873–2879, 2001.
- FILICIOTTO, L.; ROTHENBERG, G. Biodegradable Plastics: Standards, Policies, and Impacts. **ChemSusChem** Wiley-VCH Verlag, , 7 jan. 2021.
- FORTUNA, J. L. **Apostila da Disciplina de Biologia dos Fungos**. Teixeira de Freitas: Projeto Fungus Extremus, UNEB, Campus X. 2020, 27 p.
- FORTUNA, J. L. **Protocolos de Coletas, Análises, Identificação e Armazenamento de Fungos Ambientais**. Teixeira de Freitas: Projeto Fungus Extremus, UNEB, Campus X. 2020, 37 p.
- FORTUNA, J. L. **Protocolos de Coletas, Análises, Identificação e Armazenamento de Fungos Ambientais**. Teixeira de Freitas: Projeto Fungus Extremus, UNEB, Campus X. 2020, 37 p.
- FREIRE, B. *et al.* Produção de enzimas lignocelulolíticas por fermentação em estado sólido de resíduos agroindustriais sob ação de fungo basidiomiceto. p. 640–647, 2015.
- FUJISAWA, M.; HIRAI, H.; NISHIDA, T. Degradation of Polyethylene and Nylon-66 by the

- Laccase-Mediator System. *Journal of Polymers and the Environment*, v. 9, n. 3, jul. 2001.
- GAMBARINI, V. *et al.* Phylogenetic Distribution of Plastic-Degrading Microorganisms. **mSystems**, v. 6, n. 1, 23 fev. 2021.
- GEROLIN, C. R. *et al.* Microplastics in sediments from Amazon rivers, Brazil. **Science of the Total Environment**, v. 749, 20 dez. 2020.
- GHATGE, S. *et al.* Biodegradation of polyethylene: a brief review. **Applied Biological Chemistry**, Springer, 1 dez. 2020.
- GÓMEZ-MÉNDEZ, L. D. *et al.* Biodeterioration of plasma pretreated LDPE sheets by *Pleurotus ostreatus*. **PLoS ONE**, v. 13, n. 9, 1 set. 2018.
- HADIBARATA, T.; YUNIARTO, A. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by high-laccase basidiomycetes fungi isolated from tropical forest of Borneo. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 28, 1 set. 2020.
- HAIDER, T. P. *et al.* Plastics of the Future? The Impact of Biodegradable Polymers on the Environment and on Society. **Angewandte Chemie - International Edition**, Wiley-VCH Verlag, 2 jan. 2019.
- HE, M. Q. *et al.* Notes, outline and divergence times of Basidiomycota. **Fungal Diversity**, v. 99, n. 1, p. 105–367, 1 nov. 2019.
- HE, M. Q. *et al.* Species diversity of Basidiomycota. **Fungal Diversity** Springer Science and Business Media B.V., 1 maio 2022.
- HOFSTETTER, V. *et al.* The unbearable lightness of sequenced-based identification. **Fungal Diversity**, v. 96, n. 1, p. 243–284, 1 maio 2019.
- IYOSHI, Y.; TSUTSUMI, Y.; NISHIDA, T. Polyethylene degradation by lignin-degrading fungi and manganese peroxidase. **Journal of Wood Science**, v. 44, n. 3, p. 222–229, 1998.
- IWAŃCZUK, A. *et al.* Anaerobic Biodegradation of Polymer Composites Filled with Natural Fibers. **Journal of Polymers and the Environment**, v. 23, n. 2, p. 277–282, 22 jun. 2015.
- JIMÉNEZ, D. J. *et al.* Merging Plastics, Microbes, and Enzymes: Highlights from an International Workshop. **Applied and Environmental Microbiology**, American Society for Microbiology, 1 jul. 2022.
- KANG, B. R. *et al.* Accelerating the biodegradation of high-density polyethylene (Hdpe) using *bjerkandera adusta* tbb-03 and lignocellulose substrates. **Microorganisms**, v. 7, n. 9, 1 set. 2019.
- KHRUENGSAI, S.; SRIPAHCO, T.; PRIPDEEVECH, P. Low-density polyethylene film biodegradation potential by fungal species from thailand. **Journal of Fungi**, v. 7, n. 8, 1 ago. 2021.
- KUMAR, R. *et al.* Impacts of plastic pollution on ecosystem services, sustainable development goals, and need to focus on circular economy and policy interventions. **Sustainability** (Switzerland), MDPI, 1 set. 2021.

KUMAR, S. *et al.* MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. **Molecular Biology and Evolution**, v. 35, n. 6, p. 1547–1549, 1 jun. 2018.

KUTRALAM-MUNIASAMY, G. *et al.* Microplastic diagnostics in humans: “The 3Ps” Progress, problems, and prospects. **Science of the Total Environment**, Elsevier B.V., 15 jan. 2023.

LA FUENTE, C. I. A.; MANIGLIA, B. C.; TADINI, C. C. Biodegradable polymers: A review about biodegradation and its implications and applications. **Packaging Technology and Science** John Wiley and Sons Ltd, , 1 fev. 2023.

LASMAR, R. P.; DAMASCENO, A. A. Bioprospecção de Fungos Basidiomicetos Produtores de Enzimas Oxidativas Coletados no Município de Alvarães - Amazonas. **Recursos Naturais**, p. 1-10, 2017.

LEE, B. *et al.* Biodegradation of Degradable Plastic Polyethylene by Phanerochaete and Streptomyces Species. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 57, n. 3, p. 678-685, 1991.

LEONOWICZ, A.; GRZYWNOWICZ, K. Quantitative estimation of laccase forms in some white-rot fungi using syringaldazine as a substrate. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 3, n. 1, p. 55-58, 1981.

LI, C.T. *et al.* PAH emission from the incineration of three plastic wastes. **Environment International**, v. 27, n. 1, 2001, p. 61-67.

LI, S. *et al.* Recent advances in biodegradation of emerging contaminants - microplastics (MPs): Feasibility, mechanism, and future prospects. **Chemosphere Elsevier Ltd**, 1 ago. 2023.

LOPES, Alfredo. **Igarapé do Mindu, retrato dramático da civilização Manaó**. Brasil Amazônia Agora, 22 de março de 2021. Disponível em: <https://brasilamazoniaagora.com.br/2021/igarape-mindu-retrato-dramatico-civilizacao-manao/>.

LÜCKING, R. *et al.* Unambiguous identification of fungi: Where do we stand and how accurate and precise is fungal DNA barcoding? **IMA Fungus**, v. 11, n. 1, 10 jul. 2020.

MALACHOVÁ, K. *et al.* Ability of *Trichoderma hamatum* isolated from plastics-polluted environments to attack petroleum-based, synthetic polymer films. **Processes**, v. 8, n. 4, 1 abr. 2020.

MENDOZA, A. Y. G. *et al.* Potencialidades Biotecnológicas dos Fungos da Amazônia Brasileira: Uma Revisão Sistemática. **Diversitas Journal**, v. 7, n. 4, 2022.

MENEZES, Alik. **Falta de recursos é entrave para a implantação de aterros sanitários no AM**. A Crítica, 05 de dezembro de 2018, 09:10. Atualizado em 11 de março de 2022.

MIRI, S. *et al.* Biodegradation of microplastics: Better late than never. **Chemosphere Elsevier Ltd**, , 1 jan. 2022.

MISHRA, U. N.; DAS, S.; KANDALI, R. Bioremediation of Synthetic Polymers: Present and Future Prospects of Plastic Biodegradation. **International Journal of Current Microbiology**

and **Applied Sciences**, v. 9, n. 12, p. 1234–1247, 20 dez. 2020.

MOHANAN, N. *et al.* Microbial and Enzymatic Degradation of Synthetic Plastics. **Frontiers in Microbiology**, Frontiers Media S.A., 26 nov. 2020.

MONTAZER, Z.; NAJAFI, M. B. H.; LEVIN, D. B. Challenges with verifying microbial degradation of polyethylene. **Polymers**, MDPI AG, 1 jan. 2020.

MUKHERJEE, S.; KUNDU, P. P. Alkaline fungal degradation of oxidized polyethylene in black liquor: Studies on the effect of lignin peroxidases and manganese peroxidases. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 131, n. 17, p. 8982–8990, 5 ago. 2014.

MUNIR, E. *et al.* Plastic degrading fungi *Trichoderma viride* and *Aspergillus nomius* isolated from local landfill soil in Medan. IOP Conference Series: **Earth and Environmental Science**. Anais... Institute of Physics Publishing, 19 mar. 2018.

NAKAJIMA, V. M.; SOARES, F. E. DE F.; QUEIROZ, J. H. DE. Screening and decolorizing potential of enzymes from spent mushroom composts of six different mushrooms. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 13, p. 58–61, 1 jan. 2018.

NGHI, D. H. *et al.* The wood rot ascomycete *Xylaria polymorpha* produces a novel GH78 glycoside hydrolase that exhibits α -L-rhamnosidase and feruloyl esterase activities and releases hydroxycinnamic acids from lignocelluloses. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 78, n. 14, p. 4893–4901, jul. 2012.

NWOGU, N. Capability of selected mushrooms to biodegrade polyethylene. **Mycosphere**, v. 3, n. 4, p. 455–462, 2012.

OKAL, E. J. *et al.* Insights into the mechanisms involved in the fungal degradation of plastics. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, Academic Press, 1 set. 2023.

OLIVEIRA, A. M. *et al.* Current knowledge on the presence, biodegradation, and toxicity of discarded face masks in the environment. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 11, n. 2, 1 abr. 2023.

PATRÍCIO, A. S. *et al.* Levantamento de macrofungos na Reserva Natural de Palmari, Atalaia do Norte, Amazonas. **Revista Biodiversidade**, v. 20, n. 3, 2021.

PERERA, T. W. N. K. *et al.* Biodeterioration of low-density polyethylene by mangrove-associated endolichenic fungi and their enzymatic regimes. **Letters in Applied Microbiology**, v. 75, n. 6, p. 1526–1537, 1 dez. 2022.

QUEIROZ, L. G. *et al.* **Microplásticos: Há impacto potencial para a biota? Ensaio de toxicidade com modelos aquáticos.** Metais no sedimento em reservatórios. Disponível em: <http://ecologia.ib.usp.br/microplastico/>.2022.

QUEIROZ, L. G. *et al.* **Microplásticos: Há impacto potencial para a biota? Ensaio de toxicidade com modelos aquáticos.** Metais no sedimento em reservatórios. Disponível em: <http://ecologia.ib.usp.br/microplastico/>.2022.

REN, X. *et al.* Effects of microplastics on greenhouse gas emissions and the microbial community in fertilized soil. **Environmental Pollution**, v. 256, 1 jan. 2020.

RIBEIRO-BRASIL, Daniele Regina Góes; TORRES, Nathane Rodrigues; PICANÇO, Ana Bruna; SOUSA, Daniele dos Santos; RIBEIRO, Victor Santos; BRASIL, Luciana dos Santos; MONTAG, Luciano Fernandes de Almeida. Contamination of stream fish by plastic waste in the Brazilian Amazon. **Environmental Pollution**, v. 266, Pt 1, p. 115241, nov. 2020.

SÁENZ, M. *et al.* Minimal conditions to degrade low density polyethylene by *Aspergillus terreus* and *niger*. **Journal of Ecological Engineering**, v. 20, n. 6, p. 44–51, 2019.

SALES, J. C. S. *et al.* A critical view on the technology readiness level (TRL) of microbial plastics biodegradation. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Springer Science and Business Media B.V., 1 jul. 2021.

SÁNCHEZ, C. Fungal potential for the degradation of petroleum-based polymers: An overview of macro- and microplastics biodegradation. **Biotechnology Advances**, Elsevier Inc., 1 maio 2020.

SANGALE, M. K.; SHAHNAWAZ, M.; ADE, A. B. Potential of fungi isolated from the dumping sites mangrove rhizosphere soil to degrade polythene. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, 1 dez. 2019.

SANTACRUZ-JUÁREZ, E. *et al.* Fungal enzymes for the degradation of polyethylene: Molecular docking simulation and biodegradation pathway proposal. **Journal of Hazardous Materials**, v. 411, 5 jun. 2021.

SHAHNAWAZ, MOHD.; SANGALE, M. K.; ADE, A. B. Case Studies and Recent Update of Plastic Waste Degradation. Em: **Bioremediation Technology for Plastic Waste**. [s.l.] Springer Singapore, 2019. p. 31–43.

SHANKAR, S. *et al.* Microbial Degradation of Polyethylene: Recent Progress and Challenges. p. 245–262, 2019.

SHARMA, S. R. Bioremediation of Polythenes and Plastics: A Microbial Approach. Em: **Nanotechnology in the Life Sciences**. [s.l.] Springer Science and Business Media B.V., 2018. p. 97–114.

SHRESTHA, J. K. *et al.* Isolation and Identification of Low Density Polyethylene (LDPE) Degrading *Bacillus* spp. from a Soil of Landfill Site. 2. 30-34.. **ACTA SCIENTIFIC MICROBIOLOGY**. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/331702789>. 2019

SIMÕES, G. S.; CAVALCANTE, F. S.; LIMA, J. P. S. Contribuição aos conhecimentos da diversidade de fungos Basidiomycota no sul do Amazonas, Brasil. **Revista Gestão e Sustentabilidade Ambiental**, v. 10, n. 4, p. 203-217, dez. 2021.

SINGH, J.; GUPTA, K. C. 2014. Screening and Identification of Low density Polyethylene (LDPE) Degrading Soil Fungi Isolated from Polythene Polluted Sites around Gwalior city (M.P.). **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, v. 3, n. 6, p. 443-448, 2014.

SOUZA, G. R. ; SILVA, N. M. ;; OLIVEIRA, D. P. Distribuição longitudinal, vertical e temporal de microplásticos no Igarapé do Mindu em Manaus, Amazonas..Eng Sanit Ambient v. 28, e20220234.2023.

SOUZA, João Vicente Braga de. **Seleção de fungos para tratamento de um efluente de deslignificação da indústria de nitrocelulose** – Lorena. 2004. 97 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Faculdade de Engenharia Química de Lorena, Universidade Estadual de São Paulo (USP).

SOUZA, L. A. "Polietileno"; Brasil Escola. Disponível em: <https://brasilescola.uol.com.br/quimica/polietileno.htm>. Acesso em 10 de dezembro de 2023.

SOWMYA, H. V. *et al.* Degradation of polyethylene by *Trichoderma harzianum*—SEM, FTIR, and NMR analyses. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 186, n. 10, p. 6577–6586, 1 out. 2014.

SPINA, F. *et al.* Low density polyethylene degradation by filamentous fungi. **Environmental Pollution**, v. 274, 1 abr. 2021.

SRIKANTH, M. *et al.* Biodegradation of plastic polymers by fungi: a brief review. **Bioresources and Bioprocessing**, Springer Science and Business Media Deutschland GmbH, 1 dez. 2022.

STAPLETON, P. A. Microplastic and nanoplastic transfer, accumulation, and toxicity in humans. **Current Opinion in Toxicology** Elsevier B.V., 1 dez. 2021.

SZKLARZ, G. D. *et al.* Production of Phenol Oxidases and Peroxidases by Wood-Rotting Fungi. **Mycologia**, v. 81, n. 2, p. 234–240, mar. 1989.

TAGHAVI, N. *et al.* Challenges in biodegradation of non-degradable thermoplastic waste: From environmental impact to operational readiness. **Biotechnology Advances**, Elsevier Inc., 1 jul. 2021.

TEDERSOO, L. *et al.* High-level classification of the Fungi and a tool for evolutionary ecological analyses. **Fungal Diversity**, v. 90, n. 1, p. 135–159, 1 maio 2018.

TEKPINAR, A. D.; KALMER, A. Utility of various molecular markers in fungal identification and phylogeny. **Nova Hedwigia**, v. 109, n. 1, p. 187–224, 2019.

TEMPORITI, M. E. E. *et al.* Fungal Enzymes Involved in Plastics Biodegradation. **Microorganisms**, MDPI, 1 jun. 2022.

VENKATESH, S. *et al.* Microbial degradation of plastics: Sustainable approach to tackling environmental threats facing big cities of the future. **Journal of King Saud University - Science**, Elsevier B.V., 1 maio 2021.

WHITE, T. D. *et al.* Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA Genes for phylogenetics Forensic DNA technology **Evolution of Gene Expression**. 1990. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/223397588>.

YANG, Y. *et al.* Detection of Various Microplastics in Patients Undergoing Cardiac Surgery. **Environmental Science and Technology**, v. 57, n. 30, p. 10911–10918, 1 ago. 2023.

YASIN, N.; AKKERMANS, S.; VAN IMPE, J. F. M. Enhancing the biodegradation of (bio)plastic through pretreatments: A critical review. **Waste Management** Elsevier Ltd, , 1 ago. 2022.

YUAN, J. *et al.* Microbial degradation and other environmental aspects of microplastics/plastics. **Science of the Total Environment**, v. 715, 1 maio 2020

ZHANG, C. *et al.* Assembly strategies for polyethylene-degrading microbial consortia based on the combination of omics tools and the “Plastisphere”. **Frontiers in Microbiology** Frontiers Media S.A., 2023.

ZHANG, J.; GAO, D.; LI, Q.; ZHAO, Y.; LI, L.; LIN, H.; BI, Q.; ZHAO, Y. Biodegradação de partículas microplásticas de polietileno pelo fungo *Aspergillus flavus* proveniente dos intestinos da traça *Galleria mellonella*. **Science of The Total Environment**, v. 704, p. 135931, 2020.

ZHU, L. *et al.* Identification of microplastics in human placenta using laser direct infrared spectroscopy. **Science of the Total Environment**, v. 856, 15 jan. 2023.