



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE PROCESSOS**

**PATRÍCIA MARINHO SAMPAIO ABREU**

**BIODEGRADAÇÃO DE POLI(ÁCIDO LÁTICO) E POLIPROPILENO POR**  
***Psilocybe castanella* EM PROCESSO DE FERMENTAÇÃO DE RESÍDUO DE**  
**COCO VERDE**

Campina Grande

2019

**PATRÍCIA MARINHO SAMPAIO ABREU**

**BIODEGRADAÇÃO DE POLI(ÁCIDO LÁTICO) E POLIPROPILENO POR  
*Psilocybe castanella* EM PROCESSO DE FERMENTAÇÃO DE RESÍDUO DE  
COCO VERDE**

Tese submetida ao programa de Pós-Graduação em Engenharia de Processos da Universidade Federal de Campina Grande para a obtenção do título de **Doutora em Engenharia de Processos**.

Área de Concentração: Desenvolvimento de Processos

Orientadoras: Profa. Dra. Líbia de Sousa  
Conrado Oliveira

Campina Grande

2019

A162b Abreu, Patrícia Marinho Sampaio.

Biodegradação de poli(ácido lático) e polipropileno por *Psilocybe castanella* em processo de fermentação de resíduo de coco verde / Patrícia Marinho Sampaio Abreu. – Campina Grande, 2019.

100 f.: il.

Tese (Doutorado em Engenharia de Processos) – Universidade Federal de Campina Grande, Centro de Ciência e Tecnologia, 2019.

"Orientação: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Líbia de Sousa Conrado Oliveira".

Referências.

1. *Psilocybe castanella*. 2. Basidiomicetos. 3. Lacase. 4. MnP. 5. Polímeros. 6. Sustentabilidade. I. Oliveira, Líbia de Sousa Conrado Oliveira. II. Título.

CDU 678.7(043)

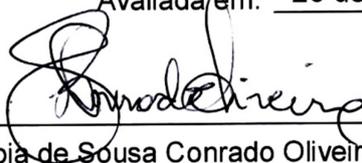
**PATRÍCIA MARINHO SAMPAIO ABREU**

**BIODEGRADAÇÃO DE POLI(ÁCIDO LÁTICO) E POLIPROPILENO POR  
*Psilocybe castanella* EM PROCESSO DE FERMENTAÇÃO DE RESÍDUO DE  
COCO VERDE**

Tese submetida ao programa de Pós-Graduação  
em Engenharia de Processos da Universidade  
Federal de Campina Grande para a obtenção do  
título de **Doutora em Engenharia de  
Processos.**

Área de Concentração: Desenvolvimento de  
Processos

Avaliada em: 26 de Fevereiro de 2019



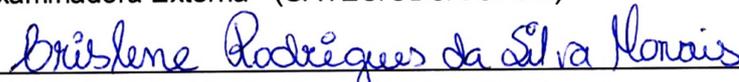
\_\_\_\_\_  
Profa. Dra. Líbia de Sousa Conrado Oliveira

Orientadora - (UAEQ/CCT/UFCEG)



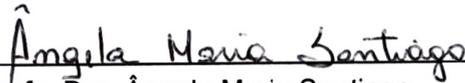
\_\_\_\_\_  
Profa. Dra. Glauciane Danusa Coelho

Examinadora Externa - (UATEC/CDSA/UFCEG)



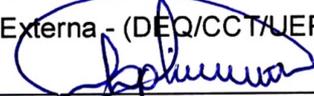
\_\_\_\_\_  
Profa. Dra. Crislene Rodrigues da Silva Moraes

Examinadora Externa - (UAEMA/CCT/UFCEG)



\_\_\_\_\_  
Profa. Dra. Ângela Maria Santiago

Examinadora Externa - (DEQ/CCT/UEPB)



\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Laércio Gomes de Oliveira

Examinador Externo - (UAEQ/CCT/UFCEG)



\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Rafael Trindade Maia

Examinador Externo - (UAEDUC/CDSA/UFCEG)

Campina Grande

2019

A mãe Terra, dedico.

## **AGRADECIMENTOS**

Ao Universo, que fez todo o necessário para que tudo acontecesse. Agradeço, antes de tudo, reconhecer a pessoa plena e feliz que já sou.

A Pedro, por fazer do mundo um lugar melhor e de mim uma pessoa mais corajosa.

A minha mãe, meu pouso seguro fortalecedor e meu pai, por me mostrar que todas as coisas da vida passam ou podem ser consertadas. Agradeço por fazerem isso por mim na infância e agora pelo meu filho também.

A Glauciane. Não tem outra pessoa no mundo para fazer essa jornada, que não ao lado dela. Aconselhando e torcendo e vibrando, fazendo o que incentivadores de pessoas fazem.

A Gê, pela jornada. Aos manos amados, Flora e Rogério, amigos que a vida me deu de presente. A Tati, por ter tornado o mundo um lugar melhor desde que chegou.

A Líbia, minha amiga, orientadora, companheira de percurso. Hoje a mulher que eu sou está conectada a você por um fio invisível que tecemos juntas.

A Amparo, pelo amor e apoio nos momentos mais difíceis.

A Edneide, tia amada, por sempre acreditar no meu potencial.

A Romildo Brito, por não me deixar esquecer que temos que fazer sempre o melhor.

Aos professores, Tomás Jefferson, Crislene Moraes, Ângela Santiago, Laércio Gomes, Rossana Feitosa, pelo acolhimento.

Aos amigos queridos, Giovanna, Rebeca, Harlan, Sr. Jardes, Sr. Lopes, Nara Ballaminut, Pankaj, Jean, Danilo, muitíssimo obrigada por toda contribuição e afeto.

A Universidade Federal de Campina Grande, pela contribuição profissional e pelos amigos.

A Capes, agência de fomento, por me permitir explorar o melhor de minhas competências.

Ao Instituto de Botânica de São Paulo, pela parceria.

A banca examinadora, pela cuidadosa e amorosa contribuição.

A todas as pessoas que dão a sua contribuição em defesa dos valores da vida, cuidando da TERRA. Essa conexão e esses milagres estão disponíveis a todos.

Que fique registrada a minha GRATIDÃO.

Desejo amor e coragem para todo mundo.

## RESUMO

ABREU, P. M. S. **Biodegradação de poli(ácido láctico) e polipropileno por *Psilocybe castanella* em processo de fermentação de resíduo de coco verde**. 2019. 100 folhas. Tese (Doutorado em Engenharia de Processos) – Centro de Ciências e Tecnologia, Universidade Federal de Campina Grande (UFCG). Paraíba, 2019.

O consumo de produtos poliméricos ao longo dos anos vem gerando grande número de resíduos, que se acumulam nos oceanos e aterros, resultando graves problemas ambientais. Basidiomicetos são fungos produtores de enzimas que hidrolisam polímeros de subprodutos lignocelulósicos em processos fermentativos e têm despertado o interesse acadêmico e tecnológico por apresentar características desejáveis na degradação de produtos poluentes recalcitrantes. Nesse sentido, esta pesquisa avaliou a produção de enzimas por *Psilocybe castanella* CCIBt 2781 em processo de fermentação semissólida (FSS) utilizando resíduo agroindustrial, com foco na biodegradação de poli(ácido láctico) (PLA) e polipropileno (PP) de copos descartáveis. O fungo foi cultivado em resíduo de coco verde com adição de farinha de soja de forma a manter C/N de 32, com e sem adição de corante têxtil sintético Azul Brilhante de Remazol R (RBBR), usado como mediador enzimático. As atividades de lacase foram determinadas pela oxidação do ABTS e manganês peroxidase (MnP) pela oxidação do vermelho de fenol. Os maiores valores de atividade foram obtidos com 5 dias de fermentação ( $272,13 \text{ UL}^{-1}$  e  $112,04 \text{ UL}^{-1}$ ). As enzimas apresentaram pH e T ótimos, de 4,8 e  $60^\circ\text{C}$ . A degradação foi avaliada pelas propriedades e a morfologia dos polímeros, por microscopia ótica (MO) e eletrônica de varredura (MEV), por análise termogravimétrica (TG) e calorimetria exploratória diferencial (DSC) e por espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) e difração de raios X (DRX). A morfologia indicou que houve crescimento micelial sobre as superfícies dos polímeros, confirmando a produção de biomassa fúngica. Após 60 dias de incubação, foi observado o aparecimento de subprodutos de degradação. As análises DSC e DRX indicaram que o tempo de exposição levou à diminuição da  $T_{cc}$  do PLA e redução da fase amorfa e por consequência, o aumento na cristalinidade. Os espectros de FTIR indicaram a ocorrência de modificações que envolvem oxidação com o aparecimento de bandas intensas características de degradação desses materiais.

Palavras-chave: *Psilocybe castanella*. Basidiomicetos. Lacase. MnP. Polímeros. Sustentabilidade

## ABSTRACT

ABREU, P. M. S. **Biodegradation of poly(lactic acid) and polypropylene by *Psilocybe castanella* in the process of fermentation of green coconut residue.** 2019. 100 sheets. Thesis (Ph.D. Thesis in Process Engineering) - Science and Technology Center, Federal University of Campina Grande (UFCG). Paraiba, 2019.

The consumption of polymer products over the years has generated a large number of wastes, which accumulate in the oceans and landfills, resulting in serious environmental problems. Basidiomycetes are enzyme-producing fungi that hydrolyze polymers of lignocellulosic byproducts in fermentative processes and have aroused the academic and technological interest because they present desirable characteristics in the degradation of recalcitrant pollutants. In this context, this research evaluated the production of enzymes by *Psilocybe castanella* CCIBt 2781 in a semi-solid fermentation process (FSS) using agroindustrial residue, focusing on the biodegradation of poly(lactic acid) (PLA) and polypropylene (PP) from disposable cups. The fungus was cultivated in green coconut residue with the addition of soybean meal in order to maintain C/N of 32, with and without the addition of Synthetic Blue Dye of Remazol R (RBBR), used as an enzymatic mediator. Lactic activities were determined by the oxidation of ABTS and manganese peroxidase (MnP) by the oxidation of phenol red. The highest values of activity were obtained with 5 days of fermentation (272.13 UL<sup>-1</sup> and 112.04 UL<sup>-1</sup>). The enzymes showed pH and T, of 4.8 and 60°C. The degradation was evaluated by the properties and the morphology of the polymers by optical microscopy (MO) and scanning electron (SEM), by thermogravimetric (TG) and differential scanning calorimetry (DSC) and by spectroscopy in the infrared region with Fourier transform (FTIR) and X-ray diffraction (XRD). The morphology indicated that there was mycelial growth on the surfaces of the polymers, confirming the production of fungal biomass. After 60 days of incubation, the appearance of degradation byproducts was observed. The DSC and XRD analyzes indicated that the exposure time led to a decrease in the T<sub>dc</sub> of the PLA and reduction of the amorphous phase and consequently the increase in crystallinity. The FTIR spectra indicated the occurrence of modifications that involve oxidation with the appearance of intense bands characteristic of degradation of these materials.

**Keywords:** *Psilocybe castanella*. Basidiomycetes. Lacase. MnP. Polymers. Sustainability

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	13
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	15
2.1 Objetivo geral .....	15
2.2 Objetivos específicos .....	15
<b>3 REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	16
3.1 Resíduos sólidos .....	16
3.2 Biomassa lignocelulósica .....	18
3.2.1 O coco .....	20
3.3 Mecanismo ligninolítico dos basidiomicetos .....	21
3.4 Polímeros .....	26
3.4.1 Poli(ácido lático) (PLA) .....	26
3.4.2 Polipropileno (PP) .....	27
3.4.3 Degradação de polímeros .....	28
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	32
4.1 Local da realização da pesquisa .....	32
4.2 Representação esquemática do processo .....	34
4.3 Material .....	33
4.3.1 Microrganismo .....	33
4.3.2 Polímeros utilizados .....	33
4.3.3 Resíduo lignocelulósico .....	34
4.3 Métodos .....	34
4.3.1 Preparação do substrato (resíduo seco) .....	34
4.3.2 Caracterização do substrato .....	35
4.3.3 Preparo dos filmes poliméricos .....	36
4.3.4 Preparo do sistema de cultivo .....	36

4.3.5 Extração das enzimas.....	37
4.3.6 Atividades enzimáticas .....	37
4.3.7 Caracterização do sistema enzimático ligninolítico.....	38
4.3.8 Caracterização dos polímeros .....	39
4.3.8.1 Microscopia ótica (MO).....	39
4.3.8.2 Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	39
4.3.8.3 Difração de raios X (DRX).....	39
4.3.8.4 Espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR).....	40
4.3.8.5 Calorimetria exploratória diferencial (DSC).....	40
4.3.8.6 Termogravimetria (TG) .....	41
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>42</b>
5.1 Caracterização do substrato .....	42
5.2 Atividades enzimáticas.....	43
5.3 Caracterização do sistema enzimático ligninolítico .....	45
5.4 Caracterização da degradação dos polímeros.....	47
5.4.1 Caracterização morfológica .....	47
5.4.2 Difração de raios X (DRX) .....	56
5.4.3 Espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) .....	58
5.4.4 Calorimetria exploratória diferencial (DSC).....	63
5.4.5 Termogravimetria (TG) .....	66
<b>6 CONCLUSÕES .....</b>	<b>68</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>69</b>
<b>ANEXO A - Procedimentos para caracterização do substrato.....</b>	<b>90</b>
<b>APÊNDICE A - Resultados obtidos no processo de produção de ligninases com resíduo de coco verde.....</b>	<b>96</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- ABTS – 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolino-6-sulfonato)
- ABNT – Associação Brasileira de Normas Técnicas
- ABRELPE – Associação Brasileira de Empresas de Limpeza Pública e Resíduos Especiais
- ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária
- ASTM – American Society for Testing and Materials
- ATR – refletância total atenuada
- b.u. – base úmida
- BDA – ágar batata dextrose
- CCT – Centro de Ciências e Tecnologia
- CCIBt – Coleção de Culturas de Algas, Cianobactérias e Fungos do Instituto de Botânica
- CMCase – carboximetilcelulase
- C/N – relação carbono nitrogênio
- DSC – calorimetria exploratória diferencial
- DRX – difratometria de raio-X
- FSS – fermentação semissólida
- FTIR – espectroscopia na região de infravermelho com transformada de Fourier
- IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
- IPEA – Instituto de Pesquisa Econômica Aplicada
- LabTer – Laboratório de Análises Térmicas
- LabSMAC – Laboratório de Síntese de Materiais Cerâmicos
- Lac – lacase
- LAPPA – Laboratório de Armazenamento e Processamento de Produtos Agrícolas
- LCM – Laboratório de Caracterização de Materiais
- LEB – Laboratório de Engenharia Bioquímica
- MEA – ágar extrato de malte
- MEV – microscopia eletrônica de varredura
- Lip – lignina peroxidase
- MnP – peroxidase dependente do manganês
- MO – microscopia ótica

ONU – Organização das Nações Unidas

pH – potencial hidrogeniônico

PCP – pentaclorofenol

PE – polietileno

PET – poli(tereftalato de etileno)

PLA – poli(ácido láctico)

PNRS – Política Nacional de Resíduos Sólidos

PP – polipropileno

RBBR – Azul Brilhante de Remazol R

rpm – rotações por minuto

SMA – Secretaria do Meio Ambiente do Estado de São Paulo

$T_c$  – temperatura de cristalização

$T_{cc}$  – temperatura de cristalização a frio

$T_g$  – temperatura de transição vítrea

TG – termogravimetria

$T_m$  – temperatura de fusão cristalina

u.a. – unidade arbitrária

U – unidade internacional de atividade enzimática

UAEMa – Unidade Acadêmica de Engenharia de Materiais

UFMG – Universidade Federal de Campina Grande

UV – luz ultravioleta

$X_c$  – índice de cristalinidade

$\epsilon$  – coeficiente de extinção molar

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Distribuição (%) dos materiais que compõem o resíduo sólido no Brasil.....	18
<b>Figura 2.</b> Modelo da estrutura molecular dos principais constituintes do material lignocelulósico (parede celular vegetal secundária).....	19
<b>Figura 3.</b> Estrutura química do PLA.....	27
<b>Figura 4.</b> Estrutura química do mero do propeno.....	28
<b>Figura 5.</b> Representação esquemática do processo de biodegradação em FSS.....	32
<b>Figura 6.</b> Imagem do fungo basidiomiceto <i>P. castanella</i> CCIBt 2781 com crescimento de 10 dias em placa de Petri a 28°C.....	33
<b>Figura 7.</b> <i>flakes</i> de (a) filmes de PLA e (b) copos descartáveis de PP.....	36
<b>Figura 8.</b> Micrografia das (A) partículas da fibra da casca do coco verde <i>in natura</i> (ampliação de 50 x), (B) fibra do coco verde (ampliação de 200 x) e (C) farinha de soja (ampliação de 200 x).....	44
<b>Figura 9.</b> Cinética de produção de atividade de (a) lacase e (b) MnP por <i>P. castanella</i> em resíduo de coco verde com farinha de soja C/N 32 em frascos contendo <i>flakes</i> de (●) PLA e (□) PP. (□) Controle biótico (substrato e inóculo na ausência de RBBR e polímeros).....	44
<b>Figura 10.</b> Efeito do pH nas atividades de lacase e MnP (UL-1) de extratos obtidos do crescimento de <i>P. castanella</i> em resíduo de coco verde com farinha de soja C/N 32.....	46
<b>Figura 11.</b> Efeito da T nas atividades de lacase e MnP (UL-1) de extratos obtidos do crescimento de <i>P. castanella</i> em resíduo de coco verde com farinha de soja C/N 32.....	47
<b>Figura 12.</b> Imagens das superfícies dos <i>flakes</i> de (a) PLA e (b) PP de copos descartáveis, antes da incubação com ampliação original de 100 x.....	48
<b>Figura 13.</b> Imagens dos <i>flakes</i> de PLA após 10, 20, 30, 60 e 90 dias de incubação a 28°C.....	49
<b>Figura 14.</b> Imagens dos <i>flakes</i> de PP após 10, 20, 30, 60 e 90 dias de incubação a 28°C.....	50
<b>Figura 15.</b> Micrografias por MEV do filme de PLA (a) e PP (b) de copos descartáveis com ampliação original de 100 x sem exposição.....	51
<b>Figura 16.</b> Micrografias no MEV da superfície dos polímeros PLA e PP: em 10 dias (a) (PLA) e (b) (PP), em 20 dias (e) (PLA) e (f) (PP), com ampliação original de 500 x e (c) (PLA), (d) (PP), (g) (PLA) e (h) (PP), com ampliação original de 2000 x.....	52
<b>Figura 17.</b> Micrografias no MEV da superfície dos polímeros PLA e PP em 30 dias: (a) (PLA) e (b) (PP), com ampliação original de 500 x e (c) (PLA) e (d) (PP), com ampliação original de 2000 x.....	53

<b>Figura 18.</b> Micrografias no MEV da superfície dos copos PP: em 60 dias (a) e (b) e (c) em 90 dias de exposição.....	54
<b>Figura 19.</b> Espectros de FTIR do (a) PLA não exposto e dos <i>flakes</i> expostos ao microrganismo, (b) PLA não exposto e <i>flakes</i> expostos, na região de absorção da carbonila (C=O) e da ligação C-O e (c) <i>flakes</i> expostos com 60 dias.....	54
<b>Figura 20.</b> Espectros de FTIR do (a) PP não exposto e dos <i>flakes</i> expostos ao microrganismo por diferentes períodos de exposição e (b) PP não exposto e dos <i>flakes</i> expostos ao microrganismo por diferentes períodos de exposição, na região de absorção da carbonila (C=O) e da ligação C-O.....	55
<b>Figura 21.</b> Curvas DSC para o PLA obtidas a 10°C min <sup>-1</sup> com indicação das transições térmicas existentes.....	56
<b>Figura 22.</b> Curvas DSC para o PP obtidas a 10°C min <sup>-1</sup> (a) fluxo de calor endotérmico e (b) fluxo de calor exotérmico.....	57
<b>Figura 23.</b> Curvas TG do PLA com variação do tempo de degradação obtidas a 10°C min <sup>-1</sup> em atmosfera de N <sub>2</sub> .....	57
<b>Figura 24.</b> Curvas TG do PP com variação do tempo de degradação obtidas a 10°C min <sup>-1</sup> em atmosfera de N <sub>2</sub> .....	58

## 1 INTRODUÇÃO

A partir do entendimento do benefício do uso dos materiais plásticos na conquista de uma sociedade cada vez mais sustentável e do reconhecimento de que, a gestão dos resíduos sólidos precisa avançar muito e que somos parte importantíssima neste processo, esta pesquisa apresenta uma avaliação do potencial do fungo basidiomiceto *Psilocybe castanella* em degradar os polímeros PLA e PP.

O plástico surgiu progressivamente, tendo sua origem nos polímeros naturais como o látex e a celulose. Com menos de um século de uso em larga escala, o plástico se tornou presente em todas as atividades econômicas e em tudo que nos rodeia (Braskem, 2012). Dessa forma, o consumo de produtos, principalmente de embalagens descartáveis, confeccionados a partir de materiais poliméricos não biodegradáveis provenientes de fontes fósseis, têm se tornado um problema devido ao crescente número de descartes inadequados, e ao longo tempo de degradação desses materiais no meio ambiente. Como alternativa para redução do impacto ambiental surge uma nova classe de materiais: os biopolímeros biodegradáveis, como os poliésteres que apresentam na sua estrutura a ligação éster hidrolisável.

O polipropileno (PP), polímero sintético utilizado nesta pesquisa, é o termoplástico de menor custo entre as *commodities*, bastante utilizado em misturas poliméricas pelas suas características químicas e mecânicas, em contrapartida, essas mesmas características o tornam resistente à degradação biológica (KHAN et al., 2012). O poli(ácido láctico) (PLA) é um poliéster alifático, termoplástico, semicristalino ou amorfo, biocompatível e biodegradável, sintetizado a partir do ácido láctico obtido de fontes renováveis (BRITO et al, 2012). Apresentando-se como um grande promissor na substituição dos polímeros derivados do petróleo, sua aceitação no meio científico e mercadológico é um fator encorajador para o desenvolvimento de novos produtos biodegradáveis, tornando-se competitivo para aplicações em embalagens em geral (PEREIRA; MORALES, 2014).

A iniciativa para utilização de resíduos agroindustriais é uma alternativa para a biotecnologia na obtenção de enzimas com um custo mais baixo em relação às enzimas que estão no mercado, além da geração de valor econômico com a

transformação desses resíduos em subprodutos, diminuindo o impacto ambiental causado pelo descarte inadequado. Destacam-se ainda iniciativas para formação de produtos como cogumelos comestíveis, com alto valor nutricional e terapêutico, como relatado por Pedra e Marino (2006), em seus estudos utilizando o mesocarpo de coco verde.

As enzimas podem ser aplicadas em uma ampla gama de processos industriais e nos últimos anos, vem recebendo destaque em tecnologia petroquímica, área na qual a degradação de polímeros se encontra inserida (ALBUQUERQUE et al., 2014). Esses biocatalisadores podem atuar na oxidação de grupos funcionais, tornando polímeros sintéticos mais hidrofílicos, e dessa forma mais sujeitos à degradação microbiana. Sua atuação se estende ainda à alteração de características como cristalinidade, orientação e morfologia dos polímeros pelo mesmo mecanismo de reações de hidrólise ou oxidação, que podem ocorrer na cadeia central ou na cadeia lateral dos polímeros (SHAH et al., 2008).

Estudar a degradação biológica, principalmente considerando os diferentes mecanismos de degradação e as diferentes propriedades diante da ação de microrganismos e suas enzimas, tem despertado o interesse acadêmico e pode ser considerada como alternativa para minimizar os atuais problemas de poluição ambiental (MENEGOTTO, 2014). Nesse sentido, vários estudos apontam a degradação de materiais poliméricos por ação de microrganismos ou suas enzimas (DA LUZ et al., 2015; ABREU et al., 2015; CUNHA, 2014; ; ZENKIEWICZ et al., 2013).

O uso de basidiomicetos como agentes indutores da degradação de compostos xenobióticos, em solos contaminados ou em efluentes industriais, tem se mostrado eficiente devido ao fato desses organismos serem capazes de produzir enzimas extracelulares (MOREIRA NETO, 2006; BALLAMINUT e MATHEUS, 2007; COELHO, 2007; SILVA, 2009; DA ROCHA et al., 2012; SALVI, 2013; MOREIRA NETO et al., 2013; BALLAMINUT, 2016).

Nesse sentido, este trabalho tem como objetivo contribuir com o estudo da degradação de polímeros pela ação de fungos basidiomicetos tropicais isolados do bioma brasileiro Mata Atlântica, possibilitando a degradação desses materiais em tempos inferiores aos tempos convencionais de degradação.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

Avaliar o potencial de biodegradação do poli(ácido láctico) (PLA) e do polipropileno (PP) de copos descartáveis, catalisada pela ação do fungo de podridão branca *Psilocybe castanella* CCIBt 2781 durante a fermentação em substrato sólido de resíduo de coco verde com adição de farinha de soja, como fonte de nitrogênio.

### 2.2 Objetivos específicos

- Caracterizar o resíduo de coco verde e a farinha de soja quanto à umidade, cinzas, extrativos, holocelulose, alfacelulose, lignina, carbono orgânico e nitrogênio total;
- Avaliar a colonização do substrato pelo microrganismo e a descoloração do RBBR pela análise visual, durante o processo de fermentação semissólida (FSS);
- Extrair e determinar as atividades ligninolíticas de lacase e manganês peroxidase produzidas por *P. castanella* em resíduo de coco verde com adição de farinha de soja e caracterizá-las quanto ao pH e temperatura ótimos;
- Estudar o efeito da variação da relação C/N na produção das enzimas e no crescimento micelial dos inóculos fúngicos;
- Caracterizar os polímeros PLA e PP, antes e após incubação (5, 10, 20, 30, 60 e 90 dias) em FSS por análises morfológicas (MO e MEV), térmicas (TG e DSC) e químicas (FTIR e DRX).

### 3 REFERENCIAL TEÓRICO

#### 3.1 Resíduos sólidos

A ideia de desenvolvimento sustentável se tornou popular a partir de 1987, com a publicação do relatório *Our Common Future* (Nosso Futuro Comum, o relatório Brundtland), pela Comissão Mundial sobre Meio Ambiente e Desenvolvimento. O relatório definiu desenvolvimento sustentável como “aquele que atende as necessidades do presente sem comprometer a capacidade das gerações futuras atenderem suas próprias necessidades”.

Resíduos, segundo a NBR 10004:2004, são aqueles que resultam de atividades de origem industrial, doméstica, hospitalar, comercial, agrícola, de serviços e de varrição. Estima-se que até 2020 a geração de resíduos no mundo será de 18 bilhões de toneladas/ano (DOS SANTOS et al., 2012).

Nos últimos 50 anos, devido ao elevado crescimento populacional associado à busca por melhor qualidade de vida, ocorreu um aumento na produção industrial e agrícola caracterizada pela intensa fabricação e utilização de compostos químicos sintéticos, como os plásticos. Seja de maneira natural ou antrópica, os resíduos gerados por esses compostos aportam aos recursos hídricos com conseqüente alteração da qualidade da água (ROSA et al., 2012). Leves e duráveis, os plásticos, quando descartados de forma inadequada podem ser carregados pelo vento e pela chuva para as áreas mais baixas. Ao atingir os corpos d'água, eles podem viajar grandes distâncias, tendo como destino final os mares e oceanos, onde podem circular nas correntes marinhas (Braskem, 2012).

De acordo com a ONU, todos os anos, mais de 8 milhões de toneladas de resíduos plásticos acabam nos oceanos (Nações Unidas, 2018). Ao longo desse caminho e do tempo, eles se fragmentam, mas não desaparecem, causando problemas ambientais e econômicos como emaranhamento, ingestão por animais, entupimento dos canais de drenagem, transporte de espécies invasoras que se fixam nos resíduos, entre outros.

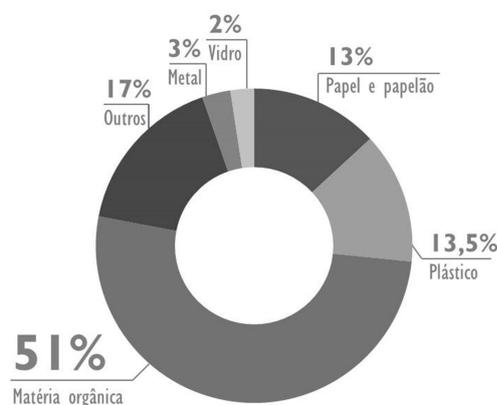
Resíduos poliméricos, quando destinados em ambientes inadequados, associados a sua resistência a degradação, possuem elevado potencial de poluição ambiental e impactos negativos à saúde. Dentro de um sistema integrado de resíduos, o aterro sanitário não é a forma indicada para o descarte (ACHILIAS et al., 2007; LAZAREVIC et al., 2010). Uma alternativa para a recuperação desses resíduos é a reciclagem, contudo, é uma tecnologia que necessita da separação dos materiais pela coleta seletiva. De acordo com a ABRELPE, em 2017, cerca de 70% das 5.570 cidades brasileiras, contam com alguma iniciativa de coleta seletiva e em muitos municípios não abrangem a totalidade de sua área urbana. Como consequência direta disso, os índices de reciclagem se mostram estagnados há alguns anos.

A responsabilidade compartilhada é o pilar da Política Nacional de Resíduos Sólidos (PNRS), aprovada em 2010. Instituída pela Lei 12.305, a PNRS estabelece estratégias para o desenvolvimento sustentável e impõe o sistema de logística reversa, além de tratar do ciclo de vida dos produtos e incentivar o reuso e a reciclagem de materiais, desmotivando a disposição em aterros sempre que haja outra destinação mais favorável ao meio ambiente e à economia de recursos.

No Brasil, as atividades agroindustriais e a indústria de alimentos produzem grande quantidade de subprodutos, basicamente compostos lignocelulósicos. A casca de coco verde, subproduto do uso e da industrialização da água de coco, frequentemente descartada de maneira inadequada é um material de difícil decomposição. Uma alternativa para minimizar os efeitos indesejados do descarte inadequado de grande parte desses resíduos, é a utilização como substrato em processos microbiológicos, estimulando a produção/cultivo de fungos, incluindo os cogumelos comestíveis, para produção de enzimas na fermentação sólida (PEDRA; MARINO, 2006; AGUIAR; FERRAZ, 2011; ABREU et al., 2015; SILVA et al., 2017).

A Figura 1 apresenta o *player* de distribuição dos principais elementos constituintes dos resíduos sólidos urbanos no Brasil.

**Figura 1.** Distribuição (%) dos materiais que compõem o resíduo sólido no Brasil



Fonte: Ipea, 2012

### 3.2 Biomassa lignocelulósica

A lignocelulose é o principal componente estrutural das plantas e representa a principal fonte de matéria orgânica renovável na terra.

A biomassa lignocelulósica é composta basicamente de carboidratos (celulose e hemicelulose), lignina e em quantidades menores por extrativos, ácidos e sais minerais, cuja composição é influenciada não apenas pelo tipo de vegetal, mas também por outros fatores, como tempo de crescimento, parte da planta escolhida, idade da colheita, entre outros (OGEDA; PETRI, 2010).

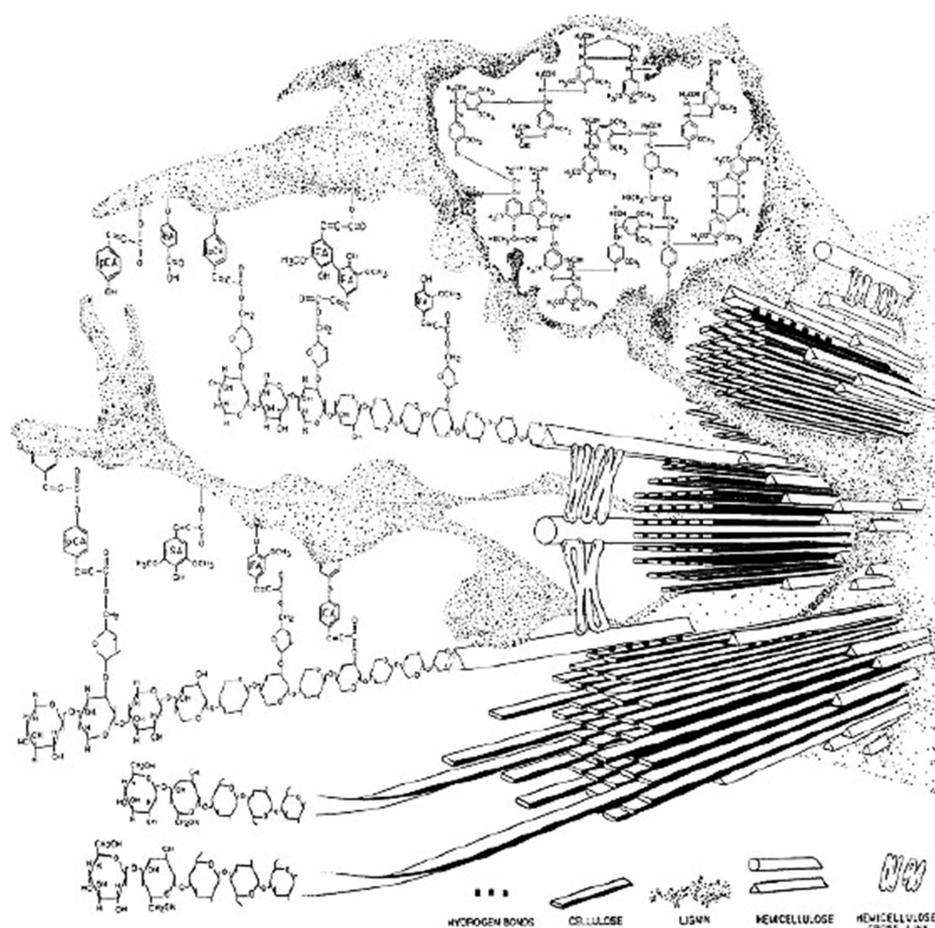
A biodegradação dos materiais lignocelulósicos tem sido objeto de muitos estudos, pois além de corresponder a uma importante etapa do ciclo do carbono na natureza também pode ser aplicada em processos tecnológicos (AGUIAR; FERRAZ, 2011).

Nas últimas décadas tem havido uma crescente busca da utilização de resíduos agroindustriais, devido à demanda das atividades agrícolas (DE MENEZES; BARRETO, 2015). O acúmulo desses resíduos gera a deterioração do meio ambiente e perda de recursos, com contribuição significativa para o problema

da reciclagem e conservação da biomassa. Diversos processos são desenvolvidos para utilização desses materiais, transformando-os em compostos químicos e produtos com alto valor agregado, como enzimas.

A Figura 2 apresenta um modelo da estrutura molecular dos principais constituintes do material lignocelulósico.

**Figura 2.** Modelo da estrutura molecular dos principais constituintes do material lignocelulósico (parede celular vegetal secundária)



Fonte: BIDLACK et al., 1992

Observa-se que os componentes são arranjados de modo que as cadeias de celulose e hemicelulose sejam fixadas pela lignina. As cadeias de celulose se mantêm compactadas por ligações de hidrogênio que promovem a rigidez da planta,

enquanto que a lignina circundante adere os componentes e age como uma barreira física pra o ataque de microrganismos e água. Por sua vez, a hemicelulose proporciona a ligação entre a celulose e a lignina formando assim a rede fibrosa.

### 3.2.1 O coco

O coqueiro (*Cocos nucifera* Linn.) é originário do sudeste da Ásia (Malásia, Indonésia e Filipinas) e das ilhas entre os oceanos Índico e pacífico (LIMA et al., 2015). Introduzido no Brasil em 1553 pelos portugueses, seu cultivo ocupa praticamente, quase todo o território nacional, com produção equivalente a 2 bilhões de toneladas (IBGE, 2016).

O coco é uma drupa, formada por uma epiderme lisa ou epicarpo, que envolve o mesocarpo espesso e fibroso, ficando mais no interior uma camada muito dura (pétrea), o endocarpo lenhoso, contendo a copra ou polpa do coco. Este fruto fica envolto numa casca externa esverdeada ou amarelada, que com o tempo, torna-se seca e amarronzada (SILVA, 2014).

O consumo da água de coco e da polpa de coco gera uma quantidade significativa de resíduos, representados por suas cascas. No caso do fruto imaturo ou coco verde para consumo de água, 80 a 85% do peso bruto representam resíduo (cascas), que não são aproveitadas pela indústria de beneficiamento de fibras. As cascas do coco verde têm sido descartadas nos aterros e lixões a céu aberto sendo, como toda matéria orgânica, potenciais emissores de gases e, ainda, contribuindo para que a vida útil desses depósitos seja diminuída, proliferando focos de vetores transmissores de doenças, mau cheiro, possíveis contaminação do solo e corpos d'água, além da inevitável poluição da paisagem urbana (ROSA et al., 2001).

Por ser um material extremamente rico em biopolímeros, esse resíduo pode ser reaproveitado na fabricação de vários produtos. A reutilização e a reciclagem do coco constituem nas melhores alternativas de minimizar os impactos ambientais causados pela quantidade de resíduo descartado (CORREIA et al., 2003). O reaproveitamento do coco descartado, por meio da trituração para obtenção de fibra

e pó, é aplicada como considerada forma para agregação de valor ao resíduo (CARRIJO et al., 2002), utilizado como substrato agrícola (ROSA et al., 2002).

Da Rocha et al. (2012) investigaram o potencial do mesocarpo de coco verde como adsorvente na remoção do corante Cinza Reativo BF-2R, mostrando que esse resíduo é uma alternativa viável para remoção do corante.

Silva (2014) trabalhando com bagaço da casca de coco verde e farinha de soja C/N 90, obteve 174,01 UL<sup>-1</sup> de lacase, utilizando o basidiomiceto *Lentinus crinitus* CCIBT2611.

Abud et al. (2015) utilizaram o coco verde como substrato para a produção de enzimas hidrolíticas por fermentação semissólida a partir do fungo *Aspergillus niger*.

Coelho et al. (2016) avaliaram por meio da fermentação semissólida do mesocarpo de coco verde a produção de celulase (CMCase) utilizando um isolado fúngico obtido durante um processo de compostagem. Nesse mesmo ano, Cardoso e Gonzalez (2016) mostraram que a casca do coco verde pode ser usada como matéria-prima alternativa na produção de papel.

### 3.3 Mecanismo ligninolítico dos basidiomicetos

O grupo dos basidiomicetos inclui os fungos que produzem esporos (basidiósporos) de origem sexuada em uma estrutura especializada denominada de basídio e popularmente chamados de cogumelos. A fase vegetativa dos basidiomicetos denominada micélio, é formado por muitos filamentos septados chamados hifas. O septo das hifas pode ser simples ou possuir ansas, que é uma estrutura característica do grupo e são conhecidos como septo dolipórico em função da estrutura complexa que apresentam (ALEXOPOULOS et al., 1996; GUGLIOTTA; CAPELARI, 1998).

Os fungos basidiomicetos causadores da podridão branca são conhecidos pela capacidade de degradar compostos lignocelulósicos na natureza, principalmente a madeira. Esses são os únicos microrganismos com capacidade de metabolizar completamente a molécula de lignina a CO<sub>2</sub> e água, tecidos vegetais

(MACHADO, 1998). A via normal de degradação por esses fungos envolve ataques simultâneos aos polissacarídeos (celulose e hemicelulose) e à lignina. De modo geral, o processo de degradação inicia-se com a liberação de enzimas extracelulares para o meio externo à hifa do fungo, onde irá ocorrer a degradação das moléculas complexas do substrato. As moléculas com baixas massas moleculares, formadas neste processo, serão então absorvidas pelo fungo para nutrição (WESSELS, 1994; TUOMELA et al., 2000; LEE; KO, 2014).

Devido à inespecificidade e ao elevado potencial de oxidação do sistema enzimático, os basidiomicetos ligninolíticos são também capazes de degradar uma variedade de compostos recalcitrantes (FRAGOEIRO; MAGAN 2005; AGUIAR e FERRAZ, 2011; MOREIRA NETO et al., 2013; SKORONSKI et al., 2014; BALLAMINUT et al., 2014; BALLAMINUT, 2016; BILAL et al., 2017; RODRÍGUEZ-DELGADO; ORNELAS-SOTO, 2017). Além disso, o sistema não precisa ser induzido e a degradação pode ocorrer até níveis não detectáveis do poluente, devido a mineralização (KUNAMMENI, 2008). Esse mecanismo ligninolítico inclui três enzimas consideradas como principais: Lignina Peroxidase (LiP, EC 1.11.1.14), capaz de oxidar compostos fenólicos e não fenólicos de alto potencial redox; Peroxidase dependente do Manganês (MnP, EC 1.11.1.13), capaz de oxidar compostos fenólicos na presença de  $Mn^{+2}$ , e ainda oxidar um segundo mediador para efetivar a quebra de compostos não fenólicos; e Lacase (Lac, EC 1.10.3.2), capaz de oxidar compostos fenólicos simultaneamente à redução do oxigênio molecular a água (WONG, 2009).

Segundo Aguiar e Ferraz (2011), essas enzimas ligninolíticas podem ser ordenadas de acordo com suas capacidades oxidativas: LiPs > MnPs > Lacases. São comumente produzidas por fungos causadores de podridão branca; no entanto, existem algumas espécies que são eficientes na degradação de lignina, mas que produzem somente uma, duas ou as três enzimas simultaneamente.

As LiPs e as MnPs são heme peroxidases, capazes de oxidar substratos por transferência de elétrons, com formação de radicais cátion. MnP é capaz de abstrair elétrons apenas de estruturas fenólicas, diferentemente da LiP, que é capaz de oxidar substratos fenólicos e estruturas aromáticas não fenólicas. Nos dois casos, a enzima é ativada pela oxidação por  $H_2O_2$ , formando um oxocomplexo deficiente em

dois elétrons. A redução do complexo até a enzima nativa ocorre por meio de duas etapas, com a abstração de um elétron de cada vez. No caso da LiP, a redução dos compostos intermediários pode ocorrer por meio da oxidação dos substratos, fenólicos e não fenólicos, levando à formação de radicais cátion. Nessa enzima há um resíduo de triptofano na cadeia proteica, o qual atua como elo de transferência de elétrons com substratos aromáticos que não podem ter um contato direto com o grupo heme oxidado da enzima. Por outro lado, MnP depende de  $Mn^{2+}$  para a redução de um dos compostos intermediários, oxidando o  $Mn^{2+}$  para  $Mn^{3+}$ . Já o outro composto intermediário pode ser reduzido pela oxidação direta de uma estrutura fenólica ou de um átomo de  $Mn^{2+}$ , sendo esse íon o elo preferencial de transferência de elétrons, visto que a MnP não possui o resíduo de triptofano, mas um sítio de ligação de manganês, sendo essa a principal diferença entre as enzimas MnP e LiP. O  $Mn^{3+}$  formado é então dissociado da enzima e estabilizado pela formação de quelantes produzidos pelo próprio fungo, como o ácido oxálico. O complexo  $Mn^{3+}$ -oxalato, por sua vez, pode ser reduzido à custa da oxidação de outra estrutura fenólica (AGUIAR e FERRAZ, 2011).

As lacases são enzimas oxidoreduções multicobre, que abstraem elétrons de fenóis, em função da redução do  $Cu^{+2}$  a  $Cu^{+1}$ , reduzindo  $O_2$  a  $H_2O$ , permitindo que a enzima atue de forma cíclica. A estequiometria é de quatro moléculas de substrato redutor para cada oxigênio molecular, envolvendo a transferência total de quatro elétrons. O entendimento sobre as estruturas cristalográficas das lacases tem fornecido informações valiosas sobre os mecanismos de ação dessas enzimas e auxiliam na elucidação dos mecanismos de ação dessas enzimas (HAKULINEN; ROUVINEN, 2015). Essas enzimas também podem degradar estruturas aromáticas não fenólicas por meio da oxidação de alguns mediadores sintéticos como o ABTS (2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolino-6-sulfonato)) ou naturais, como derivados do ácido benzoico e íons  $Mn^{2+}$  (WONG, 2009; AGUIAR e FERRAZ, 2011; SINGH et al., 2015), até a mineralização (BALLAMINUT et al., 2014; BILAL et al., 2017; SKORONSKY et al., 2014; RODRÍGUEZ-DELGADO; ORNELAS-SOTO, 2017), por isso, as lacases tem apresentado posição de destaque, sendo conhecida como uma enzima *ecofriendly* (RODRÍGUES-COUTO, 2012).

Os mediadores, conhecidos como compostos de baixa massa molar, podem ser empregados conjuntamente na mesma reação catalisada por lacase, uma vez

que tal combinação pode aumentar as taxas de oxidação, comparado com as taxas obtidas separadamente com cada sistema mediador.

Segundo Arantes e Milagres (2009) um mediador é uma molécula de baixa massa molar, que atua como carregador de elétrons, cuja oxidação pode ocorrer pela transferência de elétrons via direta ou via transferência de átomos de hidrogênio, sendo que essa última via é imprescindível para que a peroxidação lipídica com lacase ocorra (CAÑAS; CAMARERO, 2010; POLAK; JAROSZ-WILKOLAZKA, 2012).

Por possuírem um complexo enzimático ligninolítico, que os habilita a degradar materiais lignocelulósicos, os fungos basidiomicetos vêm sendo estudados a fim de avaliar a degradação de materiais poluentes recalcitrantes no meio ambiente. Estudos têm relacionado as atividades das enzimas ligninolíticas com a descoloração de corantes sintéticos por basidiomicetos nativos brasileiros. A lacase foi relatada como responsável pela descoloração de corantes como Reactive Blue 19 por *P. ostreatus*, *Coriolus versicolor* e *Funalia trogii* (ERKURT et al., 2007) e Orange G por *Ischnoderma resinsum* e *Pleurotus calypttratus* (PALMIERI et al., 2005). Os corantes Acid Red 44, Crystal Violet (trifenilmetano) e Reactive Blue 19 por *Trametes maxima* e *T. villosa* (EICHLEROVÁ et al., 2005).

*Psilocybe castanella* é um fungo degradador da madeira, com potencial comprovado para ser empregado em processos de biorremediação de solos contaminados com poluentes recalcitrantes. Esse fungo destacou-se entre 125 linhagens de basidiomicetos devido a capacidade de degradar compostos recalcitrantes como corantes têxteis reativos e os organoclorados pentaclorofenol (PCP) e hexaclorobenzeno (MATHEUS, 2000; MACHADO et al., 2005). *P. castanella* apresentou tolerância à 50000 mg HCB kg<sup>-1</sup> solo (MATHEUS, 2000), sendo capaz de colonizar solo contaminado com 4600 mg de PCP kg<sup>-1</sup> solo (MACHADO, 2005). Matheus et al. (2003) observaram a mineralização de 12% de <sup>14</sup>C-HCB por *P. castanella*, evidenciando pela 1ª vez a capacidade de microrganismos aeróbios atacarem a molécula de HCB.

Sendo reconhecidamente capaz de produzir lacase e manganês peroxidase, enzimas do sistema ligninolítico importantes na minimização de problemas ambientais, *P. castanella* foi aplicado no tratamento de solo contaminado por

hexaclorobenzeno (HCB) e outros organoclorados, após crescimento em bagaço de cana suplementado com farinha de soja (MOREIRA NETO, 2006) e imobilizado em suporte cerâmico (COMPART, 2004).

Silva (2009) estudou a determinação do crescimento de *P. castanella* por meio da quantificação do ergosterol durante degradação de organoclorados.

Moreira Neto et al. (2013) avaliaram 12 linhagens de basidiomicetos, dentre eles o gênero *Psilocybe*, quanto à descoloração dos corantes reativos Cibacron Brilliant Blue H-GR e Cibacron Red FN-2BL, presentes em um efluente têxtil. *P. castanella* apresentou os melhores resultados de descoloração para os experimentos in vitro (45 UL<sup>-1</sup>).

Freire et al. (2014) comprovaram que a linhagem fúngica utilizada no presente estudo, o basidiomiceto *P. castanella* CCIBt 2781 na presença de mediadores, foi capaz de descolorir totalmente o corante Azul Brilhante de Remazol (RBBR) em até 45 dias, pela ação da enzima lacase (113,0 UL<sup>-1</sup>) no 30° dia de cultivo.

Da Luz et al. (2013) (2014) (2015) concluíram estudos importantes na área de biodegradação de materiais plásticos e mostraram que devido principalmente a atividade de lacase, basidiomicetos ligninolíticos como o *P. ostreatus*, são capazes de degradar polímeros oxi-biodegradáveis de sacolas descartáveis e polietileno verde (proveniente de fonte renovável). Seus resultados proporcionaram a primeira evidência de crescimento e formação de cogumelos pela degradação de um material plástico oxi-biodegradável num período relativamente curto, 45 dias.

Em estudo realizado por Cunha (2014) com *P. castanella*, foi verificado que o fungo apresentou potencial de biodegradação do polipropileno.

Teixeira et al. (2016) também mostraram que os fungos *L. edodes* e *P. ostreatus* foram capazes de descolorir o RBBR pela ação de lacase, em fermentação semissólida contendo bagaço e vinhaça, em até 14 dias de cultivo.

Menezes et al. (2017) avaliaram a capacidade de 20 fungos basidiomicetos lignocelulolíticos em degradar polímeros de lodo de esgoto nos leitos de secagem de uma estação de tratamento, sendo os gêneros *Agaricus bisporus*, *Fomes fasciatus*,

*Schizophyllum commune* e *Trametes versicolor*, os que apresentaram potencial biotecnológico para aumentar a degradação do lodo.

### 3.4 Polímeros

Polímeros são macromoléculas formadas pela repetição de muitas unidades químicas iguais, os *meros* ou unidades repetitivas. Podem ser classificados em homopolímeros e copolímeros. Homopolímeros quando são provenientes de uma única unidade repetitiva monomérica e copolímeros quando possuem duas ou mais unidades repetitivas monoméricas diferentes, ou seja, são obtidos usando dois ou mais co-monômeros (DE PAOLI, 2009).

#### 3.4.1 Poli(ácido láctico) (PLA)

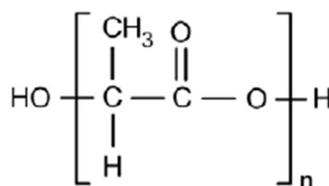
É um poliéster alifático, termoplástico, semicristalino ou amorfo, sintetizado a partir do ácido láctico proveniente de fontes renováveis como amido, milho, trigo e cana-de-açúcar, que são fermentadas para a geração de ácido láctico. É biocompatível e bioabsorvível, e, portanto, apto a interagir com sistemas biológicos. Devido a essas e outras características o PLA está sendo usado em quantidades crescentes, principalmente em aplicações em embalagens flexíveis e rígidas, além de aplicações mais especializadas como as biomédicas (MELO et al., 2015; KARAMANLIOGLU, 2017; SATTI et al., 2018).

O ácido láctico é uma molécula quiral existente como dois estereoisômeros, L- e D- ácido láctico, o qual pode ser biologicamente ou quimicamente sintetizado (RUDNIK, 2008).

É um dos biopolímeros mais promissores para várias aplicações devido ao seu custo competitivo, biocompatibilidade, biodegradabilidade, baixo impacto ambiental, excelente transparência, boa processabilidade e boas propriedades mecânicas e estabilidade térmica (TOKIWA et al., 2009; BRITO et al., 2012).

Apresenta como temperaturas características a transição vítrea ( $T_g$ ), que varia de entre 50 a 80°C, e a temperatura de fusão cristalina ( $T_m$ ), entre 130 a 180°C. A estrutura molecular do PLA está esquematicamente ilustrada na Figura 3.

**Figura 3.** Estrutura química do PLA



Fonte: MELO et al., 2015.

### 3.4.2 Polipropileno (PP)

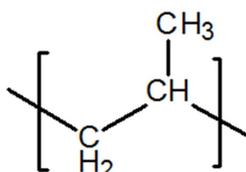
Poliiolefinas, como o polipropileno (PP), são polímeros capazes de formar filmes com alta durabilidade e resistência. Devido à sua baixa biodegradabilidade, eles podem persistir no ambiente durante décadas, contribuindo para a poluição dos solos (COSTA, 2015) e dos recursos hídricos.

O polipropileno (PP), é bastante utilizado em misturas poliméricas pelas suas características químicas e mecânicas, que em contrapartida, o tornam resistente à degradação biológica (KHAN et al., 2012). Obtido na polimerização por adição com o emprego de catalisadores do tipo Ziegler-Natta (NATTA et al., 1957), apresenta a transição vítrea ( $T_g$ ) de 4 a 8°C e a temperatura de fusão cristalina ( $T_m$ ) entre 165 e 175°C (CANEVAROLO, 2006; REDDY et al., 2008).

O PP pode apresentar-se com diferentes formas configuracionais de taticidade. O grau de cristalinidade do polipropileno isotático pode variar de 60-70%, possuindo excelentes propriedades físico-químicas, o que lhe confere ótimas aplicações comerciais. Por outro lado, o polipropileno atático (subproduto da polimerização comercial do PPI) é amorfo, de baixa massa molecular com aspecto

pastoso (CANEVAROLO, 2006). A Figura 4 apresenta a estrutura química do mero do PP.

**Figura 4.** Estrutura química do mero do propeno



Fonte: DE PAOLI, 2009.

### 3.4.3 Degradação de polímeros

De acordo com De Paoli (2009), as reações de degradação em polímeros podem ocorrer por ação abiótica ou biótica. As reações por ações abióticas envolvem vários fatores, de acordo com diferentes processos, podendo ter sua origem por ação térmica, mecânica e química (termo-oxidação, fotodegradação e foto-oxidação).

Nas reações bióticas, conhecidas por degradação biológica ou biodegradação, o processo envolve a ação de microrganismos como bactérias, fungos e algas, que em determinadas condições, colonizam a superfície do material, formando biofilmes. Estes biofilmes são constituídos por microrganismos que, em contato com os polímeros, causam mudanças químicas e/ou morfológicas, segundo estabelecido pela *American Standard for Testing and Methods* (ASTM D883-12; FLEMMING, 1998).

O termo biodegradável define todos os materiais capazes de sofrerem decomposição em dióxido de carbono, água, metano, compostos inorgânicos ou biomassa, sendo a ação enzimática de microrganismos o mecanismo predominante de decomposição (ASTM D5488-94de1, 2002).

A primeira etapa da degradação sempre está atrelada à quebra de uma ligação química covalente, gerando espécies reativas (na maioria das vezes, radicais livres) que se responsabilizam pela propagação do processo (DE PAOLI, 2009). A presença de ligações hidrolisáveis ou oxidáveis na cadeia, uma estereoconfiguração correta, um balanço entre hidrofobicidade e hidrofiliidade e uma certa flexibilidade conformacional, umidade e nutrientes, são fatores que contribuem para a adesão de microrganismos, colonização e formação de biofilme sobre o material (HUANG et al., 1995; FLEMMING; WINGENDER, 2010).

Nos processos de degradação biótica, o polímero e o microrganismo coexistem em um mesmo sistema reacional. Uma vez identificado pelo mecanismo de sinalização do microrganismo que aquela macromolécula se encontra no entorno, e que da forma como está ela não pode ser interiorizada para a célula, enzimas específicas para sua degradação são produzidas e excretadas para o meio, com o intuito de disponibilizar os monômeros, que por sua vez podem atuar como fonte de carbono para o crescimento do microrganismo. Os principais produtos da degradação biológica de polímeros são, na maioria das vezes, biomassa microbiana, água e dióxido de carbono (MARIN et al., 2013; GHAFARI MOSANENZADEH et al., 2014).

HADAD et al. (2005) destacam que o primeiro passo para iniciar o processo de biodegradação é a fixação do microrganismo à superfície do polímero, assim há a formação do biofilme. Em seguida, o polímero é utilizado como nutriente pelo grupo de microrganismos ou apenas uma linhagem selecionada, convertendo-o a moléculas mais simples, sendo mineralizados e redistribuídos por meio de ciclos biogeoquímicos, do carbono, do nitrogênio e do enxofre (VILAPLANA et al., 2010; DE PAOLI, 2009), gerando dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ), metano ( $\text{CH}_4$ ), componentes celulares e outros produtos, como ácidos orgânicos e antibióticos (RAGHAVAN, 1995; LEE; CHOI, 1998).

O acompanhamento da biodegradação de polímeros pode ser realizado por diferentes técnicas, seja na formação de produtos, alteração das propriedades (termodinâmicas, reológicas e mecânicas) do polímero remanescente ou verificação da erosão do filme polimérico e da extensão de crescimento dos microrganismos sobre ele (COSTA et al., 2015).

Como parte dos esforços para minimizar a poluição causada pelos plásticos, especialmente na última década, destacam-se iniciativas reportando enzimas que podem degradar polímeros. Yoshida et al. (2016) identificaram uma bactéria que degrada e assimila o poli(tereftalato de etileno) (PET), como fonte de carbono e energia. A bactéria *Ideonella sakaiensis* foi isolada de uma usina de reciclagem de lixo no Japão e foi relatado que esta produz um sistema enzimático que inclui a enzima PETase (EC 3.1.1.101.).

Austin et al. (2018), utilizando o acelerador de partículas, o *Diamond Light Source*, criaram um modelo tridimensional de alta definição da PETase mutante, que é ainda mais eficiente na degradação do plástico que a PETase natural.

A degradação do PLA ocorre predominantemente pela hidrólise do material, geralmente pela atuação de enzimas da classe das hidrolases, onde o produto é um ácido carboxílico, o ácido lático que é transformado em ácido pirúvico e convertido em CO<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>O pelo ciclo de Krebs (BARBANTI et al., 2005; FREIRE et al., 2010), seguida do ataque de microrganismos aos oligômeros de ácido lático, sendo o tempo de degradação no ambiente de seis meses a dois anos, depende das condições em que o material for submetido (FECHINE, 2010).

Em alguns casos não é possível ocorrer a hidrólise da cadeia polimérica via reações convencionais catalisadas por hidrolases. Nesses casos, enzimas da classe das oxidoredutases, podem ser capazes de degradar as cadeias poliméricas por meio da incorporação de um ou dois átomos de oxigênio, formando grupos álcool ou peróxil, que são mais facilmente fragmentados. Um grupo de oxidoredutases, chamadas de oxidases, são metaloproteínas, geralmente ocorrendo associadas ao átomo de íon cobre. Elas são produzidas pela maioria dos organismos ligninolíticos. Dois tipos de oxigenases são bem estudadas: um tipo catalisa reações de hidroxilação e o outro está envolvido em reações de oxidação. As enzimas ligninolíticas mais importantes são: lignina peroxidase, manganês peroxidase e lacase, que podem atuar de forma sinérgica ou isoladamente, e na presença de diferentes co-fatores como íons ferro, manganês e cobre. Elas também podem interagir com moléculas de baixa massa molar que podem levar à formação de radicais livres e, conseqüentemente, levar à oxidação e à clivagem das ligações (COSTA et al., 2015).

O polipropileno é um polímero resistente à biodegradação uma vez que é hidrofóbico e sem grupo funcional ativo (ARKATKAR et al., 2009). Tratamentos físicos (raios ultravioletas) e químicos (solventes) possibilitam a oxidação de superfície, podendo auxiliar na formação de grupos funcionais, diminuindo a hidrofobicidade da superfície (SUDHAKAR et al., 2008) e contribuindo na formação de biofilme microbiano sobre a superfície do polímero (GILAN et al., 2004). A presença de átomos de carbono terciários na cadeia polimérica do polipropileno implica na existência de ligações C-H com energia de ligação mais baixa do que nos átomos de carbono secundários. Esses átomos de carbono terciários vão ocorrer nos pontos em que há ramificação da cadeia ou substituintes promovendo a cisão da ligação C-H (MENEGOTTO, 2014).

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Local de realização da pesquisa

As fermentações foram realizadas nos laboratórios de Engenharia Bioquímica (LEB), da Unidade Acadêmica de Engenharia Química (UAEQ/UFCG). Análises de nitrogênio foram feitas no Laboratório de Armazenamento e Processamento de Produtos Agrícolas (LAPPA/UFCG).

As análises dos polímeros foram feitas utilizando os equipamentos do Laboratório de Caracterização de Materiais (LCM), Laboratório de Síntese de Materiais Cerâmicos (LabSMAC), Laboratório de Análises Térmicas (LabTer), da Unidade Acadêmica de Engenharia de Materiais (UAEMa/UFCG).

### 4.2 Representação esquemática do processo

A representação esquemática do processo de biodegradação dos polímeros PLA e PP em fermentação semissólida, está representada pela Figura 5.

**Figura 5.** Representação esquemática do processo de biodegradação em FSS



Fonte: Dados da pesquisa

### 4.3 Material

#### 4.3.1 Microrganismo

O microrganismo utilizado como inóculo foi o fungo *Psilocybe castanella* proveniente da coleção de Culturas de Algas, Cianobactérias e Fungos do Instituto de Botânica (CCIBt) da Secretaria do Meio Ambiente do Estado de São Paulo e classificado na coleção do instituto como CCIBt 2781. O meio de cultura foi esterilizado a 121°C e as culturas foram crescidas em placa de Petri contendo o meio MEA (ágar extrato de malte) sob refrigeração (28°C), por 10 dias (Figura 6).

**Figura 6.** Imagem do fungo basidiomiceto *P. castanella* CCIBt 2781 com crescimento de 10 dias em placa de Petri a 28°C



Fonte: Dados da pesquisa

#### 4.3.2 Polímeros utilizados

O polipropileno (PP) sintético foi obtido na forma de copos descartáveis brancos, marca COPOBRAS.

Poli(ácido láctico) (PLA), Ingeo<sup>®</sup> 2002D da NatureWorks, fornecido na forma de *pellets* pelo laboratório de Caracterização de Materiais (LCM/UFCG), com índice de fluidez de (4-8) g.10 min<sup>-1</sup>, na temperatura de 190°C.

#### 4.3.3 Resíduo lignocelulósico

O resíduo de coco verde usado para a preparação do meio de cultivo foi adquirido de uma fazenda localizada em Riachão do Bacamarte (a 32 km de Campina Grande, Paraíba) e a farinha de soja, obtida no comércio local da cidade.

### 4.4 Métodos

#### 4.4.1 Preparação do substrato (resíduo seco)

Inicialmente, o resíduo de coco verde composto pelo mesocarpo (fibra e pó) e epicarpo (camada mais externa da casca), foi lavado em água corrente, selecionado, classificado e triturado em forrageira marca Laboremus, modelo MC1r. Em seguida foi seco a 55°C, até massa constante (LEB/UFCG). Para o processo de caracterização, foi realizado o quarteamento para a padronização da amostra.

Farinha de soja foi usada como fonte de nitrogênio para suplementação do resíduo de coco, de forma a manter a relação C/N de 90 ou menor (32), para avaliação do efeito da concentração na produção enzimática.

O ajuste da relação C/N foi feito pela determinação de carbono orgânico e nitrogênio total de cada componente, adaptada da expressão da EMBRAPA, descrita por Gomes et al. (2001), conforme Equação 1:

$$PMRC = \frac{(30 \times N_n) - C_n}{C_c - (30 \times N_c)} \quad (1)$$

Onde, PMRC = partes de material rico em carbono

Nn = teor de nitrogênio do material rico em nitrogênio

Cn = teor de carbono do material rico em nitrogênio

Cc = teor de carbono do material rico em carbono

Nc = teor de nitrogênio do material rico em carbono

A umidade inicial do meio foi ajustada para 70% (b.u.) da capacidade máxima de retenção de água (BALLAMINUT; MATHEUS, 2007), pela adição de um volume definido de água destilada, determinado pelo balanço de massa (Equação 2).

$$V_{AA} (g \cdot cm^{-3}) = \frac{m_i (U_2 - U_1)}{1 - U_2} \quad (2)$$

Onde,  $V_{AA}$  = volume de água a ser adicionada

$m_i$  = massa do meio a ser umidificado (g)

$U_1$  = umidade do meio

$U_2$  = umidade do meio desejada

#### 4.4.2 Caracterização do substrato

As análises físico-químicas do resíduo de coco verde e da farinha de soja (umidade, cinzas, extrativos, holocelulose, alfacelulose e lignina) foram realizadas baseadas nos procedimentos padrões da EMBRAPA, *Procedimentos para Análise Lignocelulósica* descrita por Moraes et al. (2010) e na norma TAPPI (LEB/UFCEG). As análises de carbono (EMBRAPA, descrita por Conceição et al., 1999) e nitrogênio (Kjeldahl) foram realizadas no Laboratório de Armazenamento e Processamento de Produtos Agrícolas (LAPPA/UFCEG).

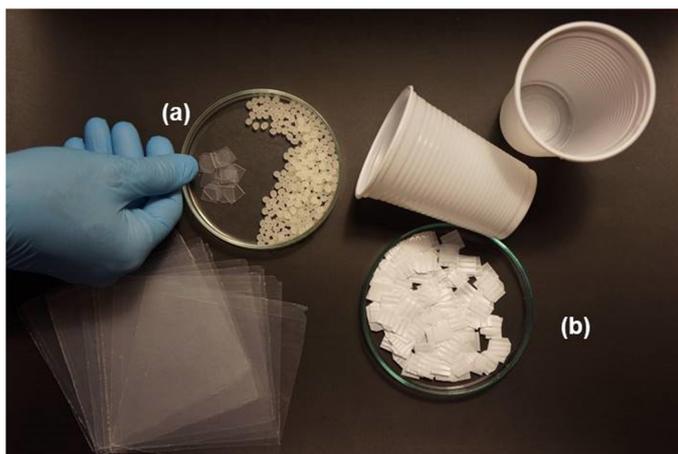
As análises foram feitas em triplicata e expressas em porcentagem (Ver procedimentos no ANEXO A).

#### 4.4.3 Preparo dos filmes poliméricos

Os filmes de PLA foram produzidos por moldagem por compressão em prensa da marca Solab, modelo SL-11/15t, com temperatura de 180°C por 5 minutos e 5 toneladas de pressão. Após a moldagem, os filmes foram recortados com dimensões aproximadas comprimento x largura em (cm) de 1 x 1, como pode ser observado na Figura 7a. Os equipamentos utilizados encontram-se no laboratório de Caracterização de Materiais (LCM/UAEMa/UFCG). Para a desinfecção do PLA, os *flakes* foram imersos em solução de etanol 70% por 3 minutos e secos a 50°C por 12 horas em condições estéreis (MENEGOTTO, 2014).

O polipropileno (PP), obtido na forma de copos descartáveis, foi utilizado na forma de *flakes* nas dimensões de 1 x 1, para comprimento x largura em (cm), respectivamente (Figura 7b). A desinfecção dos *flakes* de PP foi feita em solução desinfetante, como preconiza a norma ASTM G22-76.

**Figura 7.** *flakes* de (a) filmes de PLA e (b) copos descartáveis de PP



Fonte: Dados da pesquisa

#### 4.4.4 Preparo do sistema de cultivo

Foram preparados em frascos de vidro de 268 mL contendo 20% ( $m \cdot v^{-1}$ ) de substrato sólido, previamente esterilizado por via úmida a 121°C, por 30 minutos. Para cada sistema, 5 discos do inóculo ( $\varnothing = 0,8$  cm), constituído de micélio fúngico em crescimento cultivado em Ágar Extrato de Malte (MEA) e dois *flakes* esterilizados do polímero foram introduzidos.

A incubação foi feita em condições controladas, de temperatura ( $28 \pm 2^\circ\text{C}$ ) e umidade (70%), em estufa bacteriológica marca Biopar, modelo S150BD, por 90 dias. Para análise da influência do corante RBBR ( $\text{C}_{22}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{Na}_2\text{O}_{11}\text{S}_3$ , da Sigma-Aldrich) na produção de enzimas, foi acrescido 0,05% ( $m \cdot v^{-1}$ ) do corante ao meio de cultura.

Os controles bióticos, caracterizados pela ausência de polímero e RBBR; abióticos (controle negativo), caracterizados pela ausência do fungo, e os sistemas individuais para cada polímero, foram avaliados em triplicata. O crescimento micelial foi avaliado de forma visual. Todo o procedimento foi realizado em condições estéreis (LEB/UFCG).

#### 4.4.5 Extração das enzimas

Em diferentes intervalos de tempo (5, 10, 20, 30, 60 e 90 dias), frascos em triplicata foram retirados aleatoriamente, pela análise visual.

A solução enzimática foi extraída em tampão acetato de sódio (50 mM, pH 4,8), utilizando bastão de vidro para desagregar os grumos de substrato fermentado seguida de agitação a 120 rpm por 1 h em incubadora SHAKER marca Solab, modelo SL-223, mantendo a temperatura em 10°C.

Os extratos enzimáticos foram filtrados em papel filtro conforme metodologia descrita em Moreira Neto (2006) e reservados para as análises de atividade das enzimas (LEB/UFCG).

#### 4.4.6 Atividades enzimáticas

As atividades de lacase foram determinadas pela oxidação do ABTS em tampão citrato-fosfato 50 mM, pH 4,0 (BOURBONNAIS; PAICE, 1990). A mistura foi utilizada usando 0,75 mL de tampão citrato-fosfato (50 mM, pH 4,0), 0,15 mL de água ultra pura, 0,3 mL de ABTS a 5 mM e 1,8 mL do extrato enzimático. Com a adição do ABTS, a reação é iniciada e sua oxidação, acompanhada pelo aumento da absorbância a 420 nm ( $\epsilon = 36.000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ), por 10 minutos (Espectrofotômetro Bel Photonics 2000 UV-Vis.).

As atividades de manganês peroxidase (MnP) foram determinadas por meio da oxidação do vermelho de fenol em tampão succinato de sódio 0,2 M, pH 4,5, de acordo com Kuwahara et al. (1984). A mistura foi constituída de 0,9 mL de solução A (tampão succinato de sódio 0,2 M, pH 4,5; lactato de sódio 0,1 M; albumina bovina 0,5%), 0,15 mL de  $\text{MnSO}_4$  2 mM, 1,5 mL de extrato enzimático, 0,15 mL de  $\text{H}_2\text{O}_2$  2 mM e 0,3 mL de vermelho de fenol 0,1%. A reação teve início pela adição do vermelho de fenol e foi acompanhado o aumento na absorbância em 610 nm ( $\epsilon = 4.460 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ) durante 10 minutos, em espectrofotômetro.

Uma unidade de atividade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima capaz de oxidar 1  $\mu\text{mol}$  de substrato por minuto, sendo as atividades enzimáticas aqui expressas em  $\text{UL}^{-1}$ , calculada usando a Equação 3.

$$U \cdot L^{-1} = \frac{\Delta_{abs} \times 10^6}{\epsilon \times R \times t} \quad (3)$$

Onde,  $\Delta_{abs}$  = absorbância (final – inicial)

$\epsilon$  = coeficiente de extinção molar ( $\text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ )

R = quantidade de extrato enzimático utilizado (mL)

t = tempo de reação (min)

#### 4.4.7 Caracterização do sistema enzimático ligninolítico

A caracterização foi realizada nos extratos obtidos com 10 dias de crescimento de *P. castanella* em resíduo de coco verde, avaliando-se o pH e temperatura ótimos de reação.

O estudo da influência do pH na oxidação do substrato pelo extrato enzimático foi conduzido com tampão acetato de sódio (pH 3,0 a 6,0), Tris-HCl (para pH acima de 7,0) e Glicina-NaOH (pH 8,6 a 10,6) a 50 mM. As atividades enzimáticas foram determinadas como descrito na metodologia padrão (item 4.4.6), alterando-se apenas o tampão para a extração das enzimas, nos pH avaliados.

A influência da temperatura na atividade enzimática do extrato bruto foi verificada na faixa de 25-70°C, empregando-se o pH ótimo (metodologia adaptada de Moreira Neto, 2006). O extrato enzimático foi pré-incubado nas temperaturas de reação de 25 à 70°C por 5 minutos e, logo após, determinada atividade enzimática pela oxidação do substrato.

#### 4.4.8 Caracterização dos polímeros

##### 4.4.8.1 Microscopia ótica (MO)

As superfícies dos polímeros foram analisadas utilizando um microscópio ótico Opton, lente Semi Plan (10/0,25) com aumento de 100 x.

##### 4.4.8.2 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A morfologia das amostras foi avaliada por microscopia eletrônica de varredura (MEV) em um microscópio Shimadzu, modelo SSX-550 Superscan, com feixe de elétrons e tensão de aceleração de 15 kV em alto vácuo e cobertura de ouro. Ensaios foram também realizados em superfícies de fratura do *flakes*,

submetidos à fratura frágil em nitrogênio líquido para evitar a deformação plástica (LCM/UAEMa/UFCG).

#### 4.4.8.3 Difração de raios X (DRX)

As análises de DRX foram conduzidas à temperatura ambiente em um equipamento Shimadzu XRD-6000, utilizando radiação  $\text{CuK}\alpha$  ( $\lambda = 1,5418 \text{ \AA}$ ), em 40 kV e 30 mA. As curvas de difração de raios X foram obtidas em um difratômetro BRUKER, modelo D2 PHASER. Os polímeros expostos e não expostos ao microrganismo foram examinados em um intervalo de  $2\theta$  entre  $10$  e  $35^\circ$  com velocidade de varredura de  $2^\circ \cdot \text{min}^{-1}$  (LabSMAC/UFCG).

#### 4.4.8.4 Espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

As análises de FTIR foram realizadas em um espectrômetro de infravermelho da marca Bruker, modelo VERTEX 70, no modo de refletância total atenuada (ATR), com varredura de  $4000$  a  $400 \text{ cm}^{-1}$  e resolução de  $4 \text{ cm}^{-1}$ . Os *flakes* foram caracterizados diretamente por reflexão, sem nenhum tipo de preparação (LabSMAC/UAEMa/UFCG). Os dados obtidos foram verificados pelo *software* Opus e os gráficos foram plotados utilizando o *software* OriginPro 2018.

#### 4.4.8.5 Calorimetria exploratória diferencial (DSC)

As análises de DSC foram realizadas em um equipamento DSC Q20 da TA Instruments. Foram utilizadas amostras de aproximadamente 3-5 mg que foram aquecidas e resfriadas desde a temperatura ambiente até  $200^\circ\text{C}$ , em atmosfera de nitrogênio, com equipamento operando a uma taxa de aquecimento e resfriamento de  $10^\circ\text{C min}^{-1}$  (LabTer/UAEMa/UFCG).

A cristalinidade dos polímeros ( $X_c$ ) foi obtida pelos termogramas DSC e a Equação 4 (PANAITESCU et al., 2015):

$$X_c (\%) = \frac{\Delta H_m}{\Delta H_m^\circ} \quad (4)$$

Onde  $\Delta H_m$  é a entalpia endotérmica de fusão do polímero lida no termograma, em  $J \cdot g^{-1}$ , e  $\Delta H_m^\circ$  é a entalpia teórica do polímero 100% cristalino, que corresponde a  $93,6 J \cdot g^{-1}$  para o PLA (AURAS et al., 2011) e  $165 J \cdot g^{-1}$  para o PP (BRANDUP et al., 1998).

Os dados obtidos da análise de DSC foram verificados pelo *software* TA60 e os gráficos foram plotados utilizando o *software* OriginPro 2018.

#### 4.4.8.6 Termogravimetria (TG)

A análise termogravimétrica foi realizada em uma termobalança da marca Shimadzu, modelo DTG 60H, com aquecimento das amostras de 40 a  $500^\circ C$ , com taxa de aquecimento de  $10^\circ C \cdot min^{-1}$  e fluxo de  $100 mL \cdot min^{-1}$  de nitrogênio (LabTer/UFCG). Os dados obtidos foram verificados pelo *software* TA60 e os gráficos foram plotados utilizando o *software* OriginPro 2018.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Caracterização do substrato

Na Tabela 1 estão apresentados os resultados da caracterização físico-química, valores médios e desvios padrão, do resíduo do coco verde e da farinha de soja, utilizados como suporte para o crescimento do microrganismo. O baixo teor de umidade, obtido na secagem garante a durabilidade desses materiais e de produtos elaborados a partir deles, sendo os valores inferiores ao padrão estabelecido pela RDC nº 263 de 2005, que estabelece uma umidade máxima de 15% (BRASIL, 2005).

**Tabela 1.** Valores médios e desvio padrão dos parâmetros analisados na caracterização físico-química dos resíduos

Parâmetros	Casca de coco verde (%)	Farinha de Soja (%)
Umidade (b.u.)	8,95 ± 0,47	5,83 ± 0,11
Cinzas	4,30 ± 0,16	4,32 ± 0,17
Extrativos	6,68 ± 0,88	-
Lignina	24,47 ± 1,22	-
Holocelulose	50,09 ± 2,57	-
Alfacelulose	25,91 ± 8,62	-
Carbono Orgânico	30,13	15,06
Nitrogênio Total	0,72	7,03

Nota-se que a composição química da cultivar examinada do coco verde, apresentou algumas variações em relação aos intervalos encontrados na literatura, levando-se em conta que a lignocelulose é constituída por lignina, carboidratos (celulose e hemicelulose), pectina, proteínas, cinzas, sal e minerais, e proporções destes compostos variam entre várias plantas (MANAVALAN et al., 2015), já que a constituição final de cada planta sofre influência, como clima (temperatura,

umidade), constituição do solo, época de colheita e outros, fazendo com que plantas de mesma espécie apresentem composições diferentes.

A análise do material *in natura* (lignina, alfacelulose e holocelulose, seguindo normas da EMBRAPA descrita por Morais et al. (2010) e hemicelulose, por diferença), revelou um teor de lignina próximo ao encontrado por Giannetti et al. (2012), de aproximadamente 30%, mas inferior aos valores normalmente encontrados na literatura (35-45%). Em relação aos componentes secundários extrativos e cinzas, os resultados apresentaram teores próximos aos encontrados por Silva et al. (2018) em seu estudo para o aproveitamento do mesocarpo do coco verde.

A análise dos dados evidencia que o teor de celulose encontrado apresentou semelhança a outros observados na literatura (23-43%) e uma alta concentração de nitrogênio, superior ao encontrado por Silva (2018), de 0,3%.

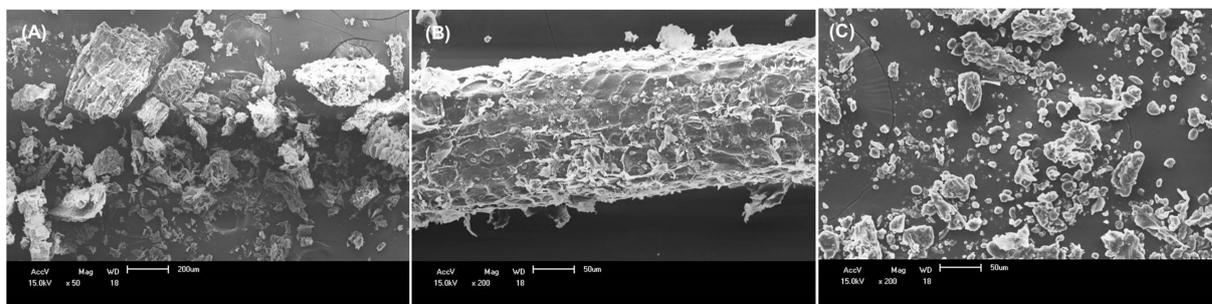
Cunha (2014), avaliando esse resíduo também obteve resultados que indicam o potencial do resíduo do coco verde como alternativa para a produção de enzimas, relacionado à composição química do material abundante em lignina, que em massa, representa cerca de 20 a 30% do material lignocelulósico seco.

Observou-se que para a farinha de soja, os valores médios de umidade, nitrogênio e cinzas, não apresentaram diferenças significativas e estão de acordo com os valores observados na literatura (SILVA et al., 2012; RIGO et al., 2015).

Além disso, os resultados alcançados no presente trabalho também podem ser comparados com outros estudos como alternativa para destinação desse resíduo agrícola, considerando também o seu teor de carbono que adicionando uma fonte de nitrogênio, visa verificar a possibilidade de estimulação do sistema ligninolítico, capaz de desestruturar a parede celular e despolimerizar os componentes dos materiais lignocelulósicos, gerando substâncias susceptíveis ao metabolismo intracelular.

Na Figura 8 têm-se as fotomicrografias da casca de coco verde (fibra e pó) e da farinha de soja. A fibra do coco verde *in natura* demonstrou compatibilidade com o estudo realizado por Silva (2018), que constatou morfologia porosa com superfície irregular.

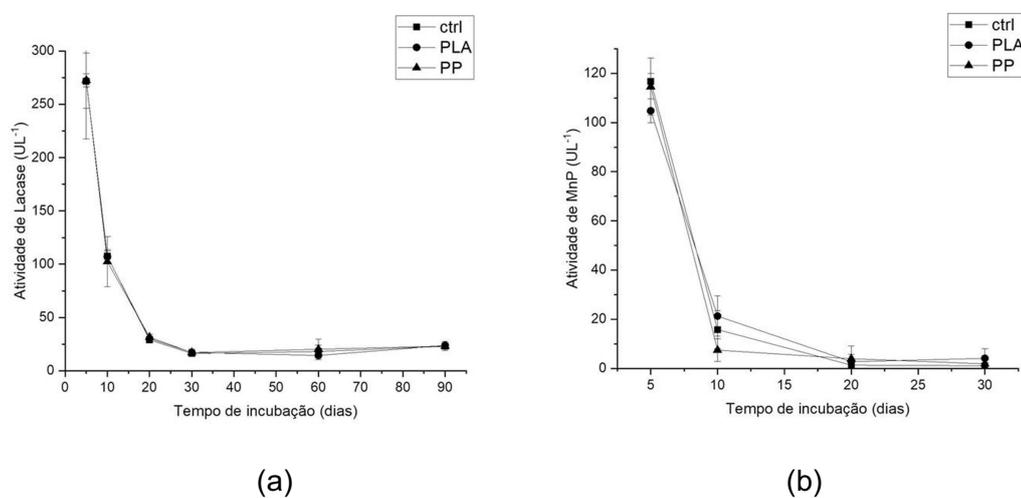
**Figura 8.** Micrografia das (A) partículas da fibra da casca do coco verde *in natura* (ampliação de 50 x), (B) fibra do coco verde (ampliação de 200 x) e (C) farinha de soja (ampliação de 200 x)



## 5.2 Atividades enzimáticas

Para verificar a presença de enzimas nos extratos obtidos dos biorreatores sem e com os fungos para o controle e ensaios contendo os polímeros PLA e PP e o RBBR, lacase e MnP foram quantificadas e os resultados podem ser visualizados na Figura 9.

**Figura 9.** Cinética de produção de atividade de (a) lacase e (b) MnP por *P. castanella* em resíduo de coco verde com farinha de soja C/N 32 em frascos contendo *flakes* de (●) PLA e (▲) PP. (■) Controle biótico (substrato e inóculo na ausência de RBBR e polímeros)



Comparando as atividades de lacase e MnP de *P. castanella*, observa-se o mesmo perfil de atividade enzimática, com picos de máxima atividade com 5 dias de crescimento de *P. castanella*, ocorrendo um decréscimo da atividade com o tempo, evidenciando predomínio de atividade de lacase, por 90 dias.

Durante a realização dos experimentos, foi constatado que relações C/N menores induziram a síntese de lacase e inibiram o crescimento micelial, uma vez que a atividade cinética da enzima foi determinada também para relação C/N 90. Os polímeros, assim como a adição de RBBR aos sistemas de cultivo, não influenciaram a produção dessas enzimas, visto que não houve diferença entre o controle e os demais sistemas.

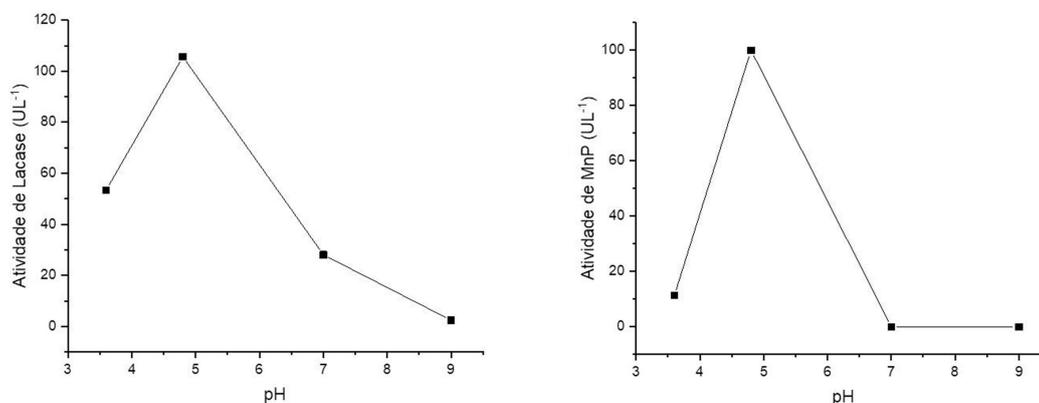
### 5.3 Caracterização do sistema enzimático ligninolítico

A caracterização do sistema enzimático ligninolítico foi realizada com extratos enzimáticos obtidos no 10º dia de cultivo.

As Figuras 10 e 11 apresentam os efeitos de pH e temperatura sobre as atividades enzimáticas de lacase e MnP. Foram determinadas as atividades dos extratos obtidos das culturas de *P. castanella* em resíduo de coco verde com adição de farinha de soja e controle abiótico, na faixa de pH de 3,6-9,0, utilizando-se os tampões acetato de sódio, tris-HCl e glicina-NaOH.

O pH ótimo da lacase e MnP de *P. castanella* está de acordo com a maioria dessas enzimas de basidiomicetos (MOREIRA NETO, 2006; COELHO, 2007; MOIN, S.; OMAR, M., 2013; MANAVALAN et al., 2015), normalmente encontrados na faixa ácida, entre 2,5 e 5,0.

**Figura 10.** Efeito do pH nas atividades de lacase e MnP ( $UL^{-1}$ ) de extratos obtidos do crescimento de *P. castanella* em resíduo de coco verde com farinha de soja C/N 32

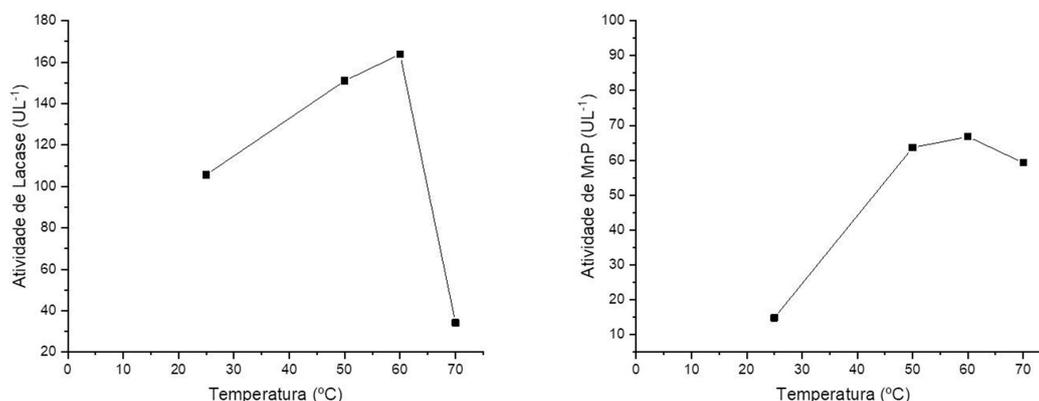


Comparando os resultados obtidos para as atividades de lacase e MnP de *P. castanella*, observa-se o mesmo perfil de atividade enzimática, o aumento do pH de reação promoveu um decréscimo nas atividades.

Moreira Neto (2009) em seus estudos iniciais utilizando *P. castanella*, na biorremediação de solos contaminados com resíduos industriais organoclorados na Baixada Santista (SP), evidenciou o pH como um parâmetro importante para o crescimento desses fungos, atividade de lacase e descoloração *in vitro* do RBBR e que assim como observado para *P. castanella*, lacases de muitos outros basidiomicetos apresentam o pH ótimo na região ácida, com maiores atividades obtidas em pH 3,5 e em pH 4,5 para *L. crinitus* e *P. castanella*, respectivamente.

Na Figura 11 observa-se que a atividade enzimática, avaliada no pH ótimo 4,8 em tampão acetato de sódio, apresentada pelas enzimas lacase e MnP foram ativadas pelo aumento da temperatura.

**Figura 11.** Efeito da T nas atividades de lacase e MnP ( $UL^{-1}$ ) de extratos obtidos do crescimento de *P. castanella* em resíduo de coco verde com farinha de soja C/N 32



A temperatura ótima para a maioria das enzimas lacases e MnP situa-se na faixa de 50 a 70°C (BABOROVÁ et al., 2006; MOROZOVA et al., 2007; MOIN, S.; OMAR, M., 2013; MANAVALAN et al., 2015). Neste trabalho, a temperatura de atividade máxima apresentada pelas enzimas lacase e MnP do fungo *P. castanella* foi de 60°C, se mostrando ativas até 70°C, o que indica a possibilidade dessas enzimas serem aplicadas em processos biotecnológicos, como acelerar a cinética da reação de degradação de polímeros, mediando a oxidação inicial das cadeias, atuando de forma sinérgica com os mecanismos bióticos de degradação (COSTA et al., 2015).

O aumento da temperatura de reação pode promover aumento nas atividades dessas enzimas, devido o aumento de agitação das moléculas com aumento da frequência das colisões entre substrato e enzima. Acima da temperatura ótima de atividade de uma enzima, a velocidade de reação cai de maneira aguda, geralmente devido à desnaturação da enzima pelo calor (HARPER et al., 1982).

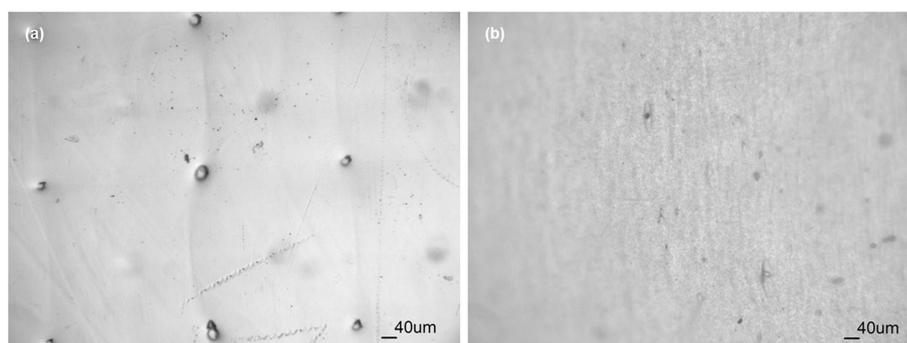
## 5.4 Caracterização da degradação dos polímeros

### 5.4.1 Caracterização morfológica

Para caracterizar a degradação no processo de fermentação semissólida, foram produzidos os filmes de PLA por moldagem por compressão e PP na forma de copos descartáveis, ambos utilizados na forma de *flakes*.

A morfologia dos polímeros foi avaliada por microscopia ótica da superfície, antes e após a exposição biológica. As imagens dos filmes poliméricos antes da incubação com o fungo basidiomiceto são apresentadas na Figura 12.

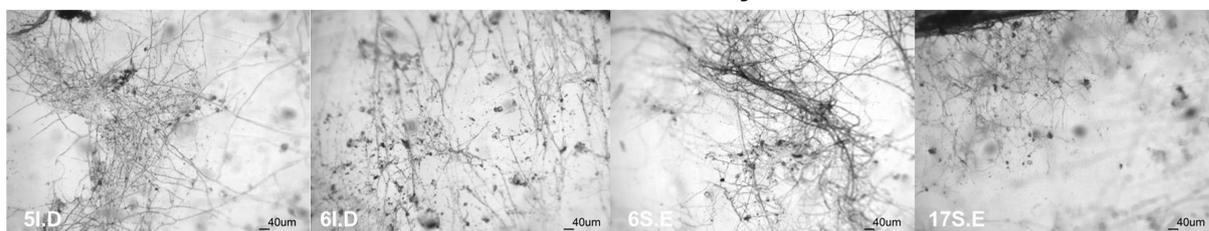
**Figura 12.** Imagens das superfícies dos *flakes* de (a) PLA e (b) PP de copos descartáveis, antes da incubação com ampliação original de 100 x



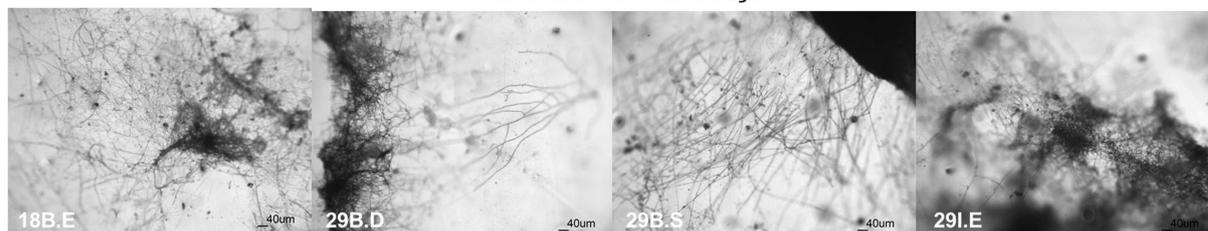
As Figuras 13 e 14 apresentam, respectivamente, as micrografias realizadas por microscopia ótica dos *flakes* de PLA e PP após 10, 20, 30, 60 e 90 dias de exposição ao fungo.

**Figura 13.** Imagens dos *flakes* de PLA após 10, 20, 30, 60 e 90 dias de incubação a 28°C

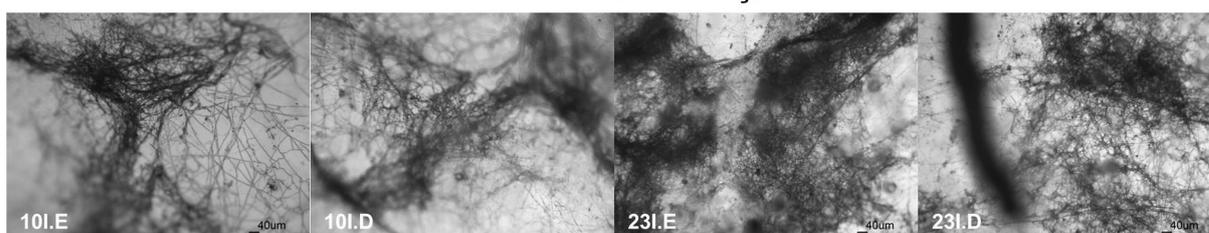
**PLA 10 dias de incubação**



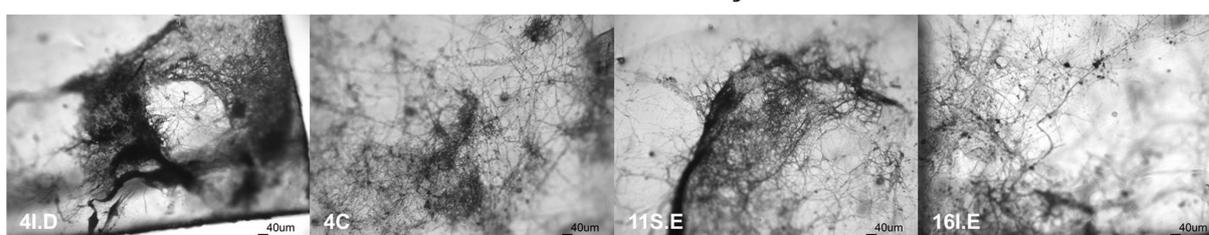
**PLA 20 dias de incubação**



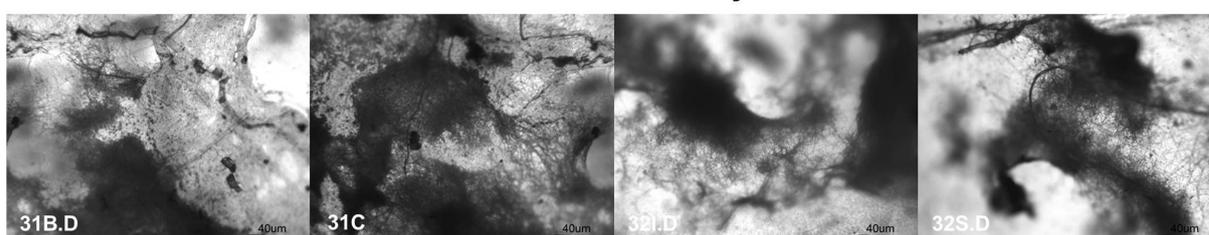
**PLA 30 dias de incubação**



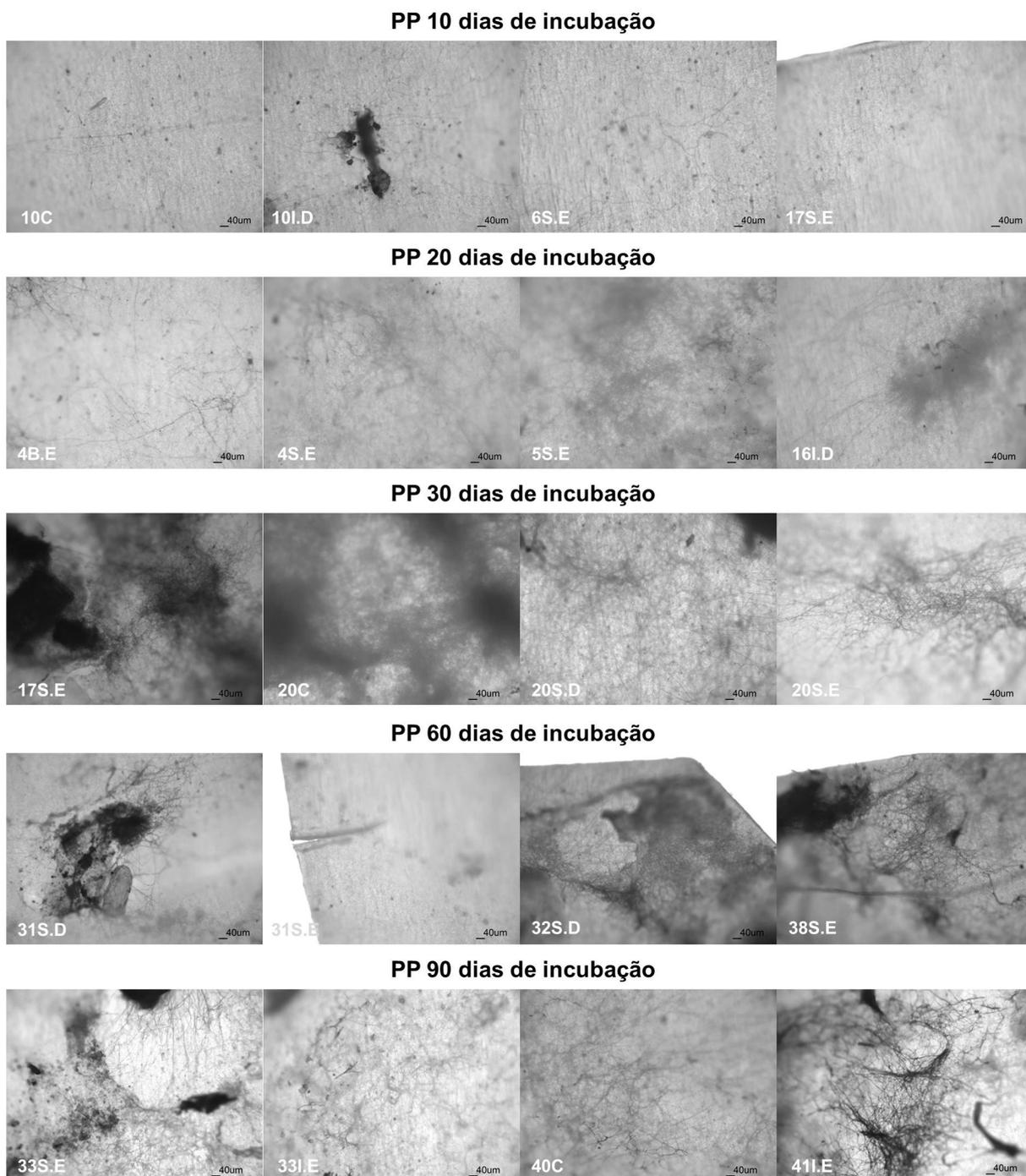
**PLA 60 dias de incubação**



**PLA 90 dias de incubação**



**Figura 14.** Imagens dos *flakes* de PP após 10, 20, 30, 60 e 90 dias de incubação a 28°C



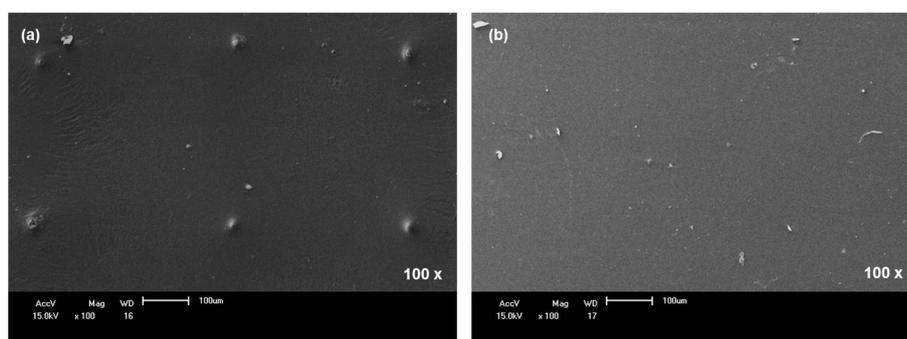
Nas Figuras 13 e 14, pode ser observado que o fungo foi capaz de colonizar os polímeros, com formação de biofilme fúngico. É possível perceber que, com o passar do tempo a colonização ficou mais vigorosa, sendo porém observado que o PP foi aparentemente colonizado com menor intensidade que o PLA.

Observou-se que o micélio permaneceu aderido aos *flakes*, mesmo após o procedimento de limpeza com água destilada, destacando-se uma maior aglomeração do micélio nos filmes após 20 dias de incubação.

Os *flakes* de PLA e PP foram ainda submetidos à análise de perda de massa, sendo verificada a média das massas, em duplicata, antes e após a exposição ao fungo. Devido ao incremento de biomassa micelial, que muitas vezes ficou aderida aos *flakes*, não foi possível avaliar com precisão a perda de massa durante o experimento.

Micrografias no MEV antes da exposição ao microrganismo (Figura 15), apresentam mais detalhadamente as características das superfícies dos polímeros.

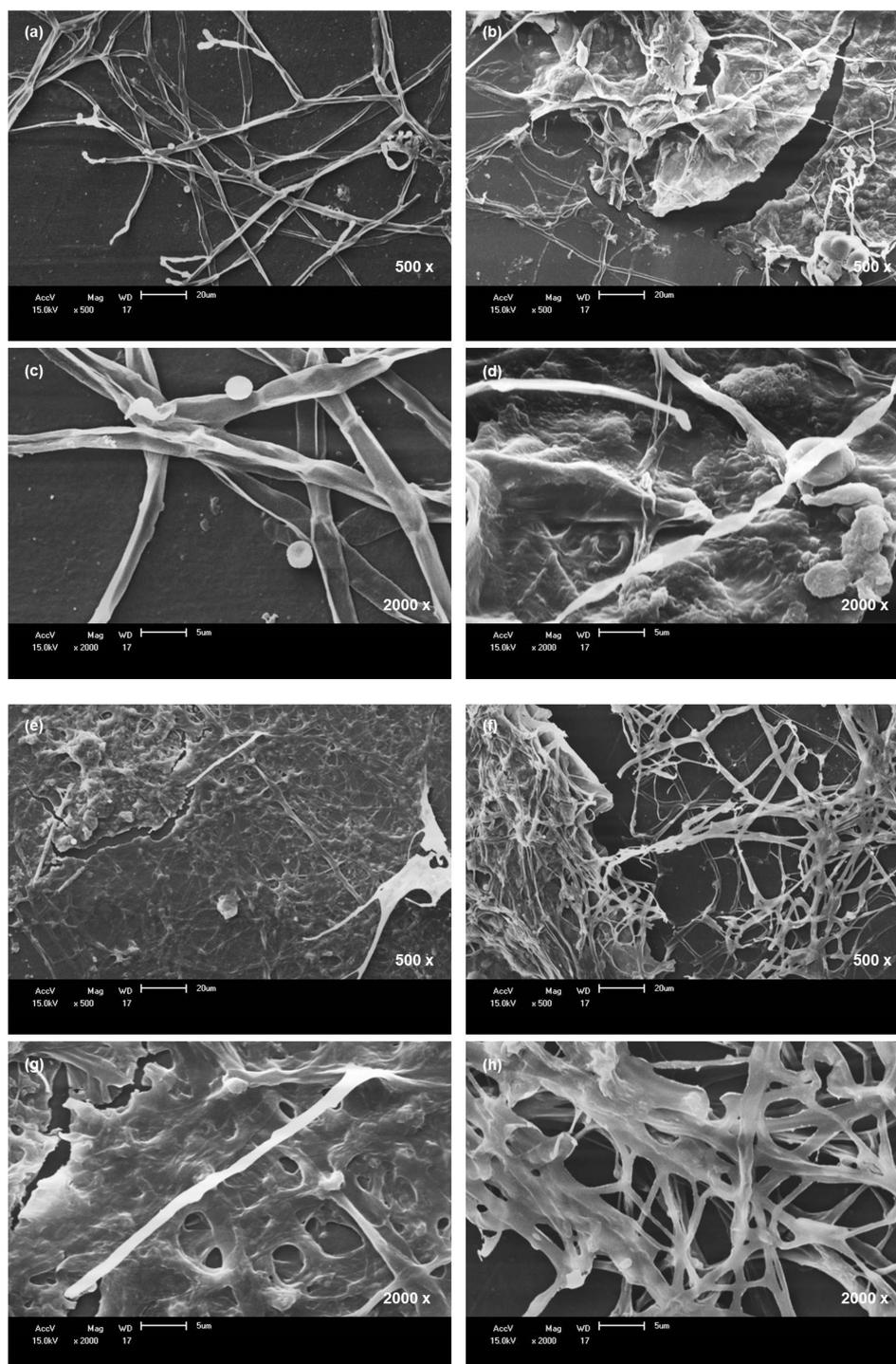
**Figura 15.** Micrografias por MEV do filme de PLA (a) e PP (b) de copos descartáveis com ampliação original de 100 x sem exposição



Observa-se que os filmes apresentam superfícies contínuas e uniformes, com pequenas irregularidades originadas do processamento dos mesmos, mais evidentes para o PLA, onde são observados pequenos orifícios, que podem ser atribuídos a malha utilizada na prensa e ainda, a bolhas de ar que podem se formar no processo de moldagem por compressão.

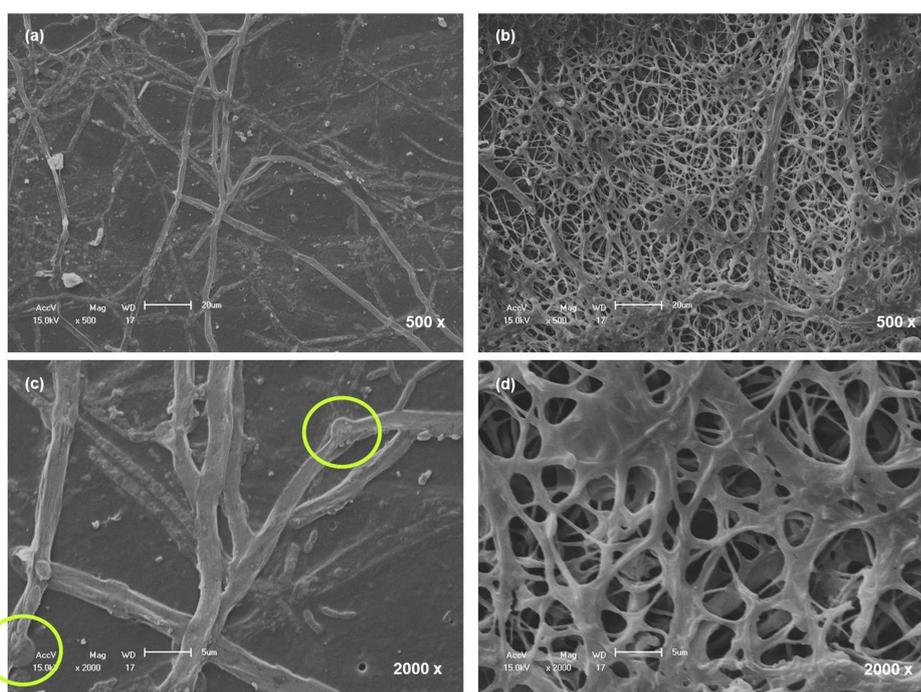
Na Figura 16 são apresentadas as micrografias das superfícies dos *flakes* de PLA e PP em 10 e 20 dias, numa ampliação de 500 x e 2000 x e na Figura 17, após 30 dias, com magnitudes originais de 500 x e 2000 x.

**Figura 16.** Micrografias no MEV da superfície dos polímeros PLA e PP: em 10 dias (a) (PLA) e (b) (PP), em 20 dias (e) (PLA) e (f) (PP), com ampliação original de 500 x e (c) (PLA), (d) (PP), (g) (PLA) e (h) (PP), com ampliação original de 2000 x



Confirma-se ainda, nas Figuras 15 e 16, que com o aumento do tempo de exposição entre o fungo e os polímeros, há um aumento no nível de colonização. De acordo com Flemming (1998) e Gu (2000), a ocorrência de colonização e formação de biofilme, são indícios de processo de degradação.

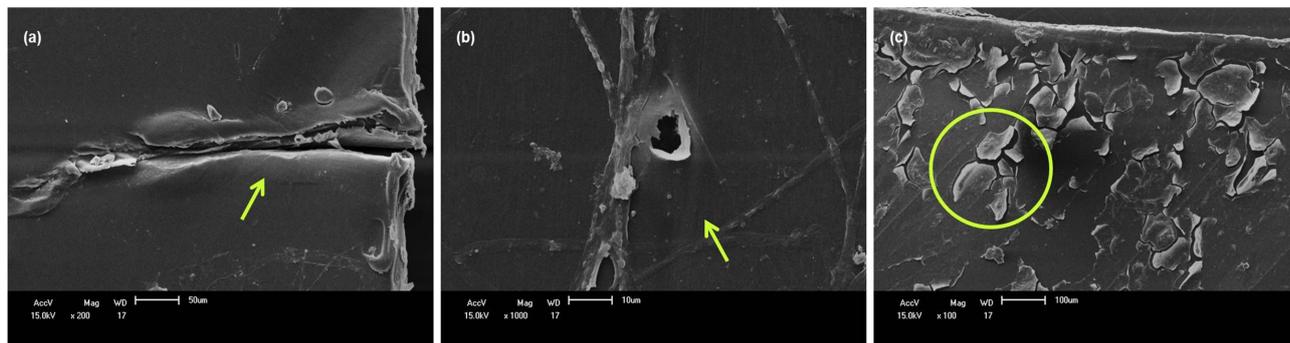
**Figura 17.** Micrografias no MEV da superfície dos polímeros PLA e PP em 30 dias: (a) (PLA) e (b) (PP), com ampliação original de 500 x e (c) (PLA) e (d) (PP), com ampliação original de 2000 x



Na Figura 17c, observa-se a formação de ansas, estruturas características desse gênero de microrganismo, formadas durante a divisão celular conjugada das hifas (ALEXOPOULOS et al., 1996).

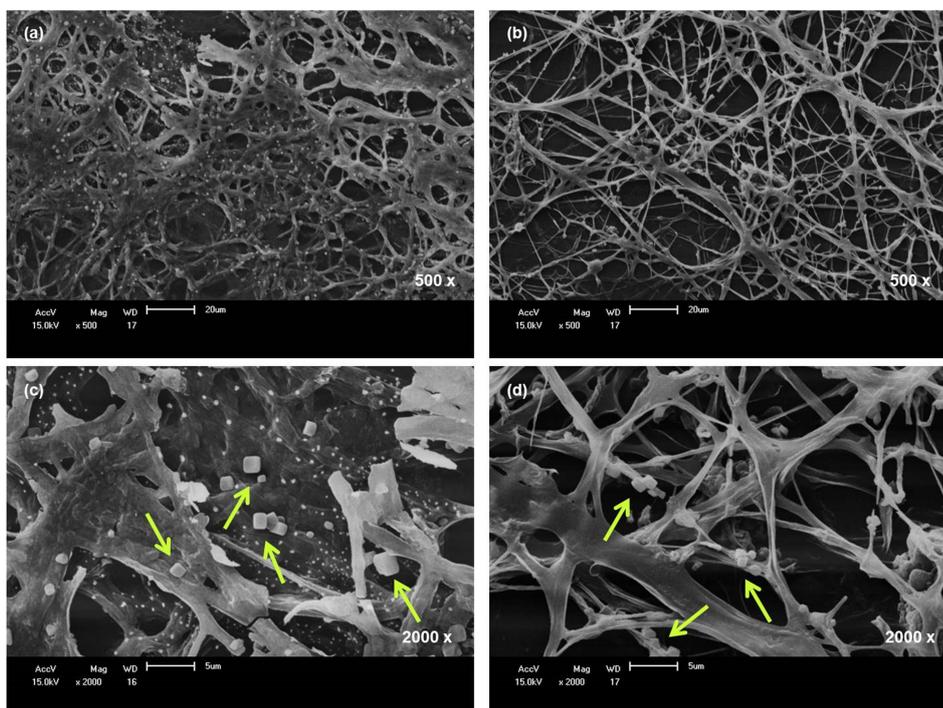
Com o aumento do tempo de exposição, é possível observar nos copos de PP alterações na superfície dos *flakes*, como a formação de microfissuras, além de furos e descascamentos, com padrões lineares e distribuídos uniformemente por toda a superfície do material (Figura 18).

**Figura 18.** Micrografias no MEV da superfície dos copos PP: em 60 dias (a) e (b) e (c) em 90 dias de exposição



As micrografias no MEV da superfície dos polímeros (a) e (c) PLA e (b) e (d) PP em 60 dias, são apresentadas na Figura 19.

**Figura 19.** Micrografias no MEV da superfície dos polímeros PLA (a) e (c) e PP (b) e (d) em 60 dias



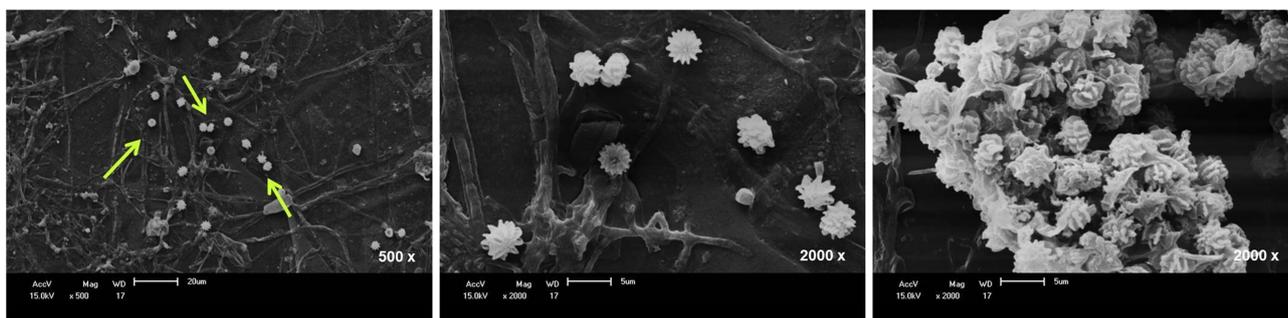
Nas imagens dos *flakes* de PLA (Figura 19a) e PP (Figura 19b) com exposição em 60 dias, nota-se o aparecimento de partículas dispersas na matriz dos polímeros. No entanto, a maior ampliação das imagens (Figuras 19c,d) revela que

essas partículas apresentam uma variedade de tamanhos e formas, sendo a maioria delas cúbicas.

Está reportado na literatura (CARLSSON; WILES, 1976; RABEK, 2012; SCOTT, 2013; DA SILVA et al., 2016), que durante o processo de degradação dos polímeros, as reações oxidativas na superfície do material levam à cisão de cadeias nas regiões amorfas, liberando pequenos segmentos moleculares. Esses segmentos por possuírem mobilidade suficiente podem se rearranjar em novas estruturas cristalinas, provavelmente sobre cristais pré-existentes. Como resultado, tem-se um aumento no grau de cristalinidade do polímero durante a exposição.

A Figura 20 apresenta as micrografias do PLA em 90 dias. É possível observar que as estruturas cúbicas percebidas em 60 dias já não podem ser vistas.

**Figura 20.** Micrografias no MEV da superfície do PLA em 90 dias



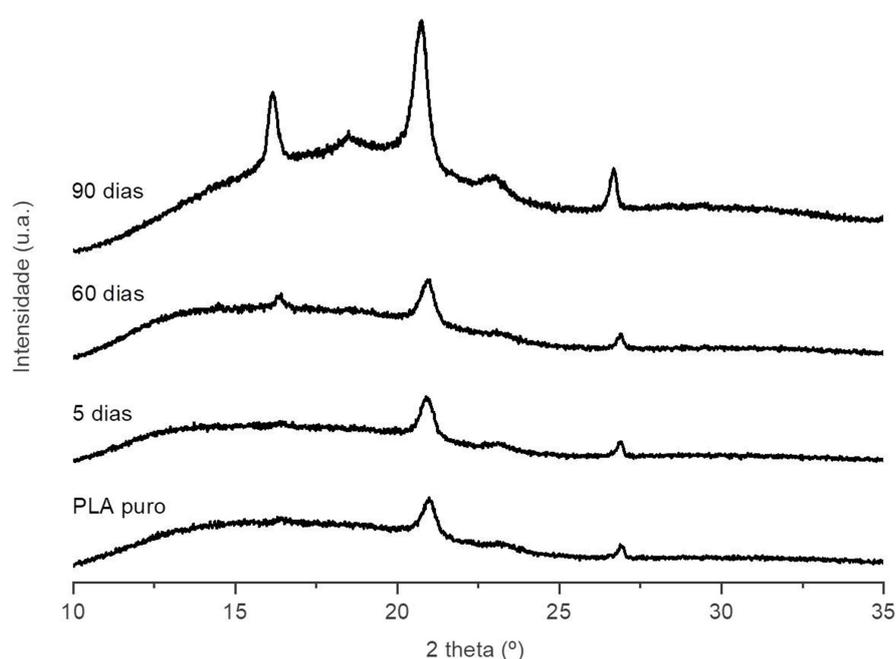
No entanto, em 90 dias, observa-se na ampliação das imagens do PLA (Figura 20) formações semelhantes a “pequenas flores”. O diâmetro médio das superestruturas é de cerca de 3  $\mu\text{m}$ .

A verificação das imagens 19a e 20 demonstram que isso sugere que o tempo de reação influenciou a mudança da morfologia das estruturas cristalinas que foram geradas pela degradação do PLA.

#### 5.4.2 Difração de raios X (DRX)

As curvas de DRX obtidas a partir da análise do PLA e do PP na forma de *flakes* estão representadas nas Figuras 21 e 23, respectivamente.

**Figura 21.** Curvas de DRX do PLA não exposto e dos *flakes* expostos ao microrganismo

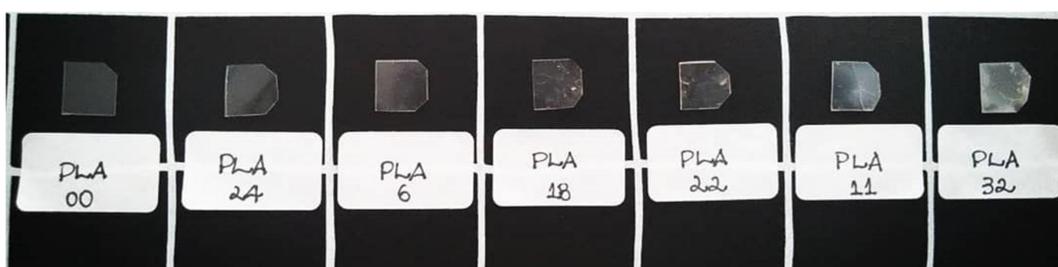


O resultado da análise por DRX para os *flakes* de PLA sem exposição aponta que este material apresenta natureza quase que completamente amorfa, apresentando picos de difração em 21° e 27°, mostrando que nesse caso o material é semicristalino. Quando o PLA apresenta uma cristalinidade considerável, o resultado de DRX apresenta um pico intenso em torno dos 20° (CARRASCO et al., 2010; BRITO et al., 2011).

Após a exposição, a intensidade das bandas aumenta com o tempo, indicando aumento na cristalinidade do polímero. Para os *flakes* expostos em 90 dias, pode ser observado um pico bem definido em 16,2° e 21°, e picos menores a 18,5°, 23° e 27°. Esses são os picos característicos da fase  $\alpha$  do PLA (PEREIRA; MORALES, 2014).

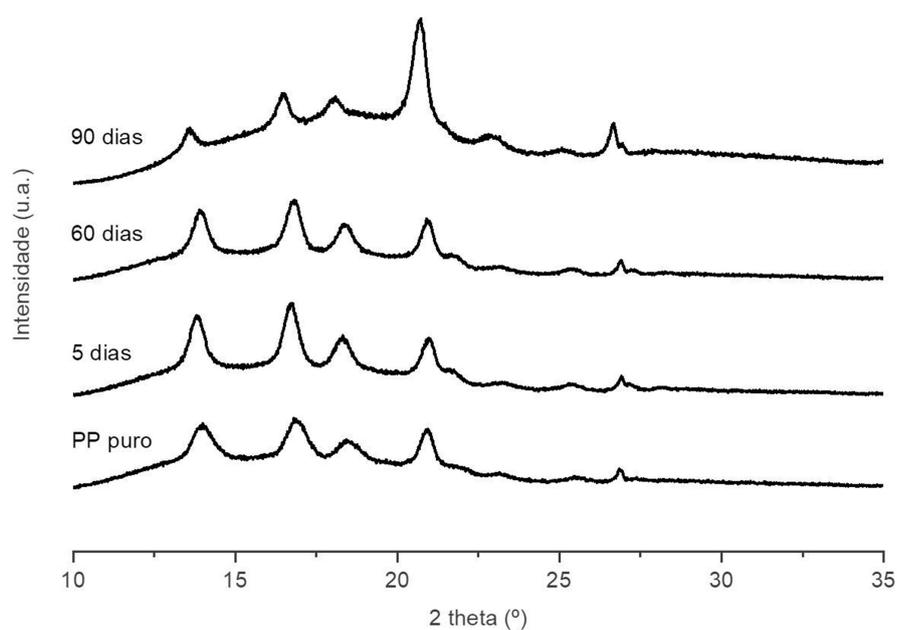
As modificações no estado cristalino dos polímeros também foram acompanhadas pela transparência dos *flakes*. A Figura 22 mostra o *flake* exposto em 90 dias, quase que completamente opaco. A exposição induziu a cristalização por nucleação do PLA, provavelmente devido a ação das enzimas.

**Figura 22.** Transparência dos *flakes* de PLA puro e com diferentes tempos de exposição (5, 10, 20, 30, 60 e 90 dias, da esquerda para direita)



A Figura 23 mostra as análises de DRX do PP não exposto e dos *flakes* expostos ao microrganismo.

**Figura 23.** Curvas de DRX do PP não exposto e dos *flakes* expostos ao microrganismo



O PP puro apresentou picos característicos de difração, sendo esses  $14^\circ$ ,  $17^\circ$ ,  $21^\circ$  e  $27^\circ$ , conforme também reportado na literatura (LÍBANO et al., 2012; BEZERRA et al., 2014).

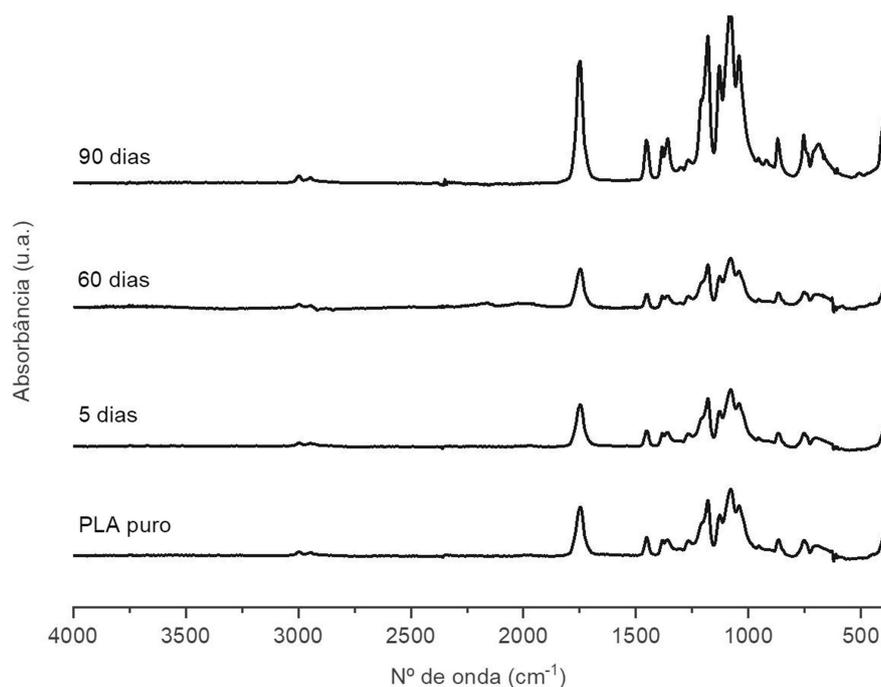
Para os *flakes* expostos em 90 dias, observa-se que ocorreu uma inversão na intensidade dos picos característicos, ou seja, os picos de  $14^\circ$  e  $17^\circ$  se tornaram menos intensos, porém o pico na faixa de  $21^\circ$  aumentou bastante sua intensidade.

Aparentemente, o tempo de exposição promoveu variações na cristalinidade do polímero.

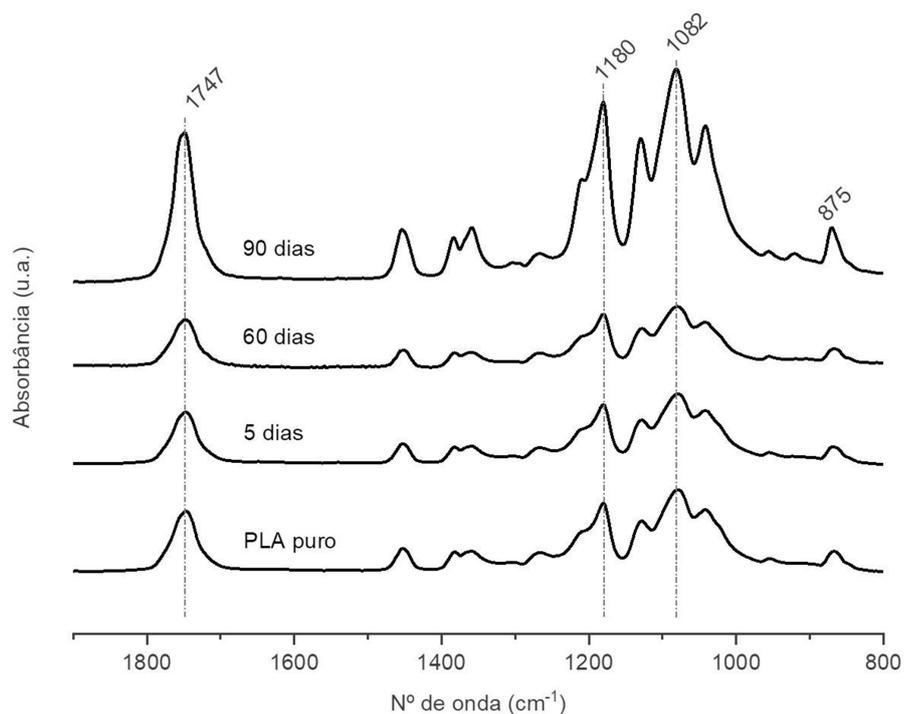
#### 5.4.3 Espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

Na Figura 24 são apresentados os espectros de FTIR do PLA não exposto e dos *flakes* expostos ao microrganismo em diferentes períodos de exposição.

**Figura 24.** Espectros de FTIR do (a) PLA não exposto e dos *flakes* expostos ao microrganismo, (b) PLA não exposto e *flakes* expostos, na região de absorção da carbonila (C=O) e da ligação C-O e (c) *flakes* expostos com 60 dias



(a)



(b)

Observa-se na Figura 24a que as bandas de absorção para o PLA não exposto estão de acordo com as bandas apresentadas na literatura (QIN et al., 2011; AURAS et al., 2011; CHOI et al., 2013; MELO et al., 2015). Nesta figura verifica-se bandas de absorção para o PLA puro a 1453, 2992 e 2946  $\text{cm}^{-1}$ , atribuídas ao estiramento assimétrico e simétrico da ligação C-H do grupo  $\text{CH}_3$ , a 1747  $\text{cm}^{-1}$  atribuída ao estiramento da carbonila (C=O) do grupo éster do PLA, a 1385 e 1364  $\text{cm}^{-1}$  atribuídas a flexão e deformação da ligação C-H, a 1180 e 1082  $\text{cm}^{-1}$  atribuídas ao estiramento da ligação C-O do C-O-C do PLA.

Na região próxima a 1700  $\text{cm}^{-1}$  destes espectros pode-se observar o aumento na absorção da banda correspondente ao estiramento da ligação C=O do grupo éster do PLA, em 1747  $\text{cm}^{-1}$ , com o aumento do tempo de degradação nos *flakes* analisados. A formação de grupos carbonílicos ocorre principalmente através da cisão- $\beta$  de radicais peroxílicos e alcoxílicos (FONSECA; ORÉFICE, 2014).

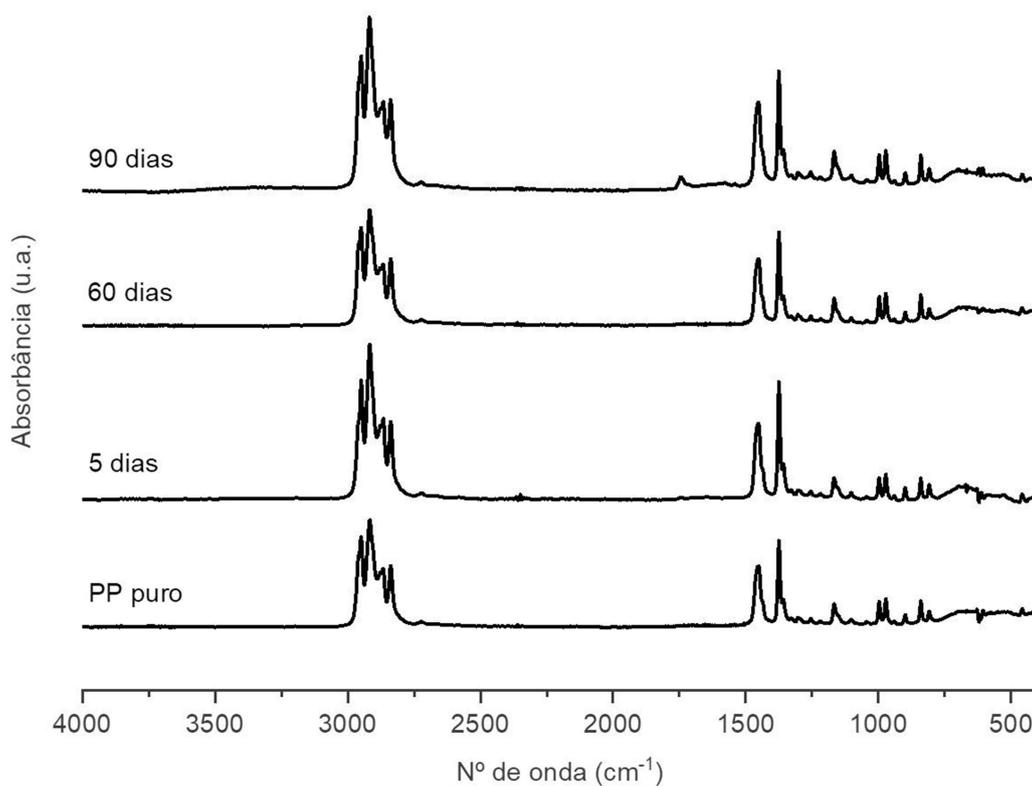
Muthukumar et al. (2010) analisando degradação de blendas poliolefinicas com amido e aditivos pró-oxidantes, observou que o aumento da intensidade das

bandas características dos grupos carbonila e ésteres indica que está ocorrendo modificações que envolvem oxidação.

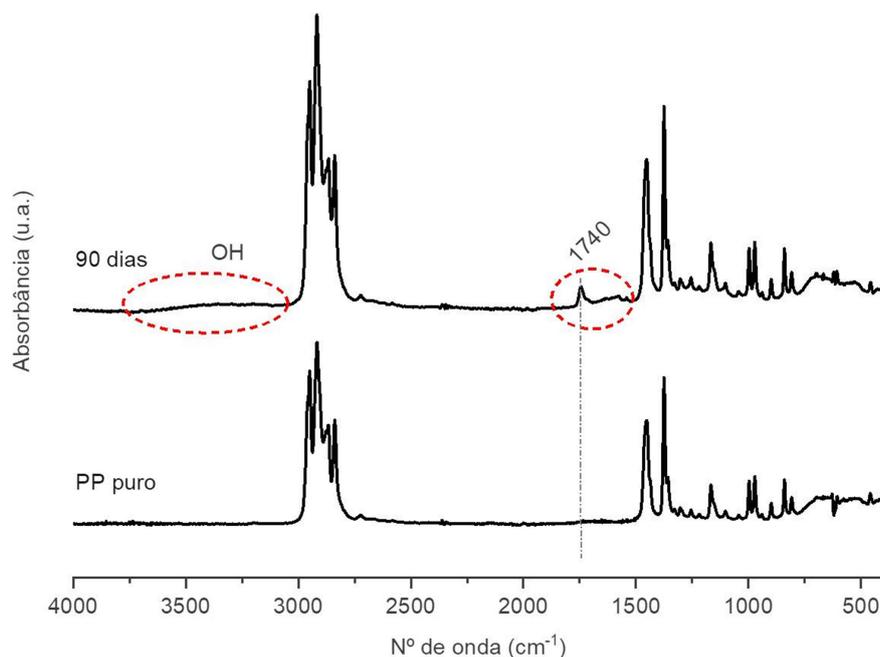
Na Figura 24b nota-se claramente que a intensidade das bandas atribuídas a ao estiramento da ligação C-C, em  $875\text{ cm}^{-1}$ , aumentam com o tempo de exposição.

Na Figura 25 tem-se os espectros no infravermelho do PP não exposto e dos *flakes* expostos ao microrganismo por diferentes períodos de exposição.

**Figura 25.** Espectros de FTIR do (a) PP não exposto e dos *flakes* expostos ao microrganismo por diferentes períodos de exposição e (b) PP não exposto e dos *flakes* expostos ao microrganismo por diferentes períodos de exposição, na região de absorção da carbonila (C=O) e da ligação C-O



(a)



(b)

Os espectros de FTIR dos *flakes* de PP Figura 25a exibe picos de absorção que corroboram com relatados na literatura (KERIM et al., 1985; CARVALHO et al., 2007; DA SILVA et al., 2016). Observa-se, independente do período de exposição, picos intensos na faixa de 3000–2795  $\text{cm}^{-1}$ , atribuídos aos modos de deformação axial assimétrica e simétrica do grupo  $\text{CH}_3$  e deformação axial simétrica do grupo  $\text{CH}_2$ . Os picos em torno de 1449 e 1377  $\text{cm}^{-1}$  estão associados a deformação angular do grupo  $\text{CH}_3$ . Em 1167  $\text{cm}^{-1}$  observa-se vibrações de estiramento C-C, e o pico de baixa intensidade em 846  $\text{cm}^{-1}$  corresponde à deformação angular do grupo C-H.

Para os *flakes* expostos, observa-se mudança na amplitude das bandas de absorção quando comparadas ao polímero puro. Com o aumento do tempo de exposição, observa-se um aumento significativo na intensidade das bandas do grupo  $\text{CH}_3$ .

De acordo com De Paoli (2009), modificações que envolvem oxidação aparecem no espectro de infravermelho como uma banda intensa, por volta de 1700  $\text{cm}^{-1}$  atribuída à vibração da ligação C=O de cetonas (estiramento). Nota-se que para o período de 90 dias, a vibração da ligação C=O atribuída ao estiramento de

grupos carbonílicos de produtos oxidados, aparece no espectro de infravermelho como uma banda intensa, por volta de  $1740\text{ cm}^{-1}$ , conforme indicado na Figura 19b. Nos espectros de infravermelho esses grupos localizam-se na faixa entre  $1800$  e  $1600\text{ cm}^{-1}$  (KHABBAZ; ALBERTSSON, 2001; PINHEIRO et al., 2006; DA SILVA et al., 2016).

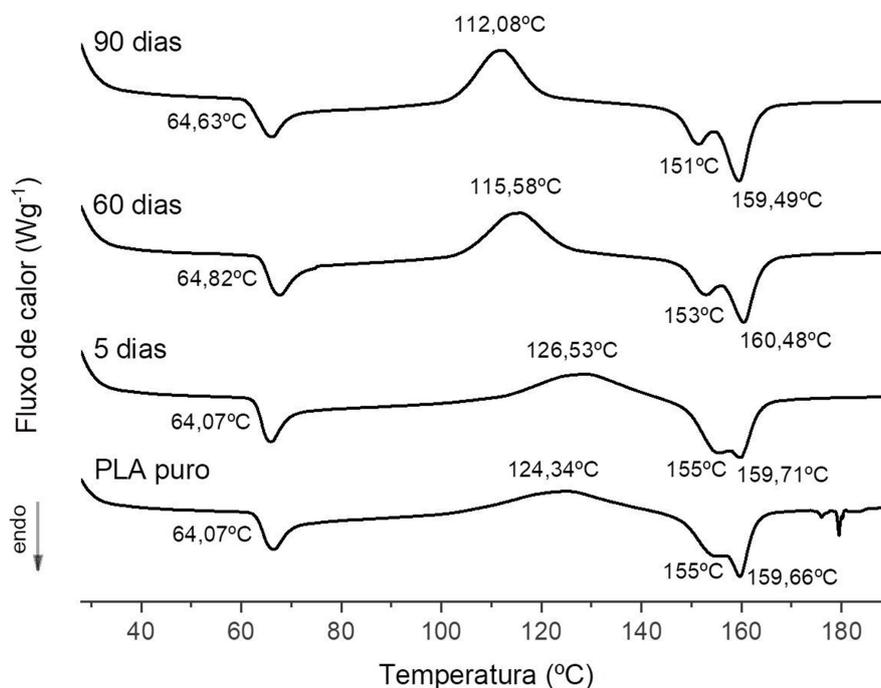
Como esta banda só aparece nas amostras expostas em 90 dias, é possível que a exposição ao microrganismo nesse período permitiu a formação de grupos oxidados a partir de reações de cisão de cadeia em consequência de alguma presença de oxigênio. Como subproduto dessas reações, tem-se a formação de grupos carbonila (C=O), principal grupo químico característico da degradação oxidativa do PP.

#### 5.4.4 Calorimetria exploratória diferencial (DSC)

O comportamento térmico dos polímeros foi avaliado por calorimetria exploratória diferencial (DSC), para a determinação da temperatura de fusão cristalina ( $T_m$ ) e do grau de cristalinidade ( $X_c$ ).

A Figura 26 apresenta as curvas DSC do PLA puro e dos *flakes* expostos ao microrganismo.

**Figura 26.** Curvas DSC para o PLA obtidas a  $10^{\circ}\text{C min}^{-1}$  com indicação das transições térmicas existentes



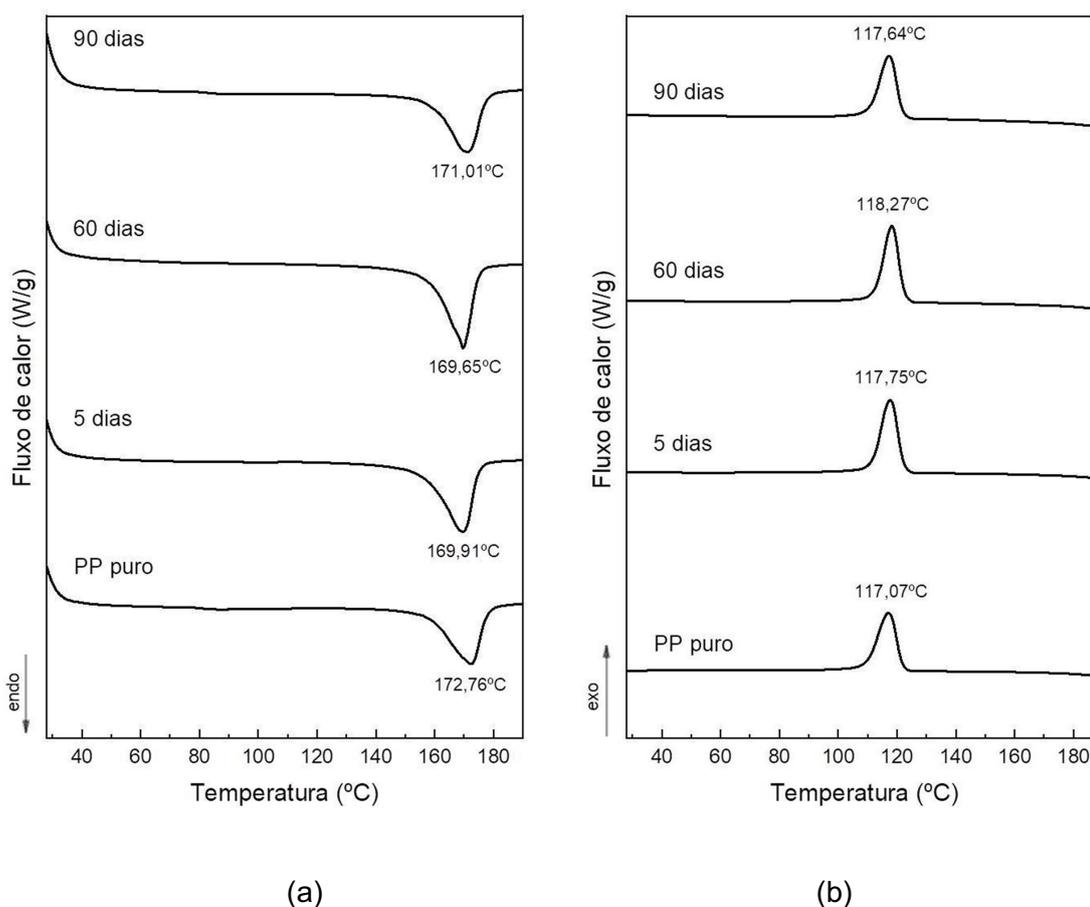
Um evento exotérmico foi observado nos *flakes* de PLA, atribuído a temperatura de cristalização a frio ( $T_{cc}$ ) do PLA, onde o polímero ganha calor sem mudar de fase, atingindo o seu limite de energia, durante a sua  $T_g$ . Com o aumento de temperatura, essa energia é liberada, ocorrendo uma reorganização em sua estrutura até o momento que ocorre um pico endotérmico, causado pela mudança de fase (fusão) do polímero (QIN et al., 2011).

Para o PLA puro, observa-se em torno de  $64^{\circ}\text{C}$  a temperatura de transição vítrea ( $T_g$ ) desse polímero e um evento exotérmico com máximo de  $124^{\circ}\text{C}$ , atribuído a temperatura de cristalização a frio ( $T_{cc}$ ). É observado um evento endotérmico caracterizado por um pico duplo com máximo em  $159,66^{\circ}\text{C}$ , referente à temperatura de fusão cristalina ( $T_m$ ) de diferentes estruturas cristalinas do PLA (SILVA, 2014; MELO, 2015). Durante o resfriamento, aparentemente não houve cristalização.

Percebe-se, que para 60 e 90 dias, os *flakes* têm sua  $T_{cc}$  deslocada para temperaturas menores em relação ao PLA puro, que pode ser resultado da maior mobilidade conferida as moléculas do PLA que facilitaram a cristalização.

As curvas de aquecimento e resfriamento do PP estão apresentadas na Figura 27.

**Figura 27.** Curvas DSC para o PP obtidas a  $10^{\circ}\text{C min}^{-1}$  (a) fluxo de calor endotérmico e (b) fluxo de calor exotérmico



Na Figura 27 observa-se os picos de (a) fusão e (b) cristalização do PP puro, onde a temperatura de fusão cristalina ( $T_m$ ) é de  $172,76^{\circ}\text{C}$ . A temperatura de cristalização ( $T_c$ ) é de  $117,07^{\circ}\text{C}$  (CANEVAROLO, 2006; REDDY et al., 2008; NASCIMENTO et al., 2013).

Analisando-se a temperatura de fusão do PP (Figura 27a) para os *flakes* nos diferentes tempos de exposição, percebe-se que praticamente não houve alteração

do seu pico ou temperatura (MINKOVA et al., 2002; KUSMONO et al., 2008; TABATABAEI et al., 2009; SALMORIA et al., 2009; BEZERRA, et al., 2014).

Observando-se as temperaturas de cristalização (Figura 27b), observa-se que praticamente também não houve alteração em relação ao pico característico do PP, mostrando que praticamente não houve alterações na estrutura cristalina dos componentes desse polímero.

Faria et al. (2015) nos testes de biodegradação de PP com o basidiomiceto *P. ortreatus*, observou que de 45 dias as amostras mostraram aumento no grau de cristalinidade para 35%, sugerindo degradação da fase amorfa do polímero.

A Tabela 4 apresenta os valores da temperatura de fusão cristalina ( $T_m$ ), da temperatura de cristalização ( $T_c$ ) e do grau de cristalinidade ( $X_c$ ) dos polímeros puros e dos polímeros após a exposição ao microrganismo.

Os resultados da Tabela 4 mostram que não ocorreram variações significativas na temperatura de fusão cristalina ( $T_m$ ) dos polímeros estudados em função da exposição biológica.

**Tabela 4.** Parâmetros de fusão e de cristalização dos polímeros PLA e PP

<b>Amostra/Tempo de exposição (em dias)</b>	<b><math>T_m</math> (°C)</b>	<b><math>T_c</math> (°C)</b>	<b><math>\Delta H_m</math> (J·g<sup>-1</sup>)</b>	<b><math>X_c</math> (%)</b>
PLA – 0 dias	159,66	124,34	16,78	17,9
PLA – 5 dias	159,71	126,53	19,80	21,1
PLA – 60 dias	160,48	115,58	20,54	21,9
PLA – 90 dias	159,49	112,08	22,29	23,8
PP – 0 dias	172,76	117,07	44,64	27,0
PP – 5 dias	169,91	117,75	52,49	31,8
PP – 60 dias	169,65	118,27	52,59	31,9
PP – 90 dias	171,01	117,64	53,79	32,6

$T_m$  = Temperatura do pico de fusão;  $T_c$  = Temperatura do pico de cristalização ( $T_{cc}$  a frio, para o PLA);  $\Delta H_f$  = Entalpia de fusão;  $X_c$  = Grau de cristalinidade,  $\Delta H_f/\Delta H_{f100} \times 100\%$ .  $\Delta H_{f100}$  = Entalpia de fusão do PLA e PP com 100% de cristalinidade, 93,7 e 165 J·g<sup>-1</sup>, respectivamente.

A Tabela 4 mostra que ocorreu um acréscimo do grau de cristalinidade com o tempo de exposição ao microrganismo, já que com o tempo há uma redução da

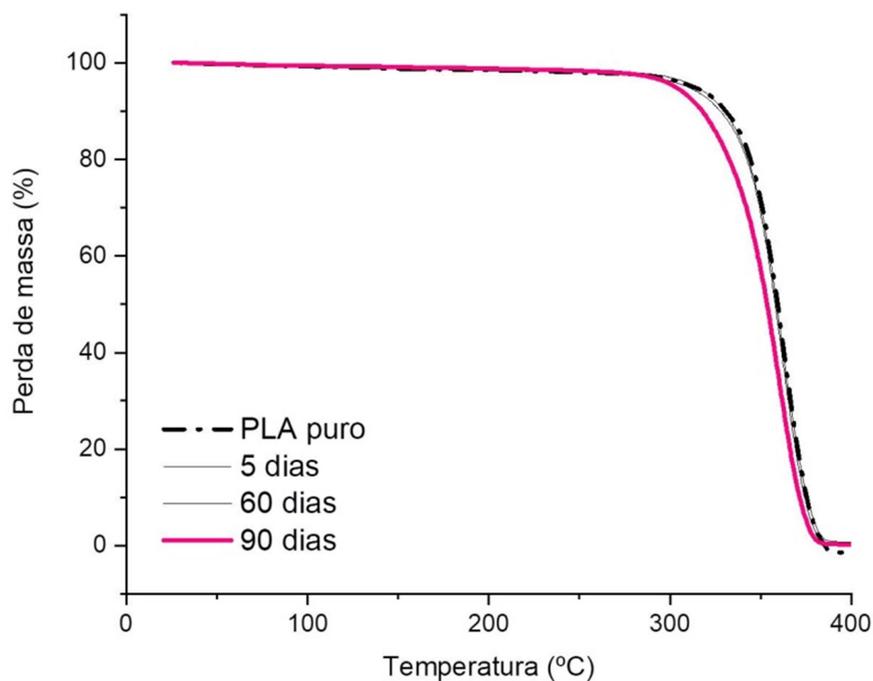
região amorfa e por consequência, o aumento na cristalinidade dos polímeros, provavelmente pela ação das enzimas. Segundo Faria et al. (2015), um indício de degradação do polímero é o aumento da entalpia de fusão com o aumento do tempo de biodegradação, e consequentemente o grau de cristalinidade também aumenta.

#### 5.4.5 Termogravimetria (TG)

As análises termogravimétricas (TG) dos polímeros mostraram que PP é mais estável termicamente que o PLA (Figuras 28 e 29), comportamento observado também por outros estudos, visto que o PP apresenta temperaturas de degradação mais elevadas do que aquelas produzidas pelo PLA, atribuído à configuração de sua cadeia.

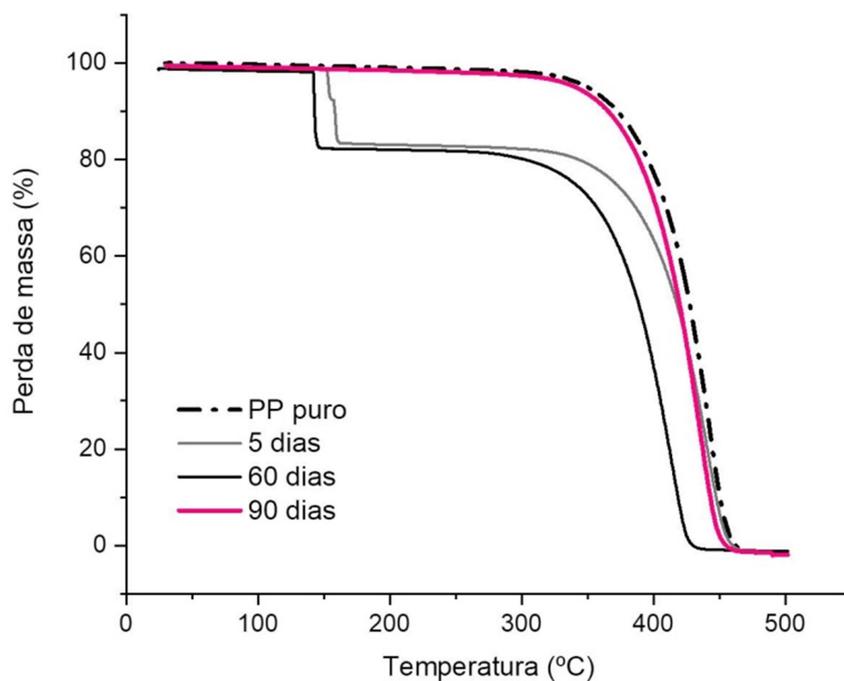
A Figura 28 exibe as curvas termogravimétricas para amostras de PLA submetidas a tempos de 0 a 90 dias de exposição ao microrganismo. Na análise, foi constatado que o PLA após a exposição, apresentou um único evento de perda de massa relativo à degradação das cadeias do PLA, com pico com temperatura onde a velocidade de degradação é máxima em 363°C e 99,9% de perda de massa, eventos que estão de acordo com estudos de Choudhary et al., (2011) e Menegotto (2014).

**Figura 28.** Curvas TG do PLA com variação do tempo de degradação obtidas a  $10^{\circ}\text{C min}^{-1}$  em atmosfera de  $\text{N}_2$



As curvas para o PP submetido a tempos de 0 a 90 dias de exposição ao microrganismo (Figura 29) apontou um único evento de perda de massa, relativo a degradação das cadeias do polímero. Após exposição em 90 dias, o PP apresentou pico com temperatura onde a velocidade de degradação é máxima em  $435^{\circ}\text{C}$  e **100%** de perda de massa, temperaturas também evidenciadas por Oliveira et al., (2013) e Menegotto (2014).

**Figura 29.** Curvas TG do PP com variação do tempo de degradação obtidas a  $10^{\circ}\text{C min}^{-1}$  em atmosfera de  $\text{N}_2$



As curvas TG/DTG exibem uma etapa de perda de massa em torno de  $150^{\circ}\text{C}$ , que pode ser relativa à quantidade de água absorvida pelas amostras. A degradação térmica do PP ocorre em uma faixa de temperatura de  $447^{\circ}\text{C}$ .

A Tabela 5 apresenta valores de TG das amostras de PLA e PP antes e após a exposição ao microrganismo. Os valores de TG apresentados são referentes à temperatura na qual ocorre a perda de 10% em massa das amostras ( $T_{10}$ ), temperatura onde ocorre perda de 50% ( $T_{50}$ ) e temperatura onde a perda é 90% ( $T_{90}$ ), referente a temperatura de degradação máxima.

**Tabela 5.** Resultados obtidos nas análises TG

<b>Amostra/Tempo de exposição (em dias)</b>	<b>T<sub>10</sub> (°C)</b>	<b>T<sub>50</sub> (°C)</b>	<b>T<sub>90</sub> (°C)</b>
PLA – 0 dias	331	360	375
PLA – 5 dias	330	359	375
PLA – 60 dias	328	357	373
PLA – 90 dias	319	354	371
PP – 0 dias	372	427	450
PP – 5 dias	158	419	448
PP – 60 dias	143	388	419
PP – 90 dias	366	420	443

Observa-se, na Tabela 5, que a exposição ao microrganismo promoveu diminuição na estabilidade térmica dos polímeros quando se usa a temperatura de degradação a perda em massa de 50% (T<sub>50</sub>) como parâmetro (FONSECA et al., 2014). Este comportamento foi observado também por outros estudos em sistemas parecidos.

Os resultados dos valores de variação de temperatura de degradação e pico para os polímeros são apresentados na Tabela 6.

**Tabela 6.** Valores de variação de temperatura, temperatura onde a velocidade de degradação é máxima para o PLA e PP

<b>Amostra/Tempo de exposição (em dias)</b>	<b>Varição de temperatura de degradação (°C)</b>	<b>T<sub>max</sub> (°C)</b>
PLA – 0 dias	287–393	367
PLA – 5 dias	281–393	366
PLA – 60 dias	276–391	366
PLA – 90 dias	270–387	364
PP – 0 dias	327–473	444
PP – 5 dias	-	-
PP – 60 dias	-	-
PP – 90 dias	321–467	435

## 6 CONCLUSÕES

- O substrato lignocelulósico utilizado como fonte de carbono e energia mostrou-se uma fonte alternativa para crescimento micelial em processo biotecnológico;
- *P. castanella* foi capaz de descolorir o corante RBBR durante a fermentação semissólida, sugerida pela ação das enzimas;
- A C/N influenciou a produção de enzimas ligninolíticas por *P. castanella*, induzindo a síntese de lacase e MnP e inibindo o crescimento micelial;
- Os resultados de MEV revelaram que houve mudanças significativas na morfologia dos polímeros, com colonização e formação do biofilme, apresentando estrutura com partículas cúbicas e na forma de "pequenas flores", dispersas sobre as superfícies;
- Os dados de DRX e DSC comprovam que houve aumento da cristalinidade dos polímeros, indicando uma redução da fase amorfa pelo microrganismo;
- As mudanças químicas observadas nas análises de FTIR comprovam a degradação oxidativa dos polímeros pela ação do mecanismo do basidiomiceto, pela retirada dos elétrons das cadeias e transferência para o sítio ativo da enzima;
- O fungo basidiomiceto *Psilocybe castanella* apresentou potencial para utilização como agente em processos de degradação biológica do PLA e PP;
- Os dados obtidos oferecem oportunidades significativas para o desenvolvimento de novas alternativas para degradação desses materiais, a partir de recursos renováveis como o resíduo do coco verde, que podem ser biodegradados ou reciclados, melhorando a sustentabilidade.

## REFERÊNCIAS

- ABNT – Associação Brasileira de Normas Técnicas. NBR ISO 10004:2004 - Resíduos sólidos – Classificação. 2004
- ABREU, P. M. S. Produção de enzimas lignocelulolíticas por fermentação em estado sólido de resíduos agroindustriais sob ação do fungo *Psilocybe castanella* CCIBT 2781. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Campina Grande (UFCG). Campina Grande, 2014.
- ABREU, P. M. S., CUNHA, L. R. de F., CONRADO, L. de S., COELHO, G. D., OLIVEIRA, B. F.; OLIVEIRA, R. C. Potencial biotecnológico de basidiomicetos na produção de enzimas para degradação de polipropileno (PP) de copos descartáveis. XX Simpósio Nacional de Bioprocessos/XI Simpósio de Hidrólise Enzimática de Biomassa. Fortaleza, Ceará, Brasil, 2015.
- ABRELPE. Associação Brasileira de Empresas de Limpeza Pública e Resíduos Especiais. Panorama dos Resíduos Sólidos no Brasil, 2017.
- ABUD, A. K. S.; ARAÚJO, M. L.; ALMEIDA, R. M. R. G. Uso do resíduo de laranja lima e da casca de coco verde na produção de enzimas. Scientia Plena, v. 11, n. 10, 2015.
- ACHILIAS, D. S.; ROUPAKIAS, C. P.; MEGALOKONOMOS, A. A.; LAPPAS, E. V.; ANTONAKOU. Chemical recycling of plastic wastes made from polyethylene (LDPE and HDPE) and polypropylene (PP). Journal of Hazardous Materials, v. 149 p. 536–542, 2007.
- AGUIAR, A.; FERRAZ, A. Mecanismos envolvidos na biodegradação de materiais lignocelulósicos e aplicações tecnológicas correlatas. Química Nova, v. 34, n. 10, p. 1729-1738, 2011. ISSN 01004042.
- ALBUQUERQUE, M. C. C.; RIBEIRO, C. M. S.; RABELO, C. R. K; SIQUEIRA, B. G.; MARINHA, A. B. A. S.; CASTRO, A. M. Quim. Nova, 37, 699, 2014.
- ALEXOPOULOS, C. J.; MIMS, C. W.; BLACKWELL, M. Introductory Mycology. John Wiley & Sons, INC, New York. 4th ed, 869p. 1996.

ARANTES, V.; MILAGRES, A., M. F. Relevância de compostos de baixa massa molar produzidos por fungos e envolvidos na biodegradação da madeira. *Química Nova*, v. 32, n. 6, p. 1586-1595, 2009. ISSN 0100-4042.

ARKATKAR, A.; ARUTCHELVI, J.; SUDHAKAR, M.; BHADURI, S.; UPPARA, P. V.; DOBLE, M. Approaches to enhance the biodegradation of polyolefins. *The Open Environmental Engineering Journal*, v. 2, p. 68-80, 2009.

ASTM: G22-76. American Society for testing and materials. Standard Practice for Determining Resistance of Plastics to Bacteria, 1996.

ASTM D5488-94de1. Standard Terminology of Environmental Labeling of Packaging Materials and Packages, 2002.

ASTM: D883-12. American Society for testing and materials. Standard terminology relating to plastics, 2012.

AURAS, R. A.; LIM, L.-T.; SELKE, S. E.; TSUJI, H. Poly(lactic acid): synthesis, structures, properties, processing, and applications. Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons; 2011.

AUSTIN, H. P.; ALLEN M. D., DONOHOE, B. S.; RORRER, N. A., KEARNS, F. L.; SILVEIRA, R. L.; POLLARD, B. C.; DOMINICK, G.; DUMAN, R.; OMARI, K. E.; MYKHAYLYK, V.; WAGNER, A.; MICHENER, W. E.; AMORE, A.; SKAF, M. S.; CROWLEY, M. F.; THORNE, A. W.; JOHNSON, C. W.; WOODCOCK, H. L.; MCGEEHAN, J. E.; BECKHAM, G. T. Characterization and engineering of a plastic-degrading aromatic polyesterase. *PNAS*. v. 115. n. 19, 2018.

BALLAMINUT, N.; MATHEUS, D. R. Characterization of fungal inoculum used in soil bioremediation. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 38, n. 2, p. 248-252, 2007. ISSN 1517-8382.

BALLAMINUT, N.; YAMANAKA, R.; MACHADO, K. M. G. Interference of a commercial catalase preparation in laccase and peroxidase activities. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, v. 52, n. 5, p. 1193-1198, 2009. ISSN 1516-8913.

BALLAMINUT, N.; MACHADO, K. M. G.; OLIVEIRA, L. H. dos S.; MATHEUS, D. R. Physiological Characterization of fungal inoculum for biotechnological remediation of soils. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, v. 57, n. 4, p. 561-570, 08/2014 2014. ISSN 1516-8913.

BALLAMINUT, N. Caracterização do processo de descoloração de corante reativo diazo por basidiomicetos tropicais. Tese (Doutorado). Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas. 2016.

BARBANTI, S. H.; ZAVAGLIA, C. A. C.; DUEK, E. A. R. Polímeros Bioreabsorvíveis na Engenharia de tecidos. *Polímeros*, v. 15, p. 13-21, 2005.

BEZERRA, E. B.; LEITE, A. M. D.; ARAÚJO, E. M.; MELO, T. J. A. Obtenção e Caracterização de Membranas Obtidas a partir de Blendas Poliméricas de Poliamida 6. *Polímeros*, vol. 24, n. 3, p. 381-387, 2014.

BIDLACK, J.; MALONE, M.; BENSON, R. Molecular Structure and Component Integration of Secondary Cell Walls in Plants. *Proceedings of the Oklahoma Academy of Science*, v. 72, p. 51-56, ISSN 0078-4303, 1992.

BILAL, M.; ASGHER, M.; IQBAL, H. M. N.; HU, H.; ZHANG, X. Biotransformation of Lignocellulosic Materials into Value-Added Products—A Review. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 98, p. 447-458, 2017.

BONOMO, R. P.; CENNAMO, G.; PURRELLO, R., SANTORO, A. M.; ZAPPALA, R. Comparison of three fungal laccases from *Rigidoporus lignosus* and *Pleurotus ostreatus*: correlation between conformation changes and catalytic activity. *Journal of Inorganic Biochemistry*. 83 (1): 67-75, 2001.

BOURBONNAIS, R.; PAICE M. G. Oxidation of nonphenolic substrates - an expanded role for laccase in lignin biodegradation. *Febs Letters*, 267(1): 99-102, 1990.

BRANDALISE, R. N. Avaliação da degradação biótica e abiótica da mistura polimérica de polietileno de alta densidade com o poli(álcool vinílico). Tese de doutorado. Programa de Pós-graduação em Engenharia de Minas, Metalúrgica e de Materiais, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre – RS, 2008.

BRANDUP, J.; IMNERGUT, E. H.; GRULKE, E. A. Polymer Handbook. 4. ed. Oxford: CRC Press. 1998.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução RDC nº 263 de 22 de setembro de 2005. Aprova o Regulamento Técnico para produtos de cereais, amidos, farinhas e farelos, constantes do anexo desta Portaria. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 23 set. 2005.

BRASKEM. “O plástico no planeta: o uso consciente torna o mundo mais sustentável”. 2012.

BRITO, G. F.; AGRAWAL, P.; ARAÚJO, E. M.; MÉLO, T. J. A. Biopolímeros, polímeros biodegradáveis e polímeros verdes. Revista Eletrônica de Materiais e Processos, v. 6.2, p. 127-139, 2011. ISSN 1809-8797.

BRITO, G. F.; AGRAWAL, P., ARAÚJO, E. M.; DE MÉLO, T. J. A. Polímeros, vol. 22, n. 5, p. 427-429, 2012.

CAÑAS, A. I.; CAMARERO, S. Laccases and their natural mediators: Biotechnological tools for sustainable eco-friendly processes. Biotechnology advances, v. 28, n. 6, p. 694-705. ISSN 0734-9750. 2010.

CANEVAROLO, S. V. Ciência dos Polímeros. 2. ed. São Paulo: Artliber, 2006.

CARDOSO, M. S.; GONÇALEZ, J. C. Aproveitamento da casca do coco-verde (*Cocos nucifera* L.) para produção de polpa celulósica. Ciência Florestal, Santa Maria, v. 26, n. 1, p. 321-330, 2016.

CARLSSON, D.; WILES, D. The photooxidative degradation of polypropylene. Part I. Photooxidation and photoinitiation processes. Journal of Macromolecular Science: Reviews in Macromolecular Chemistry, 14 (1), 65-106, 1976.

CARRASCO, F.; PAGÈSB, P.; GÁMEZ-PÉREZ, J.; SANTANA, O. O.; MASPOCH, M. L. Processing of poly(lactic acid): Characterization of chemical structure, thermal stability and mechanical properties. Polymer Degradation and Stability. Espanha, v. 95, n.2, p. 116-125, 2010.

CARRIJO, O. A.; LIZ, R. S.; MAKISHIMA, N. Fibra da casca do coco verde como substrato agrícola. Horticultura Brasileira, Brasília, v. 20, n. 4, p. 533-535, 2002.

CARVALHO, G. M.; MANSUR, H. S.; VASCONCELOS, W. L.; ORÉFICE, R. L. Obtenção de compósitos de resíduos de ardósia e polipropileno. *Polímeros Ciência e Tecnologia*, 17 (2), p. 98-103, 2007.

CHOUDHARY, P.; MOHANTY, S.; NAYAK, S.K; UNNIKRIHSHNAN, L. Poly(LLactide) Popypropylene Blends: Evaluation of mechanical, thermal, and morphological characteristics. *Journal of Applied Polymer Science*, v. 121, p. 3223-3237, 2011.

CHOI, K.-M.; CHOI, M.-C.; HAN, D.-H.; Park, T.-S.; HA, C.-S. Plasticization of poly (lactic acid)(PLA) through chemical grafting of poly (ethylene glycol) (PEG) via in situ reactive blending. *European Polymer Journal*, 49 (8), p. 2356-2364, 2013.

COELHO, G. D. Purificação parcial do sistema enzimático produzido por *Psilocybe castanella* CCB444 durante crescimento em solo. Tese de Doutorado. Instituto de Botânica da Secretaria do Meio Ambiente do Estado de São Paulo. São Paulo, 2007.

COELHO, G. D. et al. Produção de enzima celulolítica por fungo em fermentação semissólida utilizando resíduo de coco verde como substrato. II Encontro Nacional da Agroindústria - ENAG, Bananeiras, Paraíba. 2016.

COMPART, L. C. A. Suporte cerâmico para imobilização de basidiomicetos em biorremediação de solos. Dissertação de Mestrado. Engenharia de Materiais – UFOP – CETEC – UEMG, Belo Horizonte, 2004.

CONCEIÇÃO, M.; MANZATTO, C. V.; ARAUJO, W. S.; NETO, L. M.; SAAB, S. C.; CUNHA, T. J. F.; FREIXO, A. A. Estudo comparativo de métodos de determinação do teor de matéria orgânica em solos orgânicos do estado do Rio de Janeiro. *Embrapa Solos*, nº 3, p.1-5, 1999.

CORREIA, D.; ROSA, M. F.; NORÕES, E. R. V.; ARAÚJO, F. B. Uso do pó da casca de coco na formulação de substratos para formação de mudas enxertadas de cajueiro anão precoce. *Rev. Bras. Frutic.* v. 25, n. 3, p. 557-558, 2003.

COSTA, C. Z.; DE ALBUQUERQUE, M. de C. C.; BRUMB, M. C.; DE CASTRO, A. M. Degradação microbiológica e enzimática de polímeros: uma revisão. *Quim. Nova*, v. 38, n. 2, p. 259-267, 2015.

CUNHA, L. R. de F. Avaliação da biodegradação de copos descartáveis de polipropileno (PP) e produção de enzimas celulolíticas e ligninolíticas por *Psilocybe castanella* CCIBt 2781 na fermentação semissólida. Tese de Doutorado. Universidade Federal de Campina Grande (UFCG). Campina Grande, 2014.

DA LUZ, J. M. R.; PAES, S. A.; NUNES, M. D.; DA SILVA, M. de C. S.; KASUYA, M. C. M. Degradation of Oxo-Biodegradable Plastic by *Pleurotus ostreatus*. PLoS ONE 8(8): e69386. doi:10.1371/journal.pone.0069386, 2013.

DA LUZ, J. M. R.; PAES, S. A.; BAZZOLLI, D. M. S.; TÓTOLA, M. R.; DEMUNER, A. J.; KASUYA, M. C. M. Abiotic and Biotic Degradation of Oxo-Biodegradable Plastic Bags by *Pleurotus ostreatus*. PLoS ONE 9(11): e107438. doi:10.1371/journal.pone.0107438, 2014.

DA LUZ, J. M. R.; PAES, S. A.; RIBEIRO, K. V. G.; MENDES, I. R.; KASUYA, M. C. M. Degradation of Green Polyethylene by *Pleurotus ostreatus*. PLoS ONE 10(6): e0126047. doi:10.1371/journal.pone.0126047, 2015.

DA ROCHA, O. R. S.; DO NASCIMENTO, G. E.; CAMPOS, N. F.; DA SILVA, V. L.; DUARTE, M. M. M. B. Avaliação do processo adsorptivo utilizando mesocarpo de coco verde para remoção do corante cinza reativo BF-2R. Quim. Nova, v. 35, n. 7, p. 1369-1374, 2012.

DA SILVA, J. R. M. B.; NUNES, L. S. A.; RABELLO, M. S. Fotodegradação do polipropileno contendo combinação de fotoestabilizantes Revista Eletrônica de Materiais e Processos. v. 11, n. 2, 112–120, 2016. ISSN 1809-8797

DE MENEZES, C. R.; BARRETO, A. R. Biodegradação de resíduos lignocelulósicos por fungos basidiomicetos: Caracterização dos resíduos e estudo do complexo enzimático fúngico. Revista Eletrônica em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental. v. 19, n. 2, p. 1365-1391, 2015. e-ISSN 2236 1170

DE PAOLI, M. A. Degradação e Estabilização de Polímeros. Editora Artliber Publishers, São Paulo, 2009.

DOS SANTOS, M. C. L.; DIAS, S. L. F. G. Resíduos sólidos urbanos e seus impactos sócio ambientais. IEE-USP, São Paulo, 2012.

EICHLEROVA, I.; HOMOLKA, L.; LISA, L.; NERUD, F. Orange, G. and Remazol Brilliant Blue R decolorization by white rot fungi *Dichomitus squalens*, *Ischnoderma resinatum* and *Pleurotus calyptratus*. *Chemosphere* 60, 398–404. 2005.

ERKURT, E. A., UNYAYAR, A.; KUMBUR, H. Decolorization of synthetic dyes by white rot fungi, involving laccase enzyme in the process. *Process Biochem* 42, 1429–1435. 2007.

EICHLEROVÁ, I.; HOMOLKA, L.; LISA, L.; NERUD, F. Orange, G. and Remazol Brilliant Blue R decolorization by white rot fungi *Dichomitus squalens*, *Ischnoderma resinatum* and *Pleurotus calyptratus*. *Chemosphere* 60, 398–404. 2005.

ERKURT, E. A., UNYAYAR, A.; KUMBUR, H. Decolorization of synthetic dyes by white rot fungi, involving laccase enzyme in the process. *Process Biochem* 42, 1429–1435. 2007.

FARIA, P. C.; WISBECK, E.; DIAS, L. P. Biodegradação de polipropileno reciclado (ppr) e de poli (tereftalato de etileno) reciclado (petr) por *Pleurotus ostreatus*. *Revista Matéria*, v. 20, n. 2, p. 452–459, 2015.

FECHINE, G. J. M. A era dos polímeros biodegradáveis. *Revista Plástico Moderno*, v. 423, p. 28-38, 2010.

FLEMMING, H. C. Relevance of biofilms for the biodeterioration of surfaces of polymeric materials. *Polymer Degradation and Stability*, v. 59, n. 1, p. 309-315, 1998.

FLEMMING, H.-C.; WINGENDER, J. The biofilm matrix. *Nature Reviews Microbiology*, v. 8, n. 9, p. 623-633, 2010.

FONSECA, F. M. C.; ORÉFICE, R. L. Efeito da incorporação de nanopartículas de TiO<sub>2</sub> na estrutura e propriedades de blendas de polipropileno e poli(hidroxibutirato) submetidas a testes de envelhecimento acelerado. *Polímeros*, v. 24, n. 3, p. 395-401, 2014.

FRAGOEIRO, S.; MAGAN, N. Enzymatic activity, osmotic stress and degradation of pesticide mixtures in soil extract liquid broth inoculated with *Phanerochaete chrysosporium* and *Trametes versicolor*. *Environmental Microbiology*. 7 (3): 348. 2005.

FREIRE, D. L. C.; MÁS, B. A.; MESSIAS, A. D.; ARAGONES, A.; BARBO, M. L. P.; DUEK, E. A. R. In: 6th Congresso Latino Americano de Órgãos Artificiais e Biomateriais, Gramado. Anais: Fundação de Apoio da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, p.97, 2010.

FREIRE, B.; COELHO, G. D.; CUNHA, L. R. de F.; OLIVEIRA, L. de S. C.; ABREU, P. M. S.; CASEMIRO, R. Produção de enzimas lignocelulolíticas por fermentação em estado sólido de resíduos agroindustriais sob ação de fungo basidiomiceto. XX Congresso Brasileiro de Engenharia Química, 2014.

GHAFFARI MOSANENZADEH, S.; NAGUIB, H. E.; PARK, C. B.; N.; J. Polym. Sci. Part B: Polym. Sci. 52, 1002, 2014.

GIANNETTI, A. A. M.; AGNELLI, J. A. M.; LANÇAS, B.; MAGNABOSCO, R.; CASARIN, S. A.; BETTINI, S. H. P. Lignin as additive in polypropylene/coir composites: Thermal, mechanical and morphological properties, Carbohydrate Polymers, 87, 2563-2568, 2012.

GILAN, I.; HADAR, Y.; SERIAN, A. Colonization, biofilm formation and biodegradation of polyethylene by a strain of *Rhodococcus ruber*. Applied Microbiology and Biotechnology, v. 65, p. 97-104, 2004.

GOMES, T. C. de A.; MOURA e SILVA, J. A.; DA SILVA, M. S. L. *Preparo de composto orgânico na pequena propriedade rural*. (Instruções Técnicas da Embrapa Semi-Árido, 53), 2001.

GU, J. D. Microbial deterioration and degradation of polymeric materials. in: Review (Ed). The uhlig corrosion handbook, 2nd, Edition, Wiley, New York, p. 439-460, 2000.

GUGLIOTTA, A. M.; CAPELARI, M. Taxonomia de basidiomicetos. In: Bononi, V.L.R. (Org.). Zigomicetos, Basidiomicetos e Deuteromicetos: noções básicas de taxonomia e aplicações biotecnológicas, Instituto de Botânica, São Paulo, 184 p. 1998.

HADAD, D.; GERESH, S.; SIVAN, A. Biodegradation of polyethylene by the thermophilic bacterium *Brevibacillus borstelensis*. Journal of Applied Microbiology, v. 98, p. 1093-1100, 2005.

HAKULINEN, N.; ROUVINEN, J. Three-dimensional structures of laccases. *Cell. Mol. Life Sci.* 72, 857–868, 2015.

HARPER, H. A.; RODWELL, V. W.; MAYES, P. A. *Manual de Química Fisiológica*. 5 ed. 736 p. 1982.

HERNANDEZ-APAOLAZA, I.; GASCO, A. M.; GASCO, J. M. & GUERRIERO, F. Reuse of waste materials as growing media for ornamental plants. *Bioresource Technology*, 96, 125-131, 2005.

HUANG, S. J.; EDELMAN, P. G.; *Degradable Polymers: Principles and Applications*, SCOTT, G.; GILEAD, D., eds.; CHAPMAN & HALL: London, 1995.

IBGE. Produção agrícola municipal (PAM) – Culturas temporárias e permanentes.

Disponível em:

[https://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/66/pam\\_2016\\_v43\\_br.pdf](https://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/66/pam_2016_v43_br.pdf).

Acesso em 29 de junho de 2018.

IPEA. Instituto de Pesquisas Econômicas, acesso em Julho de 2018.

KARAMANLIOGLU, M.; PREZIOSI, R.; ROBSON, G. D. Abiotic and biotic environmental degradation of the bioplastic polymer poly(lactic acid): A review. *Polymer Degradation and Stability*. 137, p. 122-130, 2017.

KERIM, A. F. M.; ELAGRAMI, A. M.; EL-KALLA, E. H. Study of the effect of gamma radiation on the IR spectra of polypropylene. *Isotopenpraxis*, 21, p. 23-25, 1985.

KHABBAZ, F.; ALBERTSSON, A.-C. Rapid test methods for analyzing degradable polyolefins with a pro-oxidant system. *Journal of Applied Polymer Science*, 79 (12), p. 2309-2316, 2001.

KHAN, S. A.; WONG, K. C.; GORGA, R. E. Structure, molecular orientation, and resultant mechanical properties in core/ sheath poly(lactic acid)/polypropylene composites. *Polymer*, v. 53, p. 791-800, 2012.

KIEHL, E. J. *Fertilizantes orgânicos*. São Paulo: Ed. Agronômica Ceres. 492 p., 1985.

KIM, D. Y.; RHEE, Y. H. *Microbiol. Biotechnol.* 61, 300–308. 2003.

KUNAMMENI, A., PLOU, F., BALLESTEROS, A.; ALCALDE, M. Laccases and Their Applications: A Patent Review. *Recent Pat. Biotechnol.* 2, 10–24, 2008.

KUSMONO, M. I.; CHOW, Z. A.; TAKEICHI, W. S.; ROCHMADI, T. *Eur. Polym. J.*, 44, p. 1023, 2008. <http://dx.doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2008.01.019>.

KUWAHARA, M., GLENN, J. K., MORGAN, M. A. Separation and characterization of two extracellular H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-dependent oxidases from ligninolytic cultures of *Phanerochaete chrysosporium*. *FEBS Letters*, 169: 247-250, 1984.

LAZAREVIC, D.; AOUSTINA, E.; BUCLET, N.; BRANDT, N. Plastic waste management in the context of a European recycling society: Comparing results and uncertainties in a life cycle perspective. *Resources, Conservation and Recycling*, v. 55 p. 246–259, 2010.

LEE, S. Y.; CHOI, J. Effect of fermentation performance on the economics of poly(3-hydroxybutyrate) production by *Alcaligenes latus*. *Polymer Degradation and Stability*. v. 59, p. 387-393, 1998.

LEE, H.; KO, G. Effect of metformin on metabolic improvement and gut microbiota. *Appl. Environ. Microbiol.* V.80, p. 5935–5943, 2014.

LÍBANO, E. V. D. G.; VISCONTE, L. L. Y.; PACHECO, É. B. A. V. Propriedades térmicas de compósitos de polipropileno e bentonita organofílica. *Polímeros*, v. 22, n. 5, p. 430-435, 2012.

LIMA, E. B. C.; SOUSA, C. N. S.; MENESES, L. N.; XIMENES, N. C.; JÚNIOR, M. A. S.; VASCONCELOS, G. S.; LIMA, N. B. C.; PATROCÍNIO, M. C. A.; MACEDO, D.; VASCONCELOS, S. M. M. *Cocos nucifera* (L.) (Arecaceae): A phytochemical and pharmacological review. *Braz J Med Biol Res.* 48(11): 953–964. 2015.

MACHADO, K.M.G. Biodegradação de pentaclofenol por fungos basidiomicetos lignocelulolíticos em solo contaminado com resíduos industriais. Tese de Doutorado, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 172 p. 1998.

MACHADO, K. M. G., MATHEUS, D. R., ROSIM MONTEIRO, R. T.; RAMOS BONONI, V. L. Biodegradation of pentachlorophenol by tropical basidiomycetes in

soils contaminated with industrial residues. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **21**, 297–301, 2005.

MANAVALAN, T.; MANAVALAN, A.; HEESE, K. Characterization of Lignocellulolytic Enzymes from White-Rot Fungi. *Current Microbiology.* 70: 485–498, 2015.

MARIN, E.; BRICEÑO, M. I.; CABELLERO-GEORGE, C.; *Int. J. Nanomed.* 8, 3071, 2013.

MATHEUS, D. R.; BONONI, V. L. R.; MACHADO, K. M. G. Biodegradation of hexachlorobenzene by basidiomycetes in soil contaminated with industrial residues. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **16**, 415–421, 2000.

MATHEUS, D. R. *et al.* GROWING BASIDIOMYCETES IN BIOREACTORS TO BE APPLIED TO. in *In Situ and On-Site Bioremediation—2003. Proceedings of the Seventh International In Situ and On-Site Bioremediation Symposium* (ed. MAGAR, V. S. ; KELLEY, M. E.), 2003.

MELO, T. J. A.; ARAÚJO, J. P. de; AGRAWAL, P. Blendas PLA/PEgAA: Avaliação da reatividade entre os polímeros e da concentração de PEgAA nas propriedades e na morfologia. *Revista Eletrônica de Materiais e Processos*, v. 10, n. 3, p. 118–127, 2015. ISSN 1809-8797

MENEGOTTO, M. Avaliação da degradação biótica do poli(ácido láctico), do polipropileno e suas misturas pela ação de fungos basidiomicetos. Dissertação de Mestrado. Universidade de Caxias do Sul, Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Processos e Tecnologia, 2014.

MENEZES, F. P.; BEVILACQUA, C. B.; SULZBACHER, M. A.; ANTONIOLLI, Z. I.; JACQUES, R. J. S. Capacidade dos fungos lignocelulolíticos em degradar polímeros de lodo de esgoto. *Revista de Ciências Agrárias*, 40(3): 515-524. 2017

*Ministério do Meio Ambiente*, Governo Federal. LEI Nº 12.305/2010 - Institui a Política Nacional de Resíduos Sólidos; altera a Lei no 9.605, de 12 de fevereiro de 1998; e dá outras providências.

MINKOVA, L.; YORDANOV, H. R.; FILIPPI, S. *Polymer*, 43, p. 6195, 2002. [http://dx.doi.org/10.1016/S0032-3861\(02\)00532-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0032-3861(02)00532-3)

MOIN, S.; OMAR, M. Laccase enzymes: purification, structure to catalysis and tailoring. *Protein Pept. Lett.* 21, 707–713, 2013.

MORAIS, J. P. S.; ROSA, M. de F.; MARCONCINI, J. M. *Procedimentos para Análise Lignocelulósica*. 54 p. (Embrapa Algodão/Documentos, 236). 2010.

MOREIRA NETO, S. L. Enzimas ligninolíticas produzidas por *Psilocybe castanella* CCB444 em solo contaminado com hexaclorobenzeno. Dissertação de Mestrado. Instituto de Botânica de São Paulo. São Paulo, 2006.

MOREIRA NETO, S. L.; MATHEUS, D. R.; MACHADO, K. M. G. Influence of pH on the growth, laccase activity and rbbf decolorization by tropical basidiomycetes. v. 52, n. 5, p. 1075-1082, 2009. ISSN 1516-8913

MOREIRA NETO, S. L. et al. Decolorization of salt-alkaline effluent with industrial reactive dyes by laccase-producing basidiomycetes strains. *Letters in Applied Microbiology*, v. 56, n. 4, p. 283-290, 2013. ISSN 0266-8254.

MUTHUKUMAR, T.; ARAVINTHAN, A.; MUKESH, D. *Polym. Degrad. Stab.*, 95, p.1988, 2010. <http://dx.doi.org/10.1016/j.polymdegradstab.2010.07.017>

NAÇÕES UNIDAS. Disponível em: <https://nacoesunidas.org/mundo-esta-sendo-inundado-por-lixo-plastico-diz-secretario-geral-da-onu/>. Acesso em Junho de 2018. --  
-----Disponível em:

<http://www.un.org/documents/ga/res/42/ares42-187.htm>. Acesso em Junho de 2018.

NASCIMENTO, W. A.; LIMA, J. C. C.; AGRAWAL, P.; LIRA, H. L.; DE MÉLO, T. J. A. Blendas de PP/PA6: efeito da concentração de PA6 e compatibilizantes reativos nas propriedades mecânicas, térmicas e morfológicas. *Revista Eletrônica de Materiais e Processos /ISSN 1809-8797/ v. 8.3, p. 155 – 162, 2013.*

NATTA, G.; PINO, P.; MAZZANTI, G.; GUANNINI, U.; MANTICA, E.; PERALDO, M. The nature of some soluble catalysts for low pressure ethylene polymerization. *Journal of Polymer Science*. v. 26, p. 120-123, 1957.

OGEDA, T. L.; PETRI, D. F. S. HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE BIOMASSA. *Química Nova*, v. 33, n. 7, p. 1549-1558, 2010.

PALMIERI, G., CENNAMO, G. AND SANNIA, G. Remazol Brilliant Blue R decolourisation by the fungus *Pleurotus ostreatus* and its oxidative enzymatic system. *Enzyme Microb Technol* 36, 17–24. 2005.

PANAITESCU, D. M.; VULUGA, Z.; GHIUREA, M.; IORGA, M.; NICOLAE, C.; GABOR, R. Influence of compatibilizing system on morphology, thermal and mechanical properties of high flow polypropylene reinforced with short hemp fibers. *Composites. Part B, Engineering*, 69, 286-295, 2015.

PEDRA, W. N.; MARINO, R. H. Cultivo axênico de *Pleurotus spp.* em serragem da casca de coco (*Cocos nucifera* Linn.) suplementada com farelo de arroz e/ou de trigo. *Arq. Inst. Biol.*, São Paulo, v.73, n.2, p.219-225. 2006.

PEREIRA, R. B.; MORALES, A. R. Estudo do Comportamento Térmico e Mecânico do PLA Modificado com Aditivo Nucleante e Modificador de Impacto. *Polímeros*, vol. 24, n. 2, p. 198-202, 2014.

PINHEIRO, L. A.; BITENCOURT, C. S.; PESSAN, L. A.; CANEVAROLO, S. V. Morphological parameters of PP/PA6 blend measured in-line during extrusion. *Macromolecular Symposia*, 245 (1), p. 347-354, 2006.

POLAK, J.; JAROSZ-WILKOLAZKA, A. Fungal laccases as green catalysts for dye synthesis. *Process Biochemistry*, v. 47, n. 9, p. 1295-1307, 2012. ISSN 1359-5113.

QIN, L.; QIU, J.; LIU, M.; DING, D.; SHAO, L.; LÜ, S.; ZHANG, G.; ZHAO, Y.; FU, X. Mechanical and thermal properties of poly(lactic acid) composites with rice straw fiber modified by poly(butyl acrylate). *Chemical Engineering Journal*, v.166, p.772-778, 2011.

RABEK, J. F. *Polymer photodegradation: mechanisms and experimental methods*. Springer Science & Business Media; 2012.

RAGHAVAN, D. *Polym. Plast. Technol. Eng.*, 42 (1), p. 41-63, 1995.

REDDY, N.; NAMA, D.; YANG, Y. Polylactic acid/polypropylene polyblend fibers for better resistance to degradation. *Polymer Degradation and Stability*, v.93, p.33-241, 2008.

REYES, L. J. Estudo de degradação de polietileno tereftalato (PET) por fungos basidiomicetos ligninolíticos. Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual de Campinas. Brasil, 2003.

RIGO, A. A.; DAHMER, A. M.; STEFFENS, C.; STEFFENS, J.; CARRÃO-PANIZZI, M. C.; LEITE, R. S.; MANDARINO, J. M. G.; CEZARO, A. M. Obtenção e caracterização de farinhas de soja de variedades geneticamente melhoradas para alimentação humana. XI COBEQ IC. Unicamp, Campinas, São Paulo, 2015.

RODRÍGUEZ-COUTO, S. Laccases for Denim Bleaching: An Eco-Friendly Alternative. *Open Text. J.* 5, 1–7, 2012.

RODRÍGUEZ-DELGADO, M.; ORNELAS-SOTO, N. Green Technologies and Environmental Sustainability. Laccases: A Blue Enzyme for Greener Alternative Technologies in the Detection and Treatment of Emerging Pollutants. p. 45-65. 2017.

ROSA, M. de F.; SANTOS, F. J. de S.; MONTENEGRO, A. A. T.; ABREU, F. A. P. de; CORREIA, D; ARAÚJO, F. B. S. de; NORÕES, E. R. de V. Caracterização do pó da casca de coco verde usado como substrato agrícola. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2001. 6 p. (Comunicado Técnico, 54)

ROSA, M. de F.; BEZERRA, F. C.; CORREIA, D.; SANTOS, F. J. DE S.; ABREU, F. A. P. de; FURTADO, A. A. L.; BRÍGIDO, A. K. L.; NORÕES, E. R. DE V. Utilização da casca de coco como substrato agrícola. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2002. 24 p. (Documentos, 52)

SALMORIA, G. V.; LEITE, J. L.; PAGGI, R. A. *Polym. Test.*, 28, p. 746, 2009. <http://dx.doi.org/10.1016/j.polymertesting.2009.06.010>.

SALVI, M. B. de. Otimização de biorremediação de solo contaminado com organoclorados utilizando basidiomicetos em biorreatores. Tese (Doutorado) - Instituto de Botânica da Secretaria de Estado do Meio Ambiente, São Paulo. 2013.

SATTI, S. M.; SHAH, A. A.; MARSH, T. L.; AURAS, R. Biodegradation of Poly(lactic acid) in Soil Microcosms at Ambient Temperature: Evaluation of Natural Attenuation, Bio-augmentation and Bio-stimulation. *Journal of Polymers and the Environment*. 2018. <https://doi.org/10.1007/s10924-018-1264-x>

SCOTT, G. Degradable polymers: principles and applications, vol 2. Springer Science & Business Media; 2013.

SHAH, A. A.; HASAN, F.; HAMEED, A.; AHMED, S.; Biotechnol. Adv. 26, 246, 2008.

SILVA, H. H. B. Biodegradação de 2,4-diclorofenol por *Pleurotus ostreatus* DSM 1833, Dissertação de Mestrado. Programa de Mestrado em Saúde e Meio Ambiente, Universidade da Região de Joinville, Brasil, 2005.

SILVA, R. R. da. Biorremediação de solos contaminados com organoclorados por fungos basidiomicetos em biorreatores. Tese de Doutorado. Instituto de Botânica de São Paulo. São Paulo, 2009.

SILVA, M. C. DE OLIVEIRA, S. V.; ARAÚJO, E. M. Propriedades mecânicas e térmicas de sistemas de PLA e PBAT/PLA. Revista Eletrônica de Materiais e Processos, v. 9, n. 2, p. 112–117, 2014.

SILVA, A. C. da. Reaproveitamento da casca de coco verde. Revista Monografias Ambientais - REMOA v. 13, n. 5, p. 4077-4086, 2014.

SILVA, L. H.; COSTA, P. F. P.; NOMIYAMA, G. W.; SOUZA, I. P.; CHANG, Y. K. Caracterização físico-química e tecnológica da farinha de soja integral fermentada com *Aspergillus oryzae*. Campinas, v. 15, n. 4, p. 300-306, 2012.

SILVA, M. A., SILVA, K. K. S.; COELHO, G. D. Biotechnological potential of the use of green coconut bagasse in the production of lacase by *Lentinus crinitus* CCIBT2611. XXI Simpósio Nacional de Bioprocessos/XII Simpósio de Hidrólise Enzimática de Biomassa. Aracaju, Sergipe, Brasil, 2017.

SINGH, R. L.; SINGH, P. K.; SINGH, R. P. Enzymatic decolorization and degradation of azo dyes – a review. International Biodeterioration and Biodegradation, v. 104, p. 21-31, 2015. ISSN 0964-8305.

SKORONSKI, E.; FERNANDES, M.; JÚNIOR, A. F.; SOARES, C. H. L.; JOÃO, J. J. Imobilização de lacase de *Aspergillus* sp. em quitosana e sua aplicação na bioconversão de fenóis em reatores de leito fixo. Quim. Nova 37, p. 215–220, 2014.

SUDHAKAR, M.; DOBLE, M.; SRIYUTHA, M.P.; VENKATESAN, R. Marine microbe mediated biodegradation of low and high density polyethylenes. *International Biodeterioration & Biodegradation*, v. 61, p. 203-213, 2008.

TABATABAEI, S. H.; CARREAU, P. J.; AJJI, A. J. *Memb. Sci.*, 345, p. 148, 2009. <http://dx.doi.org/10.1016/j.memsci.2009.08.038>.

TAPPI - Technical Association of the Pulp and Paper Industry. TAPPI. T 203 cm-99. Alpha-, beta- and gamma-cellulose in pulp. 2009, 7 p.

-----TAPPI. T 204 om-97. Solvent extractives of wood and pulp. 1997, 4 p.

-----TAPPI. T 211 om-02. Ash in wood, pulp, paper and paperboard: combustion at 525°C. 2002b, 5 p.

-----TAPPI. T 222 om-02. Acid-insoluble lignin in wood and pulp. 2002c, 5 p.

-----TAPPI. T 413 om-93. Ash in wood, pulp, paper and paperboard: combustion at 900°C. 1993, 4 p.

-----TAPPI. T 421 om-02. Moisture in pulp, paper and paperboard. 2002a, 3 p.

TEIXEIRA, B. F.; SCARPELIN, C., DE ASSIS, T. R.; CRUZ, S. H. Produção de enzimas lignolíticas por fungos utilizando resíduos agroindustriais. XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática (ENZITEC), 2016.

TOKIWA, Y.; CALABIA, B. P.; UGWU, C. U.; AIBA, S. Biodegradability of Plastics – Review. *Int. J. Mol. Sci.* 2009, 10, 3722-3742. doi:10.3390/ijms10093722

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

VILAPLANA, F.; STRÖMBERG, E.; KARLSSON, S. Environmental and resource aspects of sustainable biocomposites. *Polymer Degradation and Stability*. v. 95, p. 2147-2161, 2010.

WESSELS, J. G. H. 1994. Development regulation of fungal cell wall formation. *Annual Review Phytopathology*. 32: 413-437. *apud* Pessoni, R. 2002. Isolamento e caracterização de enzimas extracelulares e de parede celular do fungo *Penicillium*

*janczzewskii*, crescido em diferentes fontes de carbono. Tese de Doutorado, Universidade de São Paulo, São Paulo, 163 p.

WISBECK, E.; DAMBRÓS, P.; CAPPELARI, K. P.; POFFO, C. Avaliação da biodegradação de polímeros por *Pleurotus djamor*. Revista Brasileira de Ciências Ambientais. n. 31. ISSN Impresso 1808-4524/ISSN Eletrônico: 2176-9478. 2014.

WONG, D. W. S. Structure and action mechanism of ligninolytic enzymes. Applied Biochemistry and Biotechnology, 157: 174-209 p. 2009.

YAMANAKA, R.; MACHADO, K. M. G. Influência do corante Azul Brillhante de Remazol R sobre o sistema enzimático ligninolítico de *Psilocybe castanella* CCB444 em meio de cultivo sintético. Revista Brasileira de Biociências, Porto Alegre, v. 5, supl. 2, p. 1119-1121, jul. 2007.

YOSHIDA, S.; HIRAGA, K.; TAKEHANA, T., TANIGUCHI, I., YAMAJI, H.; MAEDA, Y.; TOYOHARA, K.; MIYAMOTO, K.; KIMURA, Y.; ODA, K. A bacterium that degrades and assimilates poly(ethylene terephthalate). Science 2016, v. 351, 1196-1199, 2016.

YOSHIDA, S.; HIRAGA, K.; TAKEHANA, T., TANIGUCHI, I., YAMAJI, H.; MAEDA, Y.; TOYOHARA, K.; MIYAMOTO, K.; KIMURA, Y.; ODA, K. Response to Comment on "A bacterium that degrades and assimilates poly(ethylene terephthalate)". Science 2016, v. 353, 759, 2016.

ZENKIEWICZ, M.; RICHERT, A.; MALINOWSKI, R.; MORACZEWSKI, K. A Comparative analysis of mass losses of some aliphatic polyester upon enzymatic degradation. Journal Polymer Testing, v. 32, p. 209–214, 2013.

## **ANEXO A – Procedimentos para a caracterização do substrato**

### Determinação do teor de umidade

A umidade dos materiais foi determinada a partir da média da diferença de massa entre a amostra úmida e a seca, segundo método da norma TAPPI T 421 om-02 (2002). A secagem foi realizada sob temperatura de 105°C em estufa, com as amostras acondicionadas em cadinhos previamente tarados. Após 24 horas, os cadinhos foram colocados em dessecador até atingirem a temperatura ambiente e em seguida pesados em balança analítica da marca Shimadzu, modelo Ay220 (LEB/UFCG).

### Determinação do teor de cinzas

O teor de cinzas foi determinado pela razão entre a massa do resíduo após calcinação e a massa inicial segundo método da norma TAPPI T 211 om-02 (2002). Colocou-se 2 g do material em cadinhos tarados e secos a 105°C por 2 horas. Os cadinhos foram colocados em mufla a 600°C até que restassem apenas cinzas brancas. Após esfriamento em dessecador, os cadinhos foram pesados novamente em balança analítica da marca Shimadzu, modelo Ay220 (LEB/UFCG).

## Determinação de carbono orgânico total

A determinação de carbono orgânico foi realizada segundo EMBRAPA, descrita por Conceição et al., (1999), utilizando-se a seguinte Equação 7:

$$\%CO = \frac{\%MO}{f}$$

Onde,  $f$  é o fator de conversão de matéria orgânica em C total, face ao conceito de que o teor de C da matéria orgânica do solo é igual a 58%, sendo então igual a 1,724

% MO, o teor de matéria orgânica, determinado por:

$$\% MO = \frac{(M1 - M2)}{M1} \times 100$$

Onde, M1 = %U = amostra úmida (g)

M2 = %C = massa após queima a 550°C (g)

## Determinação de nitrogênio total

A determinação do nitrogênio total foi realizada conforme adequação da metodologia descrita por Kiehl (1985), pelo método de Kjeldahl, com adaptações, onde foi realizada a digestão ácida da amostra, na presença de catalisadores, seguida de destilação, em meio alcalino, do sulfato de amônio formado.

Em tubos de digestão, adicionou-se 0,2 gramas das amostras, 50 mg de sulfato de sódio, 7 a 10 gotas de sulfato de cobre a 5% e 5 mL de ácido sulfúrico PA. Os tubos foram levados para um bloco de digestão e aquecidos lentamente até o máximo de 400°C. Nos primeiros 15 minutos de reação, as amostras ficaram claras e transparentes, escurecendo em seguida e voltando a clarear quando a temperatura atingir os 400°C.

Aqueceu-se o sistema de destilação até aproximadamente 100°C. Um frasco erlenmeyer de 250 mL, contendo 25 mL do ácido bórico a 4% e 3 gotas do indicador misto (verde de bromo cresol (0,5%) + vermelho de metila (0,1%)), diluídos em etanol (70%). Adicionou-se 3 gotas de fenolftaleína 1% ao tubo contendo a amostra digerida e este foi acoplado à entrada do destilador, onde se juntou 15 mL de NaOH (40%) ou até que ocorresse a neutralização do ácido (mudança da cor para marrom). A amostra foi destilada até que a amônia destilada fosse transferida para a solução receptora de ácido bórico, triplicando o seu volume. Após a destilação, a amostra foi titulada com HCl padronizado até o ponto de viragem do indicador.

## Extrativos

O teor de extrativos foi determinado segundo método da norma TAPPI T 204 om-97 (1997).

A determinação do teor de extrativos presentes no resíduo é determinado empregando um aparelho de *Soxhlet*, sendo utilizados 5 g de amostra e 200 mL de etanol-ciclohexano a uma proporção 1:1 (v·v<sup>-1</sup>). As partículas devem ser acondicionadas em um cartucho confeccionado com papel de filtro e colocadas dentro do *Soxhlet*. O solvente é colocado em um balão de 250 mL, de massa seca conhecida, e o material deverá ser extraído por 6 horas. Após o banho, o material é levado à estufa até atingir massa constante. Por diferença de massa, obtém-se o valor de extrativos em gramas e dividindo-se pela massa da amostra analisada, obtém-se o teor de extrativos em percentual.

## Lignina

A determinação de lignina foi feita segundo método da norma TAPPI T 222 om-02 (2002).

Pesa-se 1,0 g da amostra, sendo envolto em papel de filtro e deixado num sistema de banho, utilizando ciclo-propano e álcool etílico, por aproximadamente 6 horas. Em seguida, os resíduos deverão ser secos em estufa durante 24 horas. Das amostras lavadas e secas, pesa-se 2 g e põe em um erlenmeyer de 250 mL, adicionando 15 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (72%), mantendo-o sob agitação durante 2 horas.

Após esse tempo a pasta negra é transferida quantitativamente para um balão volumétrico de 1 litro de um sistema de refluxo, utilizando 560 mL de água destilada e deixando refluxar por 4 horas. A lignina insolúvel (L<sub>I</sub>) é filtrada empregando um cadinho de *Gush*, com kitassato, acoplado a uma bomba de vácuo, sendo posteriormente seca e pesada. A lignina solúvel (L<sub>S</sub>) é determinada medindo-se a absorbância nos comprimentos de onda de 280 e 215 nm do filtrado e o cálculo é feito com base na equação:

$$L_I(g/L) = \frac{4,53 (abs_{215\text{ nm}} - abs_{245\text{ nm}})}{300}$$

O teor de lignina total nas amostras analisadas é determinado pela soma da lignina insolúvel, após transformação de unidade de concentração para unidade de massa, e lignina solúvel, como mostrado na equação:

$$L_T(g) = L_I + L_S$$

## Determinação de Holocelulose

Em um erlenmeyer de 500 mL, adiciona-se cerca de 3 g do material vegetal, sem extrativos, e com seu conteúdo de holocelulose a ser determinado. A seguir, adiciona-se 120 mL de água destilada. Em uma capela de exaustão, prepara-se um banho-maria (ou manta elétrica) que mantenha a temperatura constante a  $70 \pm 2^\circ\text{C}$ . Ao erlenmeyer, acrescenta-se 2,5 g de clorito de sódio ( $\text{NaClO}_2$ ), com pureza aproximada de 80%, e 1 mL de ácido acético glacial, com pureza  $\geq 99,85\%$ . O conjunto erlenmeyer-reagentes é tampado e mergulhado no banho, aquecido por uma hora e mantido sobre um agitador magnético ligado.

Após esse tempo, adiciona-se 2,5 g de clorito de sódio e 1 mL de ácido acético, e deixa-se por mais uma hora. Em seguida, adiciona-se 2,5 g de clorito de sódio e 1 mL de ácido acético, e prossegue-se com o aquecimento em banho por mais três horas. Ao longo do aquecimento, ocorre a elevação de cloro, como pode ser notado pela formação de um gás amarelo-esverdeado dentro do erlenmeyer.

Durante as cinco horas de aquecimento e degradação oxidativa da lignina, é providenciado gelo e água gelada suficientes para a realização de um banho de gelo, que cubra até além da altura do conteúdo do erlenmeyer. O recipiente permanece nesse banho de gelo por 30 minutos.

Prepara-se a aparelhagem de filtração na capela de exaustão. A massa do funil de vidro sinterizado é medida e o funil, colocado sobre um kitassato de 1 L, usando-se um conector. Por fim, conecta-se uma bomba de vácuo ao kitassato para iniciar a filtração.

O conteúdo do balão é transferido para o funil, com uma agitação constante para evitar a perda de precipitado no interior do funil. Com água destilada, lava-se o erlenmeyer e transfere-se o conteúdo para o funil, tanto para não ocorrerem perdas de holocelulose, quanto para lavar o material recolhido. O precipitado recolhido no funil é enxaguado até que o filtrado tenha um pH próximo ao da água utilizada. Verificando-se a proximidade da neutralidade, faz-se uma lavagem com um pequeno volume, cerca de 10 mL a 20 mL de acetona ou de metanol, seguida de mais um enxague com bastante água destilada.

O funil, então, é levado para uma estufa a 105°C e seco até adquirir massa constante. Apesar das variações que ocorrem para diferentes materiais, pode-se indicar um tempo de 18 horas como um parâmetro inicial para a secagem, e, a partir dele, realizar adaptações de metodologia. Após a secagem, leva-se o conjunto funil-holocelulose ao dessecador por pelo menos 30 minutos, até atingir a temperatura ambiente, e mede-se a massa do funil somada à massa de holocelulose, em uma balança analítica.

Com base na massa do funil limpo e seco (MF); na massa da amostra (MA); e na massa do funil somada à massa de holocelulose, após a secagem em estufa (MFH), pode-se calcular o teor de holocelulose (TH%), conforme a equação:

$$\% TH = \frac{MFH - MF}{MA} \times 100$$

## Determinação de Alfacelulose

A determinação de alfacelulose foi feita segundo método da norma TAPPI T 203 om-99 (1999).

Pesa-se cerca de 1,0 g da holocelulose seca obtida, colocando-se em um almofariz, à temperatura ambiente. Adiciona-se 15 mL de uma solução de NaOH a 17,5%, aguarda dois minutos de contato entre a solução e a celulose, e, então, começa-se a triturar o material por oito minutos. Terminado esse tempo, adiciona-se 40 mL de água destilada ao almofariz e transfere o conteúdo, quantitativamente, para o funil.

O conteúdo do almofariz é transferido para o funil com uma agitação constante, para evitar a perda de precipitado no interior do instrumental. Lava-se bem o almofariz com água destilada, transferindo-se para o funil. O precipitado recolhido no funil é enxaguado até que o filtrado tenha um pH próximo ao da água utilizada.

O funil é levado a estufa a 105°C e seco até adquirir massa constante. Após a secagem, coloca-se o conjunto funil-holocelulose em um dessecador, por pelo menos 30 minutos, para atingir a temperatura ambiente e mede-se a massa do funil somada à massa de alfacelulose, em uma balança analítica.

Com base na massa do funil limpo e seco (MF); na massa da amostra de holocelulose (MAH); e na massa do funil somada à massa de alfacelulose, após a secagem em estufa (MFA), pode-se calcular o teor de alfacelulose (TA%), conforme a equação:

$$\% TA = \frac{MFA - MF}{MAH} \times 100$$

Conhecendo-se os valores de holocelulose e de alfacelulose, pode-se então, por meio do cálculo da diferença, determinar o teor de hemicelulose.

**APÊNDICE A – Resultados obtidos no processo de produção de ligninases com resíduo de coco verde****Tabela 7.** Resultados do estudo das atividades de lacase na determinação do pH ótimo

Ensaio	pH	Lacase (UL <sup>-1</sup> )	Atividade Residual (%)
1	3,6	53,47	50,61
2	4,8	105,66	100,0
3	7,0	28,1	26,59
4	9,0	2,43	2,30

**Tabela 8.** Resultados do estudo das atividades de MnP na determinação do pH ótimo

Ensaio	pH	MnP (UL <sup>-1</sup> )	Atividade Residual (%)
1	3,6	1,68	11,31
2	4,8	14,87	100,0
3	7,0	0	0
4	9,0	0	0

**Tabela 9.** Resultados do estudo das atividades de lacase na determinação da T ótima

Ensaio	Temperatura (°C)	Lacase (UL <sup>-1</sup> )	Atividade Residual (%)
1	25	105,66	64,50
2	50	151,08	92,22
3	60	163,82	100,0
4	70	34,20	20,88

**Tabela 10.** Resultados do estudo das atividades de MnP na determinação da T ótima

Ensaio	Temperatura (°C)	MnP (UL <sup>-1</sup> )	Atividade Residual (%)
1	25	14,87	22,26
2	50	63,66	95,34
3	60	66,78	100,0
4	70	59,30	88,81