

**UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM PROCESSOS QUÍMICOS
E BIOTECNOLÓGICOS-PPGQB**

LUIA FRANCISCO SAGGIN

**ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE MICRORGANISMOS
DO SOLO DEGRADADORES DE POLIETILENO**

DISSERTAÇÃO

TOLEDO, PARANÁ

2024

LUISA FRANCISCO SAGGIN

**ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE MICRORGANISMOS
DO SOLO DEGRADADORES DE POLIETILENO**

Isolation and characterization of soil microorganism's degraders of polyethylene

Dissertação apresentada como requisito para obtenção do título de Mestre em Processos Químicos e Biotecnológicos, do Programa de Pós-Graduação em Processos Químicos e Biotecnológicos, da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR).

Orientador: Prof. Dr. Cleverson Busso

TOLEDO, PARANÁ

2024



4.0 Internacional

Esta licença permite remixe, adaptação e criação a partir do trabalho, mesmo para fins comerciais, desde que sejam atribuídos créditos ao(s) autor(es) e que licenciem as novas criações sob termos idênticos. Conteúdos elaborados por terceiros, citados e referenciados nesta obra não são cobertos pela licença.



**Ministério da Educação
Universidade Tecnológica Federal do Paraná
Campus Toledo**



LUISA FRANCISCO SAGGIN

**ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE MICRORGANISMOS DO SOLO DEGRADADORES DE
POLIETILENO**

Trabalho de pesquisa de mestrado apresentado como requisito para obtenção do título de Mestre Em Processos Químicos E Biotecnológicos da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR). Área de concentração: Processos Químicos E Biotecnológicos.

Data de aprovação: 30 de Setembro de 2024

Dr. Cleverson Busso, Doutorado - Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Dra. Silvia Jaerger, Doutorado - Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Dr. Thiago Cintra Maniglia, Doutorado - Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Documento gerado pelo Sistema Acadêmico da UTFPR a partir dos dados da Ata de Defesa em 30/09/2024.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço aos meus pais, Geni e Olívio, aos quais sou grata por todo apoio, carinho e dedicação, além de estarem comigo durante mais essa etapa em minha vida. Que me incentivaram a trilhar, essa minha caminhada até o mestrado, além de me auxiliar nos momentos das dificuldades, dos desafios e problemas que surgiram ao longo dessa pesquisa.

Acrescento a esses agradecimentos, a todos os professores do programa de mestrado PPGQB e também aos de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, especialmente aqueles que trabalham nos laboratórios de pesquisa, que nas longas peregrinações, não faltaram em dividir e auxiliar ideias, em busca de contornar erros que surgiam, ou ideias a acrescentar. Além disso, acrescento meus agradecimentos ao Prof.Dr.Luis Felipe Minozzo Figueiredo, que durante os estágios em docência, repassou todo seu conhecimento, dinâmica e prática, nessa jornada e ao Prof.Dr.Thiago Cintra Maniglia, que me auxiliou nas determinações e identificações que meu trabalho exigiu.

Somo a minha gratidão, ao meu orientador, Prof.Dr.Cleverson Busso, que de último momento aceitou acolher minha pesquisa, após minha orientadora Prof^a. Dr. Gracinda Marina Castello, nos deixar após falecer em um grave acidente de avião. Ficam nesses agradecimentos, o meu pesar e um enorme abraço a família da professora, que me incentivou a levar essa pesquisa a frente, sempre com muita determinação e coragem aos desafios que surgiram.

Agradeço aos professores Prof.Dr.Thiago Cintra Maniglia, Prof^a.Dr.Sílvia Jaeger que participaram da banca, pelas correções, considerações e direcionamentos que contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho.

Também incluo, nesses autos, o meu agradecimento ao Laboratório da Central Analítica (LABCA) da Universidade Tecnológica Federal do Paraná do Campus Toledo-Paraná, pelas contribuições quanto as análises realizadas.

Agradeço também a CAPES, "Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001", pelo financiamento de minha pesquisa.

*"I'm alone, on my own, and that's all I know
I'll be strong, I'll be wrong, oh, but life goes on
Oh, I'm just a girl trying to find a place in this world
Maybe I'm just a girl on a mission
But I'm ready to fly"
(Taylor Swift)*

RESUMO

FRANCISCO SAGGIN, LUISA. **Isolamento e caracterização de microrganismos do solo degradadores de polietileno**. 2024. 58 f. Dissertação (Mestrado em Processos Químicos e Biotecnológicos) – Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Toledo, 2024.

O polietileno é um dos materiais plásticos com maior produção comercial. Na sua família, o PEBD (Polietileno de baixa densidade), representa 60% da produção total de sacolas plásticas, principal componente dos resíduos sólidos urbanos. Tendo em vista o exposto, e a esses materiais possuem um tempo de longa vida extenso, o trabalho busca encontrar possíveis degradadores e rastrear isolados bacterianos indígenas com potencial de quebrar essas moléculas, através estado do Paraná. O processo para o isolamento de microrganismos, iniciou-se por meio da seleção de um ponto de coleta em relação ao tempo de exposição do solo, com os materiais despejados. Em seguida, no laboratório, realizou-se uma diluição seriada em solução salina 0,9% (p/v), seguida de um Pour plate. Por conseguinte, as colônias foram aplicadas em Meio Mínimo, contendo 1 g de Polietileno em pó. Após o crescimento das amostra, os meios foram corados com mistura de 0,1% (p/v) Azul de Comassie R-250, 40% (v/v) de metanol e 10% (v/v) de Ácido acético, obtendo-se três possíveis degradadores: A.R.B, B.D.A e T.B.I que apresentaram halos no entorno de suas colônias, fator positivo a degradação de polietileno. Por meio de uma segunda metodologia, utilizando-se de meio líquido mineral e pedaços de PEBD (2 cm), as 3 amostras foram expostas a um processo de estudo, novamente quanto a suas degradações, no qual através de análises no FTIR, buscou-se observar mudanças conformacionais em suas estruturas químicas, através do aparecimento de bandas características. Por fim, realizou-se uma coloração de gram nas amostras dos isolados positivos e logo em seguida, foi realizado o sequenciamento das estruturas do DNA amplificado, no qual determinou-se a espécie dos organismos positivos a degradação, no qual podem ser designados por: *Paenibacillus alvei* para B.D.A e *Rhodanobacter spathiphylli* para A.R.B. Quanto a amostra T.B.I, durante o sequenciamento denotou-se, o aparecimento de duas bandas de leitura, inferindo um consórcio de dois microrganismos, para análise e comprovação do observado foi necessário realizar um isolamento da amostra, no qual identificou-se o crescimento conjunto de duas espécies distintas. Com os resultados obtidos, este trabalho destaca que os isolados bacterianos encontrados, podem contribuir ativamente para a biodegradação de polietileno e serem uma opção para esse processo degradativo.

Palavras-chaves: Bioprospecção, solo, polímeros.

ABSTRACT

FRANCISCO SAGGIN, LUISA. **Isolation and characterization of soil microorganisms degrading polyethylene.** 2024. 58 f. Dissertation (Master in Chemical and Biotechnological Processes)-Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Toledo, 2024.

Polyethylene is one of the plastic materials with the highest commercial production. In its family, LDPE (low density polyethylene) represents 60% of the total production of plastic bags, the main component of municipal solid waste. Considering the above, and these materials have a long life time extended, the work seeks to find possible degraders and track indigenous bacterial isolates with potential to break down these molecules through the state of Paraná. The process for the isolation of microorganisms, was started by selecting a collection point in relation to the time of exposure of the soil, with the materials poured. Then, in the laboratory, a serial dilution was carried out in saline 0.9% (w/v), followed by a Pour plate. Therefore, the colonies were applied in Minimum Medium, containing 1 g of polyethylene powder. After sample growth, the media were stained with a mixture of 0.1% (w/v) Coomassie R-250 Blue, 40% (v/v) methanol and 10% (v/v) acetic acid, obtaining three possible degraders: A.R.B, B.D.A and T.B.I that presented halos in the environment of their colonies, positive factor to the degradation of polyethylene. By a second methodology, using mineral liquid medium and pieces of LDPE (2 cm), the 3 samples were exposed to a study process, again regarding their degradations, in which through analysis in the FTIR, we sought to observe conformational changes in their chemical structures, through the appearance of characteristic bands. Finally, a gram staining was performed in the samples of positive isolates and soon after, the sequencing of amplified DNA structures was carried out, in which the species of the positive organisms to degradation was determined, in which they can be designated as: *Paenibacillus alvei* for B.D.A and *Rhodanobacter spathiphylli* for A.R.B. As for the sample T.B.I, during sequencing it was noted that two reading bands appeared, inferring a consórcio of two microorganisms, for analysis and verification of the observed was necessary to perform an isolation of the sample, in which it was identified the joint growth of two distinct species. With the results obtained, this work highlights that bacterial isolates found, can actively contribute to the biodegradation of polyethylene and be an option for this degradative process.

Keyword: Bioprospecting, soil, polymers

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Representação estrutural da modificação da dupla ligação do butileno-1 e butileno-2	17
Figura 2 – Representação esquemática dos mecanismos de degradação de plásticos	21
Figura 3 – Mecanismos de auto-oxidação	23
Figura 4 – Etapas da biodegradação biológica	24
Figura 5 – Localização do aterro sanitário da cidade de Toledo-PR	30
Figura 6 – Metodologia utilizada para obtenção de colônias presentes no solo .	31
Figura 7 – Técnica de pour-plate	32
Figura 8 – Técnica de isolamento	32
Figura 9 – Metodologia para coloração das placas e análise dos halos de cultivo	33
Figura 10 – Metodologia para estudo da ação dos microrganismos em PEBD, através de meio líquido	34
Figura 11 – Equipamento utilizado para as análises Análise por Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)	35
Figura 12 – Etapas da coloração de Gram	36
Figura 13 – Placas contendo os microrganismos resultantes das diluições de 10^{-2} e 10^{-3}	39
Figura 14 – Placas contendo os microrganismos isolados nas diluições de 10^{-2} e 10^{-3}	40
Figura 15 – Placas de microrganismos isolados, que apresentaram resultados positivos para degradação de polietileno, através da formação de halos	42
Figura 16 – Microscopias ópticas em objetiva de 100x dos esfregaços, realizados após coloração de gram, das amostras que obtiveram crescimento positivo em meio com pó de polietileno	44
Figura 17 – Eletroforese após a realização da PCR nas amostras de A.R.G, B.D.A e T.B.I	44
Figura 18 – Placas de isolamento contendo isolados extraídos da amostra T.B.I .	45
Figura 19 – FTIR correspondentes aos três microrganismos positivos a degradação de polietileno	48

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Polímeros selecionados que se encontram na classificação de adição de hidrocarbonetos	18
Tabela 2 – Exemplos de polímeros de condensação	19
Tabela 3 – Escala de comprimento de onda para o espectro de luz visível e UV, energia da luz correspondente a quanta (ev) e energias de dissociação de ligação $\frac{kcal}{mol}$	22
Tabela 4 – Microrganismos degradadores de polietileno na literatura.	27
Tabela 5 – Resultados apresentados quanto aos onze isolados e após a geração de halos em meio específico com pó de polietileno (0.94 g/mL a 25°C).	41
Tabela 6 – Medidas dos halos em meio sólidos contendo PEG 4000 e pó de Polietileno	41
Tabela 7 – Microrganismos identificados após realização da PCR	45
Tabela 8 – Posição dos picos alongados correspondentes aos grupos metil e metileno	46

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

PEBD	Polietileno de baixa densidade
LDPE	Low Density Polyethylene
PEG	Polietilenoglicol
UV	Ultravioleta
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
DNA	Ácido desoxirribonucleico
FTIR	Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier
FE-SEM	Microscópio eletrônico de varredura
CO ₂	Dióxido de carbono
CH ₄	Metano
H ₂ S	Sulfeto de hidrogênio
H ₂ O	Água
K ₂ HPO ₄	Fosfato de potássio dibásico
KH ₂ PO ₄	Fosfato de potássio monobásico
MgSO ₄ *7H ₂ O	Sulfato de magnésio
NH ₄ NO ₃	Nitrato de amônio
NaCl	Cloreto de sódio
FeSO ₄ *7H ₂ O	Sulfato de ferro II
ZnSO ₄ *7H ₂ O	Sulfato de zinco heptaidratado
MnSO ₄	Sulfato de magnésio
μL	Microlitros
°C	Graus Celsius
NCBI	National Center for Biotechnology Information
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
2.1	INTRODUÇÃO A HISTÓRIA DOS POLÍMEROS SINTÉTICOS	15
2.2	POLÍMEROS COMO MATERIAIS	17
2.2.1	Construção e formação de polímeros	17
2.3	PLÁSTICOS COMO MATERIAIS	19
2.4	TIPOS DE DEGRADAÇÃO DOS POLÍMEROS	20
2.4.1	Degradação foto-oxidativa	22
2.4.2	Degradação termal	23
2.4.3	Biodegradação	24
2.4.3.1	Mecanismos da biodegradação	25
2.5	BIODEGRADAÇÃO DE POLIETILENO NA LITERATURA	26
3	OBJETIVOS	29
3.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	29
4	MATERIAL E MÉTODOS	30
4.1	COLETA DOS MATERIAIS	30
4.2	METODOLOGIA DE CRESCIMENTO E SELEÇÃO DOS MICRORGANISMOS	30
4.2.1	Isolamento dos microrganismos	32
4.3	IDENTIFICAÇÃO DE MICRORGANISMOS DEGRADADORES DE PLÁSTICOS	33
4.3.1	Obtenção de halos e coloração dos meios	33
4.3.2	Degradação microbiana de polietileno em meio líquido	34
4.3.3	Análise por Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier	34
4.3.4	Coloração de Gram	35
4.3.5	Extração de DNA, Reação em cadeia de polimerase (PCR), Purificação e Sequenciamento amostral	36
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	39
5.1	RESULTADOS QUANTO AO ISOLAMENTO DOS MICRORGANISMOS	39
5.2	IDENTIFICAÇÃO DE ISOLADOS DEGRADADORES DE POLIETILENO (PEBD)	40
5.3	ANÁLISE DOS MATERIAIS SÓLIDOS EM MEIO LÍQUIDO	45

5.4	COMPRATIVOS ENTRE OS RESULTADOS ENCONTRADOS E AOS REFERENTES NA LITERATURA	49
6	CONCLUSÃO	51
	Referências	52

1 INTRODUÇÃO

Diante das constantes destruições ambientais e a massiva extração de recursos pelo ser humano, soluções que busquem mitigar e desacelerar o efeito catastrófico, tornam-se alternativas de grande valia, no que tangem a tentativas de reversão do quadro. Um dos principais vilões e colaborador do aumento gradativo da desregulação no globo terrestre e dos biomas, são os materiais oriundos da classe dos polietilenos. Estes produtos, polímeros sintéticos e orgânicos, de base petroquímica, tem por característica possuírem um preço acessível, serem leves, fortes, duráveis e resistentes a corrosões, além de apresentar uma alta condutividade térmica e conter boas propriedades quanto a isolamentos elétricos (THOMPSON et al., 2009).

Em junção ao descrito, a facilidade de utilização de componentes oriundos dos polímeros, acaba por substituir outros materiais como: vidro, metal, madeira e fibras naturais. Todavia, algumas das qualidades desejáveis desses compostos, são também suas principais limitações, justamente por serem resistentes à degradação física e química, o que significa que podem persistir como resíduos no ambiente durante décadas ou até mesmo séculos (CO-OPERATION; DEVELOPMENT, 2022).

A produção global de plásticos emergiu-se aproximadamente na década de 1950 e gradualmente atingiu um nível alto devido ao seu uso cotidiano, aumentando significativamente sua confecção. Em termos de percentual global de manufatura, em 1960, 1,5 milhões de toneladas foram confeccionadas, segundo Alimba e Faggio (2019) em frente aos 353 milhões no ano de 2019 descrito por Co-operation e Development (2022) e 400,3 milhões no ano de 2022, conforme descrito por EUROPE (2023). Em suma, 8 bilhões de toneladas de plásticos foram manufaturadas neste período de tempo. Em comprovação ao destacado, observa-se que a alta produção dos compostos, geraram um aumento no residual global, no qual denota-se ao referir-se aos dados descritos no período de 2000 a 2019, em que as quantidades duplicaram-se de 156 milhões de toneladas para 353 milhões (CO-OPERATION; DEVELOPMENT, 2022).

Os fatores se tornam agravantes ao se observar que apenas 55 milhões de toneladas destes resíduos foram recolhidos para reciclagem, todavia 22 milhões ainda necessitavam de um segundo tratamento para descarte. Em última análise, tratando-se em termos percentuais, 9% dos resíduos plásticos são reciclados, 19% foram incinerados e cerca de 50% foram para aterros sanitários. Os 22% restantes foram alienados em lixões não controlados, queimados a céu aberto ou vazados para o meio ambiente (CO-OPERATION; DEVELOPMENT, 2022). No Brasil, conforme ABREMA (2023), estima-se que as cidades geraram 77,1 milhões de toneladas de resíduos sólidos urbanos no ano de 2022, sendo que apenas 4% desses materiais passaram por um processo de reciclagem, fato denotado por Gandra (2022), em que a autora suscita que dos 5570

municípios do país, 1500 não possuem nenhum projeto voltado para reciclagem.

Como consequência, do não tratamento e descartes incorretos, os polímeros tem se tornado uma crescente problemática no que tange em termos ambientais, tendo em vista que seu acúmulo, tem afetado ecossistemas com um todo. Um dos principais fatores para essa perspectiva, provêm que grande parte dos materiais produzidos com essas características tendem a ser produtos de fácil descarte, conforme descreve, Nielsen et al. (2019 apud YAO; SEONG; JANG, 2022). Além disso o autor acrescenta que o custo de produção do plástico é muito inferior ao custo de reciclagem, gerando como consequência um grande acúmulo de resíduos plásticos no ambiente natural. Fator no qual impacta de forma extremamente negativa a vida de espaços terrestres e marítimos, por serem resistentes a decomposição natural (YAO; SEONG; JANG, 2022).

É de grande consenso, que seus efeitos adversos tem desregulado espaços naturais, como observa-se nas superfícies marítimas e sua biodiversidade, que no decorrer das décadas, conforme expansão do ser humano pelos territórios, gerou graves alterações nos ecossistemas que os compõem. Em termos agravantes, Adams (2005 apud THUSHARI; SENEVIRATHNA, 2020), denota que os recintos apresentam conexões intrínsecas com o ambiente terrestre, portanto as mudanças que ocorrem em um sistema geram um impacto significativo em outro. Fato que se confirma, por esses materiais serem inertes e estáveis com relação a sua natureza, devido a sua hidrofobicidade, cristalinidade e alto peso molecular. Por esses motivos, que uma folha de polietileno mantida em solo úmido por um período de tempo de 12 anos, acabou não mostrando uma perda de peso significativa, tornando-se ainda mais agravante o fato, pois somente após 32 anos, o material apresentou uma parcial degradação em sua estrutura (SEN; RAUT, 2015; OTAKE et al., 1995; POTTS, 1978).

Além disso, a lixiviação do lixo plástico acumulado em aterros ou espaços de não destinação, decorrentes do acúmulo de polímeros, geram diminuição da capacidade dos aterros e uma taxa muito lenta de degradação do LDPE no ambiente. Fato que podem levar a afetar a população e a atividade de microrganismos no solo, bem como em espaços marítimos, que podem gerar sufocamento por parte dos animais devido a sua ingestão, acrescidos de altas taxas de mortalidade, inibição de crescimento e reprodução das espécies que compõem esses espaços (YAO; SEONG; JANG, 2022; JUNG et al., 2020; SEN; RAUT, 2015).

Tendo em vista esses aspectos denotados e a crescente problemática que se desenvolve, a busca por soluções que visem contornar esses cenários podem ser aliadas no enfrentamento. Uma das possibilidades tem como origem os microrganismos degradadores de materiais poliméricos, que possuem a capacidade de degradar esses compostos, assim facilitando o processo de eliminação dos mesmos no meio ambiente. Referente aspecto, pode ser denotado em artigos científicos que citam suas habilidades

e eficiências, tais como, Hadad, Geresh e Sivan (2005), que utilizou-se de uma bactéria termofílica, *Brevibacillus borstelensis* 707, isolada do solo para degradar polietileno de baixa densidade, no qual apresentou em seus resultados, durante um período de tempo de incubação, em termos de perda gravimétrica e peso molecular de cerca de 11 e 30% respectivamente. Quanto a Park e Kim (2019), também utilizando-se de amostras de materiais sólidos de um espaço de deposição de resíduos, sendo seus isolados culturas bacterianas de *Bacillus sp.* e *Paenibacillus sp.*, amostras essas que exibiram em seus resultados, uma perda de 14,7% quanto ao peso molecular, atrelado a uma redução de 22,8% para o diâmetro médio das partículas.

Partindo-se dos fatos exposto e suas boas inferências, o trabalho volta-se por meio da metodologia de bioprospecção, bioprospectar nos compósitos minerais (solo), microrganismos oriundos do aterro sanitário da cidade de Toledo, no estado do Paraná-Brasil, com capacidade de degradar polímeros, tendo como objetivo final encontrar, uma nova possibilidade de contorno no que se refere a problemática das deposições de plásticos no ambiente terrestre.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 INTRODUÇÃO A HISTÓRIA DOS POLÍMEROS SINTÉTICOS

A pouco mais de cem anos, os plásticos atualmente conhecidos, ainda não eram de conhecimento por parte da sociedade. Muito antes do desenvolvimento de plásticos comerciais, os poucos materiais existentes exibiam características únicas, embora fossem considerados fortes, translúcidos, leves e moldáveis, apenas algumas substâncias possuíam essas qualidades em torno de suas moléculas. Em termos atuais, estes compostos são conhecidos como plásticos naturais, por terem sua origem de materiais encontrados na natureza, sem a necessidade de utilizar um processo químico, como os compostos atuais, devido a essa característica, se constituem como um ponto de partida para uma breve história dos materiais plásticos (LOKENSGARD, 2013).

A introdução de materiais com características plásticas, inicia-se no período medieval, advindo de materiais córneos, ou seja, suas bases eram essencialmente de chifres e cascos de animais. Possuíam como características, maleabilidade e resistência, além de não oxidarem e não proporcionarem sabores desagradáveis aos alimentos. Mais adiante em 1290, Marco Polo em uma de suas expedições a Índia descobre a goma laca, um composto produzido por um pequeno inseto chamado lac. Sob calor e pressão a goma-laca possuía a capacidade de fluir nas reentrâncias de moldes intrincados e detalhados, todavia, seu estado puro era considerado fraco e frágil. A fim de contornar esse obstáculo, desenvolveu-se compostos aliados, que possuíam várias fibras para dar aos objetos moldados um pouco mais de resistência. Apesar das grandes vantagens, a goma-laca, era extremamente afetada, por condições climáticas adversas, que interferiam no crescimento dos insetos resultando em baixas produções e mercado oscilatório, somados ao apresentado e a outros demais fatores, como envelhecimento e sua higroscopia (LOKENSGARD, 2013).

Entre os anos de 1920 a 1930, inicia-se uma busca, para substituir a Goma-Laca, o material escolhido foi a Guta-Percha, um polímero natural extraído de árvores nativas da península malaia, de nome *Palaquium gutta*. William Montgomerie, identificou o uso do material pelos nativos em cabos de facas e denotou a facilidade do polímero em ser moldável. Somados ao exposto, o composto, foi sendo utilizado e acrescido no meio industrial, devido ao fato de possuir capacidade de ser esticado, além de serem resistentes à vulcanização, o tornando-o um excelente isolante para fios e cabos elétricos, pois resultavam em condutores flexíveis, impermeáveis e imunes a ataques químicos. Todavia, a Guta-Percha, assim como sua antecessora Goma-Laca, era inconsistente, pois apresentava nos entornos de materiais, contaminações que geravam pontos de isolamento com baixa capacidade de condutividade, gerando como consequência, curtos circuitos em cabos banhados pelo polímero (LOKENSGARD, 2013).

Tendo em vista as dificuldades de coleta, armazenamento e purificação desses materiais, no que tange as produções fabris, começou-se uma busca por compostos naturais mais resistentes a manufatura após modificações químicas, entra-se nessa questão a adesão da borracha natural ou goma de borracha, extraída de Seringueiras (*Hevea brasiliensis*). Em comparação à guta-percha, o composto possuía pequena importância industrial, devido ao fato de ser extremamente sensível à alterações de temperatura, nos quais em superiores, o material se torna muito mais macio e em inferiores ou frias, um composto mais rígido. A partir de 1829, com Charles Goodyear, após misturar o látex com pó de enxofre, criou-se o processo de vulcanização, tornando-se assim um produto com maior elasticidade e resistente a altas temperaturas (LOKENSGARD, 2013).

Foi a partir de 1907 que surgiu-se o primeiro material plástico sintético, desenvolvido por Dr. Leo H. Baekeland: a Baquelite. Composto oriundo de uma reação química entre o fenol e o formaldeído, instaurou-se após sua criação o marco inicial para a introdução de compostos não naturais e por consequência, diminuições nos custos industriais, quanto a produção de plásticos e na facilitação dos processos que o formam. Com o surgimento da baquelite e a compreensão das estruturas dos polímeros, segue-se um expansivo desenvolvimento na produção em larga escala de inúmeros tipos de materiais poliméricos modernos, como são os casos: do poli(cloreto de vinila) (PVC), poli(cloreto de acetila) (PVA), poli(metacrilato de metila) (PMMA), poliestireno (PS), polietileno de alta e baixa densidade (PEAD e PEBD), poli(cloreto de vinilideno) (PVDC), poliamida (Nylon), poliuretano (PU), poli(tetra flúor-etileno) (Teflon), poli(tereftalato de etileno) (PET), além do surgimento das técnicas de moldagem dos plásticos, que viabilizaram o uso destes para os mais diversos tipos de finalidades (PEIXOTO, 2013).

Apesar da enorme confiança nos processos de criação desses compostos, problemáticas surgiram-se ao longo do desenvolvimento dos polímeros sintéticos, sobretudo no que tange-se quanto a compreensão da natureza química e estrutural dos plásticos. Tendo em vista essa barreira, em 1924 Herman Staudinger, por meio de seu artigo "Über Polymerisation" introduziu a primeira e grande definição desses compostos, pelos quais, descrevem os polímeros como substâncias de cadeias longas, conectadas por dezenas de pequenas moléculas unidas, através ligações químicas covalentes (LOKENSGARD, 2013). As notáveis descobertas estabeleceram o uso de materiais plásticos como novas diretrizes para a indústria, agricultura e sociedade, principalmente devido ao baixo custo e grande estabilidade, além de ajudar na compreensão das sínteses e manejos dos polímeros, que surgiram após a segunda metade do século vinte, como é o caso do polipropileno (PP), policarbonato (PC), copolímero de etileno e acetato de vinila (EVA), além dos plásticos biodegradáveis, desenvolvidos em decorrência do aumento do preço do petróleo, a exemplo do

poli(hidroxiburirato) (PHB), poli(hidroxialcanoatos) (PHA), poliacetileno (PA), polianilina (PAni), poli(ácido láctico) (PLA) (PEIXOTO, 2013).

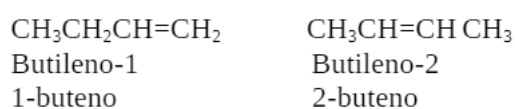
2.2 POLÍMEROS COMO MATERIAIS

2.2.1 Construção e formação de polímeros

Partindo-se quanto a construção de um material polimérico e a formação de sua estrutura, os compostos se estabelecem de forma inicial através de blocos químicos principais por meio de moléculas químicas primárias, como é o caso, do etileno, propileno e o butadieno. As etapas de geração de um composto polimérico, partem-se dos monômeros que consistem na forma molecular original, a partir da qual um polímero (produto plástico) é produzido. Ao conectar-se entre si, os monômeros, por meio de ligações covalentes, geram uma molécula de maior número de compostos interligados, denominada como polímero, o processo de formação do composto é efetuado através de uma Reação de polimerização, no qual caracteriza-se como uma etapa reacional onde há uma ligação covalentemente forte dos monômeros de baixo peso molecular com os de alto peso (ALI; ALI; SPEIGHT, 2005 apud SPEIGHT, 2020).

É válido ressaltar que os mesmos, podem ser subdivididos em categorias baseadas em unidades monoméricas interligadas entre si, como são os casos: dos dímeros, trímeros, tetrâmeros, pentâmeros, octâmeros e continuando a números superiores. Além disso, destaca-se a questão do isomerismo, no qual, diferentes isômeros de uma mesma unidade monomérica, podem apresentar propriedades diferentes e conferir aspectos opostos entre ambos, o que denota a importância e complexidade das estruturas poliméricas. Quanto ao observado, uma das representações mais conhecidas, é a questão do butileno-1 e butileno-2, onde há uma simples mudança na dupla ligação, conforme apresentado na Figura 1 (SPEIGHT, 2020).

Figura 1 – Representação estrutural da modificação da dupla ligação do butileno-1 e butileno-2



Fonte: (SPEIGHT, 2020).

Com a junção dos monômeros entre si, a construção de um polímero se dá por meio de uma reação de polimerização. Um processo relativamente simples, mas as formas nos quais os monômeros são unidos podem variar, tornando assim, conveniente ter mais de um sistema a ser descrito durante a reação. Tendo em vista o exposto, a polimerização ocorre através de uma variedade de mecanismos reacionais que

apresentam diferentes tipos de complexidade, devido aos grupos funcionais presentes nos compostos reativos (ODIAN, 2004).

Um sistema de separação dos processos de polimerização, coloca em questão do quanto a molécula original é mantida quando os monômeros se ligam entre si, é por meio desse aspecto, que se subdividem em dois tipos de reação. Na polimerização de adição, as unidades monoméricas são adicionadas junto com suas estruturas sem sofrer alterações ou eliminações. Por outro lado, a polimerização por condensação resulta em um polímero menos maciço do que dois ou mais monômeros que o formam, devido ao fato de nem todas as estruturas monoméricas originais serem incorporadas ao composto. A água é uma das moléculas mais comuns quimicamente e que são eliminadas durante a polimerização por condensação (SPEIGHT, 2020; ODIAN, 2004).

Efetuada a reação de polimerização, há a formação do polímero, uma molécula grande (macromolécula) composta de unidades estruturais repetitivas (monômeros) tipicamente ligados por ligações químicas covalentes. São formados por reações, nas quais um grande número de monômeros são unidos sequencialmente, formando uma cadeia. Em muitos polímeros, apenas uma dessas pequenas partes são utilizadas, em outros, duas ou três podem ser combinadas. Esses materiais são classificados pelas características das reações pelas quais são formados, se subdividindo em polímeros de adição (Tabela 1), em que todos os átomos nos monômeros são incorporados na estrutura, não havendo perda de massa na forma de compostos de baixo peso molecular, em que o peso de polímero formado é igual ao peso de monômero adicionado. E por reações de condensação (Tabela 2), no qual as estruturas monoméricas são liberadas em compostos menores e de baixo peso molecular, tais como a água, amônia e ácido clorídrico (ODIAN, 2004; JR, 2002).

Tabela 1 – Polímeros selecionados que se encontram na classificação de adição de hidrocarbonetos

Nome	Fórmula	Monômero	Propriedades	Usos
Polietileno - Baixa densidade (LDPE)	$-(CH_2-CH_2)_n-$	$CH_2=CH_2$ Etileno	Macio, ceroso sólido	Filmes de embrulho e sacolas plásticas
Polietileno - Alta densidade (HDPE)	$-(CH_2-CH_2)_n-$	$CH_2=CH_2$ Etileno	Rígido, translúcido e sólido	Isolamento elétrico, garrafas e brinquedos
Polipropileno (PP)	$-(CH_2-CH(CH_3))_n-$	$CH_2=CHCH_3$ Propileno	Atático: suave, sólido elástico Isotático: duro, sólido forte	Semelhante ao LDPE, carpetes e estofamentos
Poliestireno (PS)	$-(CH_2-CH(C_6H_5))_n-$	$CH_2=CHC_6H_5$ Estireno	Duro, rígido, sólido claro, solúvel em solventes orgânicos	Brinquedos, armários e embalagens espumadas
cis-Poliisopreno	$-(CH_2-CH=C(CH_3)-CH_2)_n-$	$CH_2=CH-C(CH_3)=CH_2$ Isopreno	Macio, pegajoso e sólido	Necessita passar por um processo de vulcanização para uso

Fonte: Adaptado de (SPEIGHT, 2020).

Tabela 2 – Exemplos de polímeros de condensação

Tipo	Característica de ligação
Poliamida	-NH-CO-
Proteínas, algodões e sedas	-NH-CO-
Poliéster	-CO-O-
Poliuretano	-Si-O
Fenol-formaldeído (Baquelite)	-Ar-CH ₂ -

Fonte: Adaptado de (ODIAN, 2004).

2.3 PLÁSTICOS COMO MATERIAIS

Em correlação ao descrito, os termos polímeros e plásticos, são dissertados em conjunto, todavia, a classe polimérica abrange compostos maiores e extensos, no qual incluem os materiais citados em adição a outros tipos de compostos, como são os casos: da celulose, dos âmbar e das borrachas naturais. Partindo-se da etimologia, a palavra plásticos, deriva-se do termo "plastikos", de origem grega e tem como significado: um material que pode ser moldado nos mais deferentes tipos de formas. Esse produto, pode ser classificado como parte dos polímeros, uma classe de compostos que possuem uma larga e complexa cadeia de moléculas, com centenas de repetições e estruturas semelhantes em seu entorno (JOEL, 1995).

Os materiais plásticos que utilizamos com maior frequência nos tempos atuais, tem como base em termos de matérias primas, compostos oriundos de estruturas orgânicas ou inorgânicas, tais como oxigênio, silício, carbono, nitrogênio, hidrogênio e cloreto. Com relação as fontes de onde se derivam, carvão, gás natural e petróleo, são suas principais bases de construção e de geração de suas estruturas físicas (SEYMOUR, 1989 apud SHAH et al., 2008). Sob via de regras, são deformáveis plasticamente, por meio de manufaturas sob determinadas condições (calor, pressão) ou são moldados plasticamente (MICHAELI et al., 1995).

Os polímeros plásticos são diferenciados de acordo com seus arranjos estruturais, propriedades físicas e aplicações, todavia a classificação de uso geral advém de seus comportamentos mecânicos, sendo classificados em dois grupos principais, termoplásticos e termofixos (JR, 2002). Os termoplásticos, ao serem expostos a um aumento substancial da temperatura e marginal da pressão, amolecem e fluem, podendo ser moldados nestas condições e ao retornarem a seu estado inicial se solidificam, adquirindo a forma do molde. Quando aplicado novamente em determinadas temperaturas e pressões, o processo se reinicia, concluindo-se então que são passíveis de serem recicláveis. Estão incluídos entre os termoplásticos: poliamida, polietileno (PE), poliestireno (PS), polipropileno (PP) e cloreto de polivinila (PVC). Em

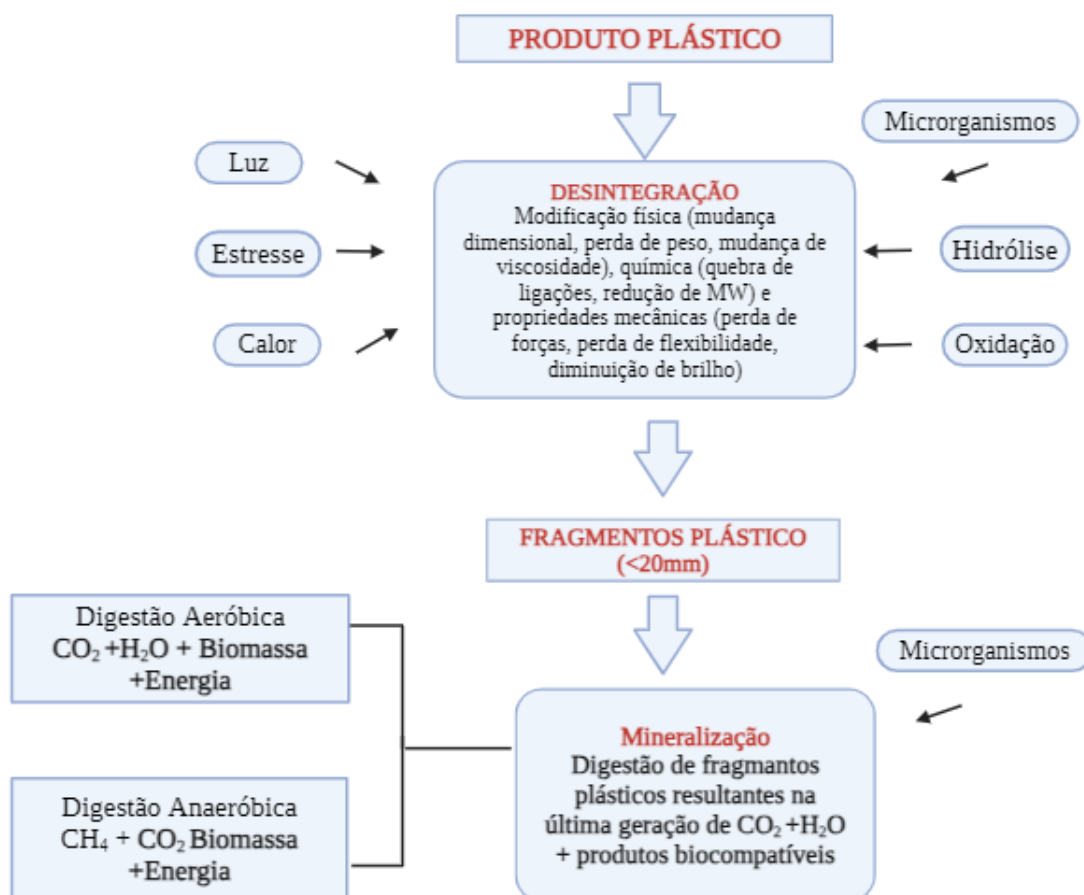
oposição, se encontram os termofixos ou termorrígidos, plásticos que ao serem sujeitos a um aumento substancial da temperatura e marginal da pressão, amolecem e fluem, adquirindo a forma do molde, se solidificando e com isso, não retornando à sua conformação original, tornando-os materiais insolúveis, infusíveis e não-recicláveis. Assim, os termorrígidos são moldados quando ainda na forma de pré-polímero (antes da cura, sem ligações cruzadas). Como exemplos de termorrígidos, tem-se: poliéster, tereftalato de polietileno (PET), poliuretano (PU) e resinas acrílicas (JR, 2002; AGUIAR, 2023).

O mercado global desses materiais vem crescendo de forma exponencial, conforme a exigência de seu uso vem aumentando. Quanto a produção em termos continentais, no ano de 2023 a Ásia e a Oceania juntas, corresponderam a 56% de toda a fabricação, sendo a China detentora de uma porcentagem de 32%, em contraponto às demais regiões, nos quais 21% são pertencentes às Américas, 9% ao Oriente Médio em conjunto a África e 14% ao continente Europeu. Somados ao exposto, quanto a projeções futuras, em 2060 estima-se que sejam fabricados 1,2 bilhão de toneladas de plásticos, o dobro do que se produz atualmente (COMUNICAÇÃO, 2023). A problemática no entorno dessa grande produção, está em que 90% do que se é consumido é descartado e utilizado apenas uma única vez, e cerca de 79% dos resíduos plásticos no mundo são armazenados em aterros, resultando em até 2,41 milhões de toneladas de resíduos de plásticos todos os anos que entram nos oceanos através dos rios que cortam próximos a esses espaços. Somados a sua alta taxa de recalcitrância, se acumulam nos meios naturais por centenas de anos e mesmo após a passagem do tempo, liberam pequenos resíduos, micropartículas e nanopartículas, chamados microplásticos (NATURE, 2018).

2.4 TIPOS DE DEGRADAÇÃO DOS POLÍMEROS

Inferindo-se da deposição de plásticos no meio ambiente e devido a sua exposição aos fatores que o permeiam. Os materiais com base em polietileno são fortemente suscetíveis a atividades degradativas, que gerem radicais livres, por meio de quebra ou clivagem de suas estruturas poliméricas, ou até mesmo por um cross-linking entre cadeias. Essas reações, conduzem a modificações no peso molecular e na sua distribuição, nas propriedades mecânicas e de forma mais externa, na aparência do composto (TOLINSKI, 2015). Tendo em vista, o apresentado, especifica-se que há uma segregação quanto aos mecanismos degradativos no que tangem os compostos com base em polímeros, sendo eles: Degradação foto-oxidativa, Degradação termal e Biodegradação (ZEENAT et al., 2021), fatores ilustrados na Figura 2. Cada mecanismo, especificado, tem como principal meta romper as moléculas de polietileno e assim, a tornar mais fácil de ser degradada ou digerida, com é decorrente na biodegradação.

Figura 2 – Representação esquemática dos mecanismos de degradação de plásticos



Fonte: Adaptado de (ZEENAT et al., 2021).

Conforme ilustrado na Figura 2, quando os plásticos são expostos a um ambiente altamente energético, caracterizado por uma carga comparável aos valores de energia de suas ligações químicas que as conectam e constituem a espinha dorsal do polímero que o originam, acabam por resultar em um colapso da arquitetura macromolecular. Esse caos, gera uma fragmentação perceptível, correspondendo ao início da degradação, que depende de uma combinação de vários mecanismos e fatores. O processo de degradação dos materiais poliméricos expostos, possuem duas fases: a desintegração e a mineralização. No primeiro caso, a ação está intrinsecamente conectada à deterioração das propriedades físicas, tais como a descoloração, fragilização da estrutura e fragmentação, enquanto na segunda fase, ocorre uma conversão final desses fragmentos plásticos em outras moléculas de fácil assimilação ao meio ambiente (KRZAN et al., 2006).

2.4.1 Degradação foto-oxidativa

O conseqüente fator degradante, tem como características, partir-se da absorção da luz ultravioleta e também da luz visível, que são determinados pelo espectro de comprimento das ondas, conforme apresentado na Tabela 3. É através desse material teórico que torna-se possível, identificar os comprimentos referentes a absorção por parte de materiais e o corpo humano. Em termos específicos e correlatos aos polímeros e como essa característica pode atuar como um degradante em termos moleculares, deve-se compreender que a radiação ultravioleta quanto a luz solar a nível do mar, se comportam em faixas de comprimento de ondas entre 400 e 290 nm. Os quantum de luz UV próximos a faixa apresentada possuem energias de 3,1 a 4,3 eV que corresponde a $72-97 \frac{kcal}{mol}$, indicando que estes referidos comprimentos de onda, possuem energia suficiente para quebrar as ligações químicas mais comuns, como é caso dos compostos alifáticos em que ligações, C-H (94 a $99 \frac{kcal}{mol}$), C-C (77 a $83 \frac{kcal}{mol}$) e C-O (76 a $79 \frac{kcal}{mol}$), são degradadas pela exposição a essa faixa de comprimento de luz. Além disso acresce-se os compostos contendo halogêneos em suas estruturas tais como: C-Cl ($82 \frac{kcal}{mol}$) e C-F ($110 \frac{kcal}{mol}$), que também sofrem cisão por meio dessa emissão (RÅNBY, 1989).

Tabela 3 – Escala de comprimento de onda para o espectro de luz visível e UV, energia da luz correspondente a quanta (ev) e energias de dissociação de ligação $\frac{kcal}{mol}$

Radiação UV	UV Visível						Unidades de medidas
	Azul	Verde	Amarelo	Laranja	Vermelho		
300 400	—	500	600	—	700	nm	
4,2 3,1	—	—	2,1	—	—	eV	
9,5 72	—	—	48	—	—	$\frac{Kcal}{mol}$	

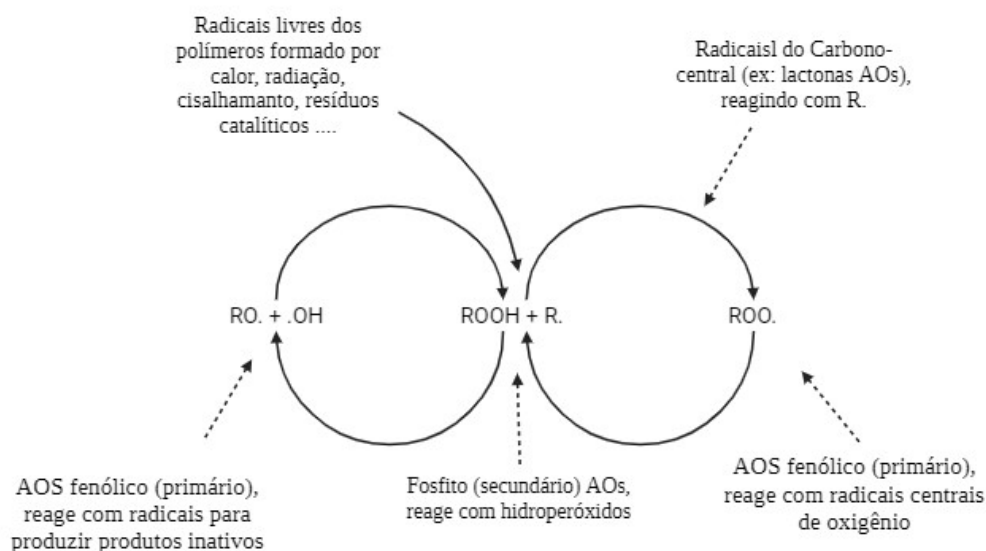
Fonte: Adaptado de (RÅNBY, 1989).

Ao que se refere em termos de luz visível, especifica-se sua capacidade de quebra molecular, inferior à radiação ultravioleta. Tendo em vista esse aspecto determinante, o quanta de luz visível varia em uma faixa entre 400 a 800 nm, possuindo energias de 3,1 a 1,55 eV, correspondendo de 36 a $72 \frac{kcal}{mol}$ de energia a ser liberada ou absorvida. Partindo do exposto, a energia referente a esses quantum, acaba por gerar cisões, apenas em ligações mais fracas como ocorre nos compostos orgânicos com halogênios em sua composição, como ocorre em C-I e C-Br (67 e $53 \frac{kcal}{mol}$ respectivamente), em composições com presença de O-O, conhecidas como peróxidos de hidrogênio ($51 \frac{kcal}{mol}$) e outros demais compostos orgânicos (N-N, F-F, Cl-Cl, Br-Br, I-I e H_2N-NH_2). Em conclusão, pode-se inferir que a radiação ultravioleta a nível do mar apresenta, capacidade energizadora suficiente para quebrar ligações químicas fortes, o que não ocorre em relação a luz visível, em que ligações químicas mais fracas podem ser cisadas (RÅNBY, 1989).

2.4.2 Degradação termal

Em definição, as Degradações Termal e Foto-oxidativa, são consideradas processos similares, e englobam um preceito denominado: Processo oxidativo ou Degradação oxidativa. Todavia, existem diferenças que os segregam, e partem-se das etapas iniciais de seus processos, dentre as quais é liderada pelo ciclo de auto-oxidação, conforme especificado na Figura 3, no qual denota-se uma simplificação visual de como o processo decorre e os locais, onde materiais antioxidantes, adentram para interferir na continuidade da reação. Esse sistema, de forma circular e auto propagativo, tem como fundamento gerar um aumento gradual na degradação de um polímero, por ser um processo autocatalítico, suas reações químicas, são subdivididas em três etapas: Iniciação, Propagação e Terminação (PAOLI, 2009).

Figura 3 – Mecanismos de auto-oxidação



Fonte: Adaptado de (TOLINSKI, 2015).

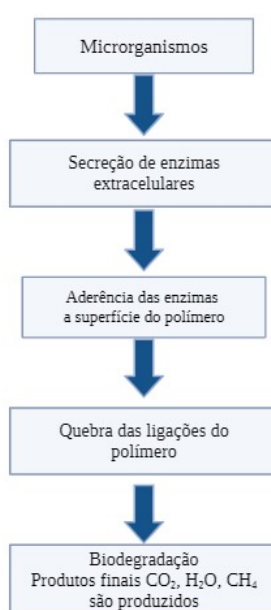
Ao que se descreve, a iniciação, pode decorrer a partir de defeitos na cadeia polimérica ou por contaminações geradas pelo processo de polimerização, nessa etapa, fatores como: calor, luz, cisalhamento e resíduos de catalisadores, que tendem a retirar hidrogênio da cadeia polimérica para formar radicais livres alquílicos, é nessa etapa que calor, reações de cisalhamento e resíduos de catalisadores tendem a tirar hidrogênio da cadeia polimérica (RH) para formar radicais livres de alquil ($R.$). Em consequente na parte propagativa, o oxigênio passa a se combinar com as espécies de radicais livres para criar novas formas reativas, incluindo radicais peróxido e hidroperóxidos ($O_2 + R. \rightarrow ROO. + RH \rightarrow ROOH + R.$). A fim de conclusão, o ciclo de Auto-oxidação, se encerra quando os hidroperóxidos ($ROOH$), por sua vez, tornam-se compostos reativos, a fim de criar novas espécies de radicais livres, como são os casos dos radicais Hidróxi e Alcóxi ($ROOH \rightarrow HO. + RO.$) (TOLINSKI, 2015).

Tendo em vista o abordado e traçando um divisionismo, quanto as diferenças entre os mecanismos degradativos, aborda-se que a segunda diferença entre a Degradação Termal em frente a Foto-Oxidativa, advém da localização das reações de quebra, na qual a primeira, para que se inicie seu processo de quebra há necessidade da entrada de uma energia de fonte térmica, além disso, as etapas atuam por toda a parte que compõe o polímero. Fato este, que não ocorre na degradação em que o UV é o estímulo para a ruptura, gerando assim, modificações superficiais a molécula (ZEENAT et al., 2021).

2.4.3 Biodegradação

Os polímeros geralmente são biodegradados aerobicamente na natureza, anaerobicamente nos sedimentos dos aterros sanitários e parcialmente aeróbica em compostos e solos. Os produtos gerados pela ação dos microrganismos, se subdividem conforme suas atividades anaeróbicas e aeróbicas (ALSHEHREI, 2017). Segundo Dommergues e Mangenot (1970 apud LUCAS et al., 2008), as primeiras definições com relação a palavra biodegradação à definem como uma decomposição de substâncias pela ação de microrganismos, conduzindo em seu contexto final à reciclagem de carbono, a mineralização de CO_2 , H_2O e a formação de sais. Quanto ao presente, Lucas et al. (2008), descreve que existem cinco etapas, conforme apresentado na figura Figura 4, condizentes a esse sistema químico, nos quais a primeira relação postula que uma ação conjunta de uma comunidade microbiana, com organismos decompositores e fatores abióticos inclusos, nos quais fragmentam os materiais biodegradáveis em pequenas frações, que é designado como um ato de biodeterioração.

Figura 4 – Etapas da biodegradação biológica



Fonte: Adaptado de (LUCAS et al., 2008).

No que tange na biodegradação aeróbica, os microrganismos decompõem grandes compostos orgânicos em menores utilizando-se de oxigênio como um receptor de elétrons e os produtos resultantes dessa reação, são o dióxido de carbono e água (*Carbono/plástico + O₂ → CO₂ + H₂O + Carbono/residual*). Na biodegradação anaeróbia, o oxigênio não é necessário para a degradação de compostos pela ação de microrganismos, todavia é um componente importante para a atenuação natural de contaminantes em locais de resíduos perigosos. As bactérias anaeróbicas, presentes nessa etapa utilizam, nitrato, ferro, sulfato, manganês e CO₂ como um aceptor de elétrons em vez do oxigênio para quebrar grandes compostos orgânicos em partes menores (*Carbono/plástico → CH₄ + CO₂ + H₂O + Carbono/residual*) (ZEENAT et al., 2021).

2.4.3.1 Mecanismos da biodegradação

A biodegradação de polímeros correspondem a três etapas: ataque do microrganismo a superfície do polímero, utilização do composto como fonte de carbono e a degradação do produto. Partindo-se do exposto, o processo de entrada das moléculas poliméricas ocorrem a partir do trabalho das exoenzimas, enzimas secretadas extracelularmente, que tem como função quebrar grandes polímeros, gerando ao final elementos monoméricos, que posteriormente são mineralizados, originando pequenas moléculas solúveis em água e assim permitindo que as mesmas passem pela membrana semipermeável dos organismos e sejam utilizadas como fonte de energia. Esta etapa pelas quais, grandes polímeros são quebrados, é conhecida como depolimerização, enquanto o processo em que os produtos finais são gerados ao final espécies inorgânicas como H₂O, CO₂ e CH₄ é descrita como mineralização. No caso de ambientes aeróbicos, apenas a produção de H₂O, CO₂ e massa microbiana como produtos finais foi registrada, enquanto que sob condições anaeróbicas, metanogênicas e sulfidogênicas, além dos três componentes-chave citados, CH₄ e H₂S também foram registrados como produtos finais extras da reação (ZEENAT et al., 2021).

Expandindo em termos, a degradação de polímeros por microrganismos inclui os regimes de biodeterioração, biofragmentação, mineralização e assimilação (ZEENAT et al., 2021). No primeiro caso, o processo afeta a superfície do polímero mudando sua estrutura química, física e suas propriedades mecânicas, resultado da atividade de crescimento do organismo na superfície e/ou dentro de um dado material. Em conseqüente, após a biodeterioração, o próximo estágio é a bio-fragmentação que envolve a ação enzimática em polímeros plásticos, através de enzimas chamadas oxigenases, que tem como capacidade, quebrar moléculas de oxigênio que são adicionadas nas cadeias de carbono e como resultado, geram produtos de grupos álcoois e peróxil que são menos prejudiciais ao microrganismo. Além disso, esse processo de transformação dos grupos carboxílicos, são catalisados por lipases e esterases ou por endopeptidases e

grupos de amidos(ZEENAT et al., 2021; LUCAS et al., 2008).

Na mineralização polímeros plásticos que são formados na etapa de bio-fragmentação entram nas células microbianas através da membrana celular, os monômeros que apresentarem tamanhos superiores não entram dentro das células e permanecem extracelularmente. Os pequenos monômeros que se movem dentro das células são oxidados e utilizados para a produção de energia que eventualmente podem ser aproveitadas para a geração de biomassa. Por fim, na etapa de assimilação, os átomos são integrados às células microbianas para ocorrer uma degradação completa dos compostos. Os metabólitos secundários, que sobram ao final, são transportados para fora das células ou transferidos para outros organismos similares para que no futuro (H_2O , CO_2 , CH_4 e N_2) sejam reutilizados (ZEENAT et al., 2021).

2.5 BIODEGRADAÇÃO DE POLIETILENO NA LITERATURA

Conforme os estudos sobre degradação polimérica vem avançando ao longo dos anos, as investigações quanto aos microrganismos capazes de degradar polímeros tem sido amplamente expandidos. Com isso, isolados originários do ambiente natural no qual são coletados, especialmente aqueles voltados aos plásticos de baixa densidade (PEBD), tem sido fontes de pesquisa e desenvolvimento. Para isso, existem alguns pontos pelos quais a biodegradação de plásticos pode vir a ser monitoradas in vitro e a auxiliar em seus estudos de desenvolvimento (Tabela 4), tais como: as propriedades da superfície do plástico que podem vir a ser alteradas por ação do organismo em sua superfície, mudanças conformacionais físicas e mecânicas, taxa de consumo de oxigênio e de evolução do dióxido de carbono e por fim mensuração da produção de biomassa, mostrando que os microrganismos utilizaram-se dos plásticos como fonte de carbono para o seu crescimento (BHARDWAJ; GUPTA; TIWARI, 2012).

Utilizando-se dos pontos expostos na Tabela 4, quanto ao desenvolvimento de organismos capazes de biodegradar materiais poliméricos, observa-se pelos autores citados, resultados significativos quanto a eficiência na redução do peso, uma das metodologias que auxiliam na datação e identificação dos potenciais. Tendo em vista esse fator e expandindo-se as observações, em Hadad, Geresh e Sivan (2005), a bactéria *Brevibacillus borstelensis*, foi capaz de reduzir em um período de tempo de 30 dias, 11 e 30% dos pesos gravimétricos e moleculares do PE de estudo, bem como decorreu-se com Mallisetty et al. (2023) e Park e Kim (2019), através da *Paenibacillus sp.*, sob períodos de 35 e 60 dias respectivamente, um decréscimo de 22,6% e 22,8%. Não obstante, Rajandas et al. (2012), através dos organismos *Microbacterium paraoxydans* e *Pseudomonas aeruginosa*, também observou essas correlações em que 61,0% e 50,5% do LDPE foi degradado em 2 meses de estudo. Por fim, (SIVAN; SZANTO; PAVLOV, 2006), empregando a *Rhodococcus ruber*, expôs uma taxa de degradação semanal de 0,86%.

Expandindo-se em termos de mensuração, a capacidade de degradação destes microrganismos é avaliada usando vários métodos analíticos, focando em objetivos específicos e determinados. Partindo-se do monitoramento das mudanças nas superfícies, assim como suas estruturas e hidrofobicidade do polímero após degradação, a utilização da microscopia eletrônica de varredura (SEM), e de força atômica (AFM), auxiliam na aferição dessas modificações. Quanto a identificação e a formação de novos grupos funcionais, uma pesagem simples para investigar o peso da perda de massa do polímero em contato com o microrganismo de trabalho, em conjunto com a espectroscopia infravermelha de Fourier (FTIR), espectrometria de foto-elétrons de raios-Xtrosopia (XPS) e ressonância magnética nuclear (RMN), que somadas ajudam a identificar a formação de novos grupos funcionais. Por fim, pode-se desenvolver testes quanto ao crescimento celular usando o material plástico como única fonte de carbono em análogo a uma cromatografia, para monitorizar os produtos químicos gerados pela degradação do plástico (LEE et al., 2023).

Tabela 4 – Microrganismos degradadores de polietileno na literatura.

Polímero	Microrganismos	Artigo	Autor(es)
POLIETILENO (PEBD)	<i>Brevibacillus borstelensis</i>	"Biodegradation of polyethylene by the thermophilic bacterium <i>Brevibacillus borstelensis</i> ."	(HADAD; GERESH; SIVAN, 2005)
	<i>Rhodococcus ruber</i>	"Biofilm development of the polyethylene-degrading bacterium <i>Rhodococcus ruber</i> ".	(SIVAN; SZANTO; PAVLOV, 2006)
	<i>Microbacterium paraoxydans</i> e <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	"A novel FTIR-ATR spectroscopy based technique for the estimation of low-density polyethylene biodegradation".	(RAJANDAS et al., 2012)
	<i>Paenibacillus sp.</i> e <i>Serratia sp.</i>	"Biodegradation of low density polyethylene (LDPE) by <i>Paenibacillus sp.</i> and <i>Serratia sp.</i> isolated from marine soil sample".	(MALLISETTY et al., 2023)
	<i>Bacillus sp.</i> e <i>Paenibacillus sp.</i>	"Biodegradation of micro-polyethylene particles by bacterial colonization of a mixed microbial consortium isolated from a landfill site".	(PARK; KIM, 2019)

Fonte: Autoria própria.

Tendo em vista essas questões e expandindo em termos de pesquisa, além de associar as mensurações de análises de possíveis degradadores, o trabalho desenvolvido por Khampratueng, Rice e Anal (2024), no qual busca de encontrar organismos com essa capacidade, é um exemplo das aplicações citadas, pois ambos identificaram através de interferências e modificações nas estruturas poliméricas, microrganismos capazes de biodegradar esses compostos em especial o polietileno, que se delineiam na classe PEBD (LDPE). Por meio de amostras de solo em um espaço de deposição, encontraram microrganismos com capacidades de degradação de LDPE, em que das 22 amostras extraídas, apenas duas apresentaram crescimento positivo, sendo elas

o *Bacillus toyonensis* e a *Sphingobacterium sp.*. Outros fatores que comprovaram a ação desses organismos, foram as análises por meio do FTIR e FE-SEM (Microscópio eletrônico de varredura), que indicaram em suas respostas alterações na estrutura químicas, especialmente nas ligações de -OH, onde denotou-se uma redução dos picos em comparação ao branco, assim bem como um desaparecimento dos picos de CHO- e formação de novos grupos funcionais de -N=O e -C-O. Quanto a estrutura física do polímero sólido, sob sua superfície, denotou-se o surgimento de cavidades e rugosidade em ambas as amostragens com os dois microrganismos degradadores.

Os autores Bardají, Furlan e Stehling (2019), em similaridade e também em busca de identificar microrganismos com capacidade de degradar polietileno, extraíram amostras de solo do aterro sanitário na cidade de Riberão Preto, no estado de São Paulo, cepas com essas capacidades. Dos materiais analisados, cinco isolados foram obtidos, porém apenas um o *Paenibacillus sp.*, foi quem apresentou o gene *alkB*, um marcador que indica a presença de bactérias degradadoras de alcanos no meio ambiente, tendo em vista que esse compostos são encontrados em produtos derivados de petróleo, tal como o polietileno e comumente encontrados em solos contaminados por hidrocarbonetos. Utilizando-se da pesagem inicial e final de sacolas plásticas (Polietileno), inferindo uma redução do peso do material e utilização de FTIR, quanto a variação da intensidade das bandas, em diferentes regiões na presença de *Paenibacillus sp.*, tais como C-H (719 cm^{-1} e 730 cm^{-1}), C=C (1462 cm^{-1} e 1472 cm^{-1}) e C-H devido do espectro de controle (2920 cm^{-1} e 2850 cm^{-1}).

Em conclusão, as pesquisas a cerca da utilização de microrganismos como principal fonte degradadora de polietileno, tem sido constantemente ampliada nos último anos, tendo em vista a urgência, quanto ao manejo desses resíduos. Além disso, a degradação microbiana ou enzimática, oferece uma alternativa convincente para a gestão dos mesmos, impulsionada por várias vantagens-chave. Tendo em vista essas questões positivas em que os microrganismos possuem, seu uso e acréscimo quanto a cadeia produtiva dos polímeros, auxiliam na evolução das capacidades metabólicas, visto que com os desenvolvimentos suas etapas vão sendo esclarecidas, criando com isso novas enzimas e expandindo ainda mais na incorporação de diferentes compostos antropogênicos em seus sistemas celulares. Outro fator de extrema importância é a sua atuação em temperaturas e pressões amenas, o que correlaciona-se com o funcionamento das enzimas, que possuem uma sensibilidade considerável em relação a temperaturas de trabalho, devido a possibilidade de inativação das mesmas (LEE et al., 2023)

3 OBJETIVOS

Em frente da problemática ocasionada pelo acúmulo de polímeros nos diferentes ecossistemas, esta pesquisa tem o objetivo principal de selecionar linhagens bacterianas, extraídas do aterro sanitário de Toledo-Paraná, capazes de biodegradar materiais oriundos de polietileno.

3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

A fim de cumprir o objetivo principal, os seguintes objetivos específicos foram delineados:

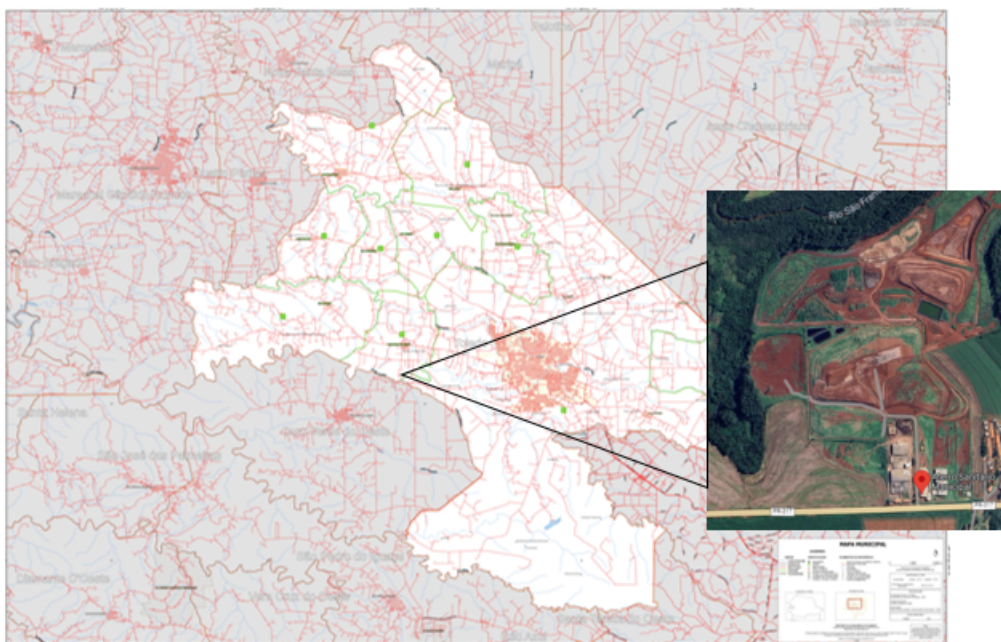
1. Isolar e identificar microrganismos oriundos de sedimentos do aterro sanitário de Toledo-Paraná, que apresentem capacidade de biodegradação de polietileno;
2. Avaliar a ação desses organismos em contato com estruturas poliméricas;
3. Identificar por biologia molecular as linhagens microbiológicas promissoras.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 COLETA DOS MATERIAIS

O processo de coleta, partiu-se de solo oriundo, do aterro sanitário da cidade de Toledo, no estado do Paraná-Brasil, localizado as margens da PR-317 Km 07, sentido ao município vizinho de Ouro Verde do Oeste (-24°44'50.7"S, 53°48'18.8"O). Foi selecionado um ponto de coleta no espaço de extração, sendo baseado através do tempo de exposição do solo coletado aos resíduos ali despejados.

Figura 5 – Localização do aterro sanitário da cidade de Toledo-PR



Fonte: Adaptado de Google Maps e (IBGE, 2024).

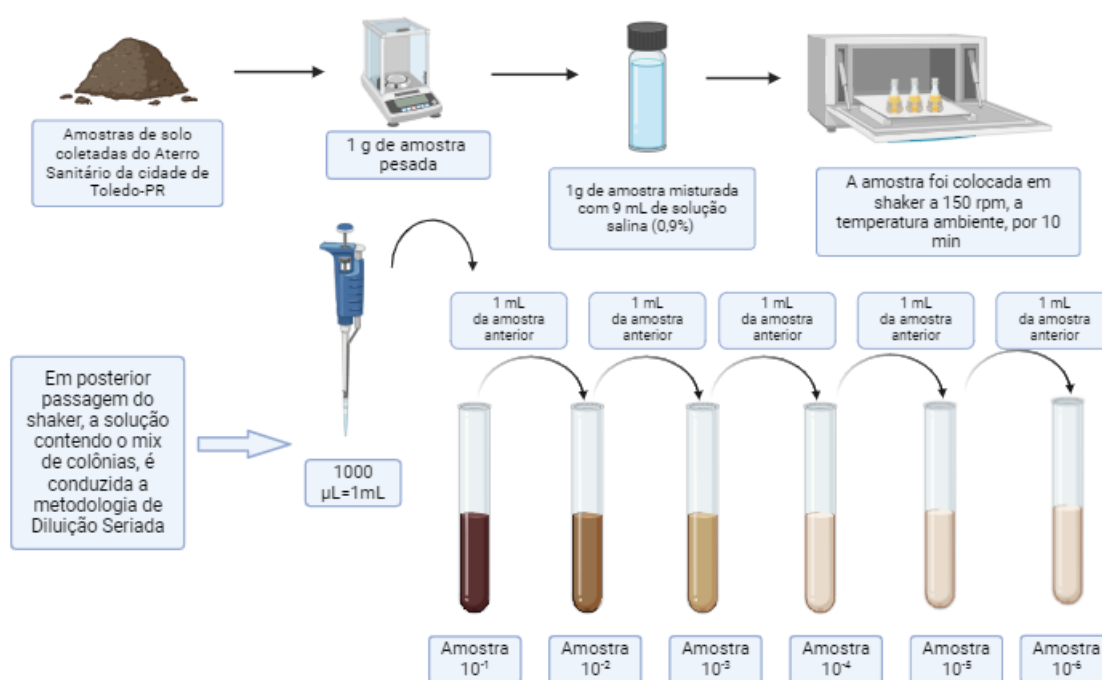
Para realizar a extração, utilizou-se uma broca de perfuração de solo, a fim de retirar materiais em uma profundidade maior, conforme especifica Park e Kim (2019), no qual ao coletar amostragens em sítios menos profundos a quantidade de microrganismos decai em comparação ao de extrações com profundidades superiores, o que influi em gerar uma variedade mais ampla de organismos a serem amostrados. Somados ao descrito, ressalta-se também que locais mais profundos mostram-se concentrações menores de oxigênio do que regiões mais rasas indicando assim que ocorreu uma decomposição mais ativa.

4.2 METODOLOGIA DE CRESCIMENTO E SELEÇÃO DOS MICRORGANISMOS

Visando o crescimento dos microrganismos e posterior isolamento, com intuito de obter-se colônias puras, as metodologias utilizadas para a construção dos fatores de

interesse, advém de dois autores Usha, Sangeetha e Palaniswamy (2011) e Thushari e Senevirathna (2020). A metodologia parte-se, de uma diluição amostral de 1g de solo coletado do aterro sanitário da cidade de Toledo-PR adicionado em 9 mL de solução salina a 0,9% autoclavada, em um tubo com tampa, marcado a 10^{-1} e agitado em *Shaker* por 15 minutos a 150 rpm, em uma temperatura de 28°C. Em consonância, a fim de obter um crescimento amostral uniforme, o frasco contendo o material a ser desenvolvido, é diluído através da metodologia de Diluição-seriada, no qual o recipiente abrangendo os 9 mL foram divididos de 10^{-1} a 10^{-6} , a fim de diminuir a carga microbiana e facilitar o isolamento para obtenção de colônias puras. O processo de diluição parte-se de cinco frascos contendo 9 mL de solução salina cada, a partir dessa distribuição, com uma micropipeta de 1000 μ L (1 mL), retira-se inicialmente da amostra 10^{-1} , 1mL da solução, posteriormente sendo repassado ao frasco do 10^{-2} , o referente procedimento é realizado em simulacro nas demais partes.

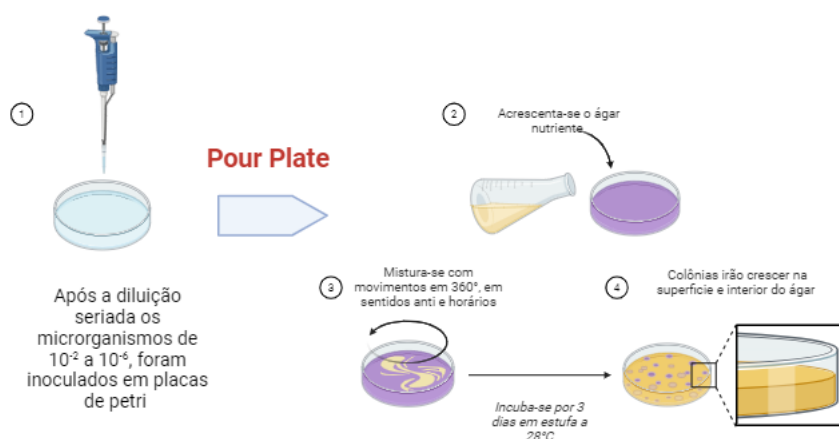
Figura 6 – Metodologia utilizada para obtenção de colônias presentes no solo



Fonte: Autoria própria.

Baseado nas metodologias, apresentadas pelos autores Usha, Sangeetha e Palaniswamy (2011) e Nakei et al. (2022), através da técnica de pour-plate (Figura 7), que consistiu em acrescentar 1000 μ L dos microrganismos das diluições realizadas em uma placa de petri, e em seguida verteu-se o meio Nutriente ágar fundido (em temperatura de toque). Por meio de movimentos circulares em 360°, em sentido anti-horários e horários, homogeneizou-se a mistura. As placas contendo os microrganismos, foram alocadas em estufa a 28°C, por 2 a 3 dias.

Figura 7 – Técnica de pour-plate



Fonte: Autoria própria.

4.2.1 Isolamento dos microrganismos

Para a realização do isolamento dos microrganismos extraídos das placas das diluições, mediante a técnica de pour-plate, os mesmos foram segregados, conforme sua morfologia e coloração diferenciada. Em seguida, realizou-se um procedimento de isolamento, conforme apresentado na Figura 8, através da técnica de esgotamento, que consiste em buscar colônias puras. Por fim, os grupamentos bacterianos puros e isolados, são transferidos para tubos falcons de 15 mL, acrescidos de 3mL de caldo nutritivo estéril, através da raspagem do microrganismo isolado em meio sólido, por meio de uma alça de inoculação. O meio contendo, as amostras, foi levado e deixado sob agitação em shaker a 30°C , em uma velocidade de 150 rpm, por 24 horas. Em seguida, os mesmos foram utilizados para uso durante a identificação de degradadores de polietileno e armazenados para posterior uso na metodologia de identificação (USHA; SANGEETHA; PALANISWAMY, 2011; NAKEI et al., 2022).

Figura 8 – Técnica de isolamento



Fonte: Autoria própria.

Para buscar potenciais degradadores de polímeros, baseando-se na metodologia de Nakei et al. (2022 apud USHA; SANGEETHA; PALANISWAMY, 2011), os

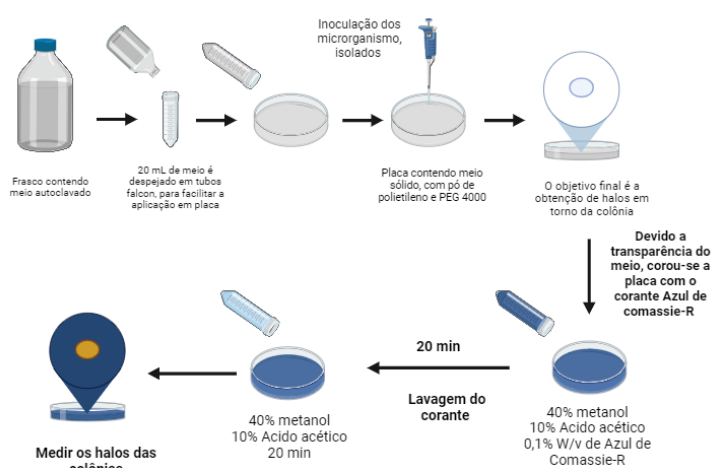
microrganismos isolados são alocados em placas contendo Meio mineral mínimo que contém a seguinte composição: KH_2PO_4 , 0,7 g; K_2HPO_4 , 0,7 g; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,7 g; NH_4NO_3 , 1,0 g; NaCl, 0,005 g; $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,002g; $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,002g; $MnSO_4$, 0,001 g e ágar bacteriano, 20 g (AUGUSTA; MÜLLER; WIDDECKE, 1993). Em adição aos componentes do meio, acrescenta-se-se uma quantidade de 1 g de Pó de polietileno (CAS 9002-88-4, com densidade de 0.94 g/mL a 25°C, adquirido através da Aldrich Chemical Co.(USA)), adicionado em 1,000 ml (0.1% w/v). Em cada placa incorporou-se 4 amostras, com 10 µL cada. Os experimentos foram alocados em estufa por um período de 15 dias, a 28°C.

4.3 IDENTIFICAÇÃO DE MICRORGANISMOS DEGRADADORES DE PLÁSTICOS

4.3.1 Obtenção de halos e coloração dos meios

Devido a transparência do ágar de cultivo, necessitou-se corar as placas que apresentaram em sua superfície, crescimento microbiano, processo caracterizado pela Figura 9, através de uma mistura de 0,1% Azul de Comassie-r, 40% de metanol e 10% de Ácido acético, acrescido com um tempo de absorção do meio ao corante, por cerca de 20 min. Além disso, extraiu-se o excesso e clarificou-se a cor do corante despejado, através de uma solução descolorante, com 40% de metanol e 10% de Ácido acético, que após vertido em placa novamente se estabeleceu um tempo de 20 min para sua ação de clarificação e amenização da solução. Ademais, buscando-se comparar com a metodologia dos autores Nademo, Shibeshi e Gemeda (2023), as placas de meio, foram preparadas com meio mínimo em conjunto ao Polietileno glicol (PEG 4000) a 0,2% (w/v), como um fator de comparação em termos de crescimento. As placas que obtiveram ao redor das colônias, formação de halos durante a coloração, foram segregadas, para posterior análise e identificação, por PCR.

Figura 9 – Metodologia para coloração das placas e análise dos halos de cultivo

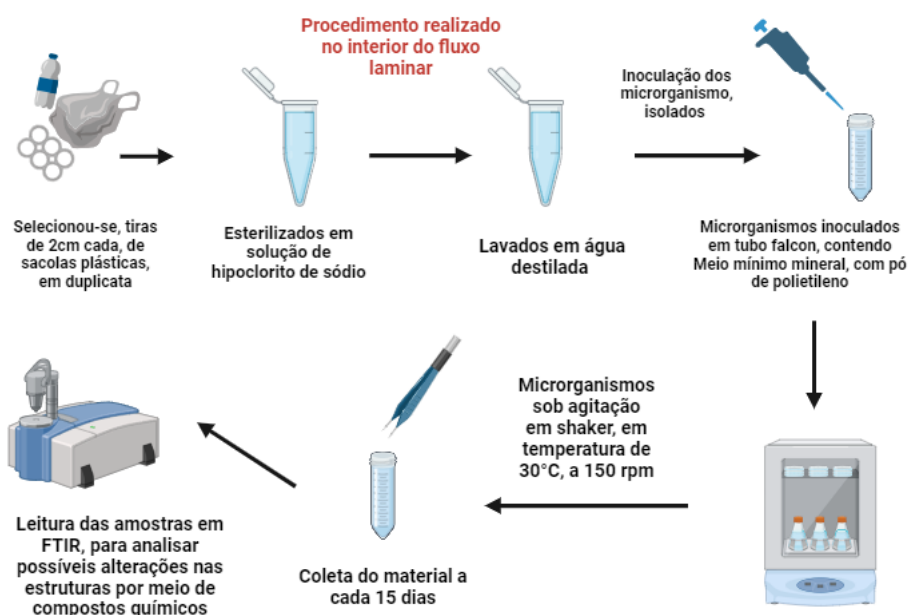


Fonte: Autoria própria.

4.3.2 Degradação microbiana de polietileno em meio líquido

Para observar a ação dos microrganismos encontrados em superfícies de materiais poliméricos, Figura 10, tiras de sacolas plásticas, com tamanhos de 2 cm cada, foram esterilizadas com uma solução de hipoclorito de sódio e posteriormente lavadas com água destilada estéril. Cada material, foi anexado a tubos falcon contendo 15 mL de meio mínimo mineral (KH_2PO_4 , 0,7 g; K_2HPO_4 , 0,7 g; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,7 g; NH_4NO_3 , 1,0 g; NaCl, 0,005 g; $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,002g; $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,002g; $MnSO_4$, 0,001 g), em conjunto aos microrganismos identificados, enquanto o controle foi mantido, com as tiras estéreis em meio livre de microrganismos. Após a inoculação, os frascos foram deixados sob agitação em um shaker a 30°C, a uma velocidade de 150 rpm por 2 meses, sendo coletado amostras a cada 15 dias (USHA; SANGEETHA; PALANISWAMY, 2011). Para identificação de possíveis interferências na estrutura do material, as amostras coletadas passaram por análises, utilizando-se da Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR) (PARK; KIM, 2019).

Figura 10 – Metodologia para estudo da ação dos microrganismos em PEBD, através de meio líquido



Fonte: Adaptado de (USHA; SANGEETHA; PALANISWAMY, 2011).

4.3.3 Análise por Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier

Para analisar a ação do microrganismo atuando sobre a superfície do polímero anexado ao meio, realizou-se uma leitura das amostras coletadas, por meio de Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier em modo de reflexão total atenuada (ATR) (Spectrum 65 – Perkin Elmer) (Figura 11). As medições foram tomadas sob as faixas de frequência de $4000-400\text{ cm}^{-1}$, com 4 cm^{-1} de modo de

varredura. Além disso, realizou-se em conjunto uma leitura do branco, composto por um material sem inoculação de microrganismos, a fim de identificar a banda correspondente ao polímero (pedaços de sacolas plásticas) sem alterações de organismos em sua estrutura base (PARK; KIM, 2019).

Figura 11 – Equipamento utilizado para as análises Análise por Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)



Fonte: Autoria própria.

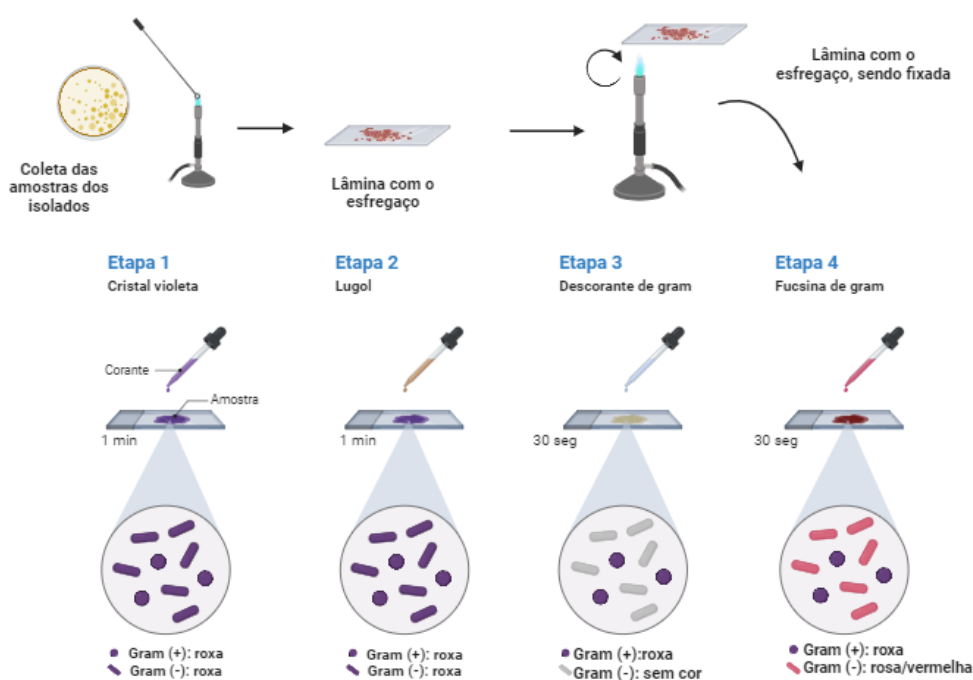
4.3.4 Coloração de Gram

Buscando-se identificar quanto as características morfológicas e segregar os diferentes grupos de microrganismos, encontrados após a obtenção dos halos das colônias positivas à degradação de polietileno, realizou-se a metodologia de gram, Figura 12 no qual subdividem-se os organismos em gram + e -. Através da coloração durante a visualização por microscopia, aqueles que apresentarem, tons arroxeados, tem-se como característica serem positivos, enquanto ao surgimento de matizes vermelhas, apontam-se como negativos (TRIPATHI; SAPRA, 2020). O processo de coloração, iniciou-se com a coleta da amostra de placas de materiais isolados, através de uma alça de inoculação previamente flambada em uma lamparina. Em conseguinte, realizou-se um esfregaço na lâmina de trabalho, em movimentos similares aos realizados na metodologia de isolamento. Com o material previamente inserido, por 5 vezes ou até a eliminação completa da água, procedeu-se a fixação da colônia, movimentando-se a lâmina sobre o fogo da lamparina (TRIPATHI; SAPRA, 2020; VERMELHO, 2006).

Com a adesão do material na lâmina, por meio de uma pipeta de pasteur, uma gota de corante Cristal violeta foi inserida sobre o fixado e deixada agir, por cerca

de 1 minuto, sendo lavado logo em seguida por água destilada. Retirado o excesso, acrescentou-se uma solução de lugol e por um minuto o manteve sobre a amostra, sendo logo em seguida realizado novamente uma lavagem do solvente. Em conseguinte, inclinou-se a lâmina e gotejou-se uma mistura descorante composta por dois solventes: álcool e acetona, até a o desaparecimento da cor roxa na amostra. Por fim, cobriu-se o esfregaço com fucsina de gram e o deixou sob atuação, por cerca de 30 segundos e em seguida lavou-se o excesso do corante. Com os esfregaços finalizados, as amostras foram levadas para análise em microscopia óptica, em objetiva de 40x para avaliar a distribuição do esfregaço, e então examinadas em lente objetiva de 100x com uma gota de óleo de imersão (BARTHOLOMEW; MITTWER, 1952 apud TRIPATHI; SAPRA, 2020).

Figura 12 – Etapas da coloração de Gram



Fonte: Adaptado de (VERMELHO, 2006).

4.3.5 Extração de DNA, Reação em cadeia de polimerase (PCR), Purificação e Sequenciamento amostral

Os microrganismos com sinal positivo para apresentação dos halos nos meios corados com Azul de Comassie-R, foram cultivados em meio líquido, Nutriente Ágar, e deixados em overnight em shaker, sob velocidade de 150 rpm a uma temperatura de 28°C, para dar início aos procedimentos de extração de seu DNA genômico e por meio do sequenciamento dos genes amplificados da PCR identificá-los.

Inicialmente, o procedimento parte-se com a extração das amostras de DNA, utilizando-se do kit Wizard® Genomic DNA Purification Kit, da PROMEGA, para DNA

bacteriano. Em eppendorfs, devidamente marcados, acrescentou-se 1000 μL (1 mL) de meio líquido contendo as colônias, logo em seguida, os tubos foram levados para centrifugação em velocidades de 13,000-16,000 \times g por 2 minutos. Após terminado o procedimento removeu-se o sobrenadante de cada amostra e adicionou-se 600 μL de Nuclei Lysis Solution, seguido de incubação a 80°C por 5 minutos para que ocorra a lise celular e liberação do DNA das células. Logo seguidamente, adicionou-se 3 μL de solução de RNase, para degradar o RNA e manter apenas o DNA no lisado. Posteriormente, inverteu-se o tubo de 2 a 5 vezes para homogeneizar e os frascos foram levados para incubação a 37°C por 15 a 60 minutos, os deixando para resfriar em temperatura ambiente. Para confirmar a presença de DNA, realizou-se uma eletroforese em gel de agarose. Aplicaram-se 5 μL do DNA extraído em poços no gel, utilizando corante específico para visualização por luz UV. A eletroforese foi conduzida a 120 V e 500 mA por 30 minutos.

Logo após a extração do DNA, realiza-se o procedimento da PCR (Reação em cadeia de polimerase), no qual partiu-se através da coleta de 2,0 μL de cada amostra extraída, colocando-as sob centrifugação, de 13,000 a 16,000 \times g por cerca de 2 minutos, com intuito de separar o peletizado, contendo as células e o sobrenadante referente ao meio líquido da amostra. Em seguida, preparou-se um "Mix de reação de PCR", sendo as quantidades de materiais acrescentados em cada amostra: 18 μL de H_2O ultrapura; 2,5 μL de tampão 10x; 0,5 de μL MgCl_2 ; 0,5 de μL *Primer Forward* (27F); 0,5 de μL *Prime reverse* (1462R); 0,5 de μL dNTP e 0,5 μL Taq DNA polimerase. Em cada eppendorf contendo o peletizado, acrescenta-se 23 μL do mix preparado.

A reação de PCR foi efetuada em um termociclador com etapas de amplificação do gene rDNA 16s, iniciando-se com o aquecimento da câmara de reação a uma temperatura de 94°C e manutenção da mesma durante 5 min para ativação da Taq DNA Polimerase. Na sequência, novamente decorre-se o aquecimento à 94°C por 30 segundos da câmara de reação, para que se suceda a desnaturação do fragmento de DNA alvo. Em seguida, a temperatura reduziu-se para 52°C durante 30s, permitindo o anelamento dos *primers* de cada um dos modelos de DNA de cadeia simples obtidos. Na sequência, ocorreu-se o ajuste da temperatura para 72°C, ideal para que ocorra a atividade da Taq DNA Polimerase sob 1 min, para extensão do DNA. Os processos de desnaturação, anelamento e extensão do DNA consistem em único ciclo, todavia, foram necessários 35 ciclos de 1 min a 94°C para obtenção de cópias do fragmento de DNA amplificado. Após o último ciclo, a temperatura foi mantida a 72°C durante 8 min para garantir que o DNA restante fosse completamente alongado. Por fim, a câmara de reação foi esfriada a 4°C por tempo indeterminado para armazenamento a curto período dos fragmentos de DNA genômico obtidos (AGUIAR, 2023). Como ocorrido na extração, realiza-se novamente uma eletroforese em gel de agarose, aplicando 5 μL do DNA amplificado nos poços do gel, conduzindo a eletroforese a 120 V e 500 mA por 30 minutos.

Logo após a PCR e formação dos genes amplificados, realizou-se a purificação dos materiais a fim de remover contaminantes e obter uma amostra limpa e concentrada de DNA. Para isso, o processo iniciou-se com uma solução contendo RNase e o lisado celular tratado, acrescidos com 200 μ L de Solução de Proteínas Precipitadas. Com o preparado realizado, as amostragens foram levadas para serem agitadas em vórtex por 20 segundos, com intuito de misturar as proteínas e o lisado celular. Por fim, a mistura passou por um processo de incubação em gelo, por 5 minutos. Passado o tempo descrito, centrifugou-se a 13,000–16,000 \times g por 3 minutos, o material aclimatado, neste caso, somente o sobrenadante contendo o DNA extraído foi transferido para um tubo autoclavado, contendo 600 μ L de isopropanol a 25°C, com o devido cuidado, a fim de não contaminar o DNA com as proteínas precipitadas. Gentilmente misturou-se a solução, até observar-se a formação de uma massa, indicativo de que há DNA na amostra de extração. Logo em seguida, os tubos foram centrifugados a 13,000–16,000 \times g por 2 minutos.

Após a centrifugação, retirou-se o excesso de líquido, por meio de drenagem em papel absorvente limpo. Em seguida, adicionou-se 600 μ L de etanol 70% e delicadamente inverteu-se o tubo, múltiplas vezes para lavar o peletizado contendo o DNA. Novamente, centrifugou-se a solução à 13,000–16,000 \times g por 2 minutos e retirou-se a solução de etanol. O precipitado, foi deixado secar em temperatura ambiente por 10 à 15 minutos reidratado com 100 μ L de Solução de Reidratação de DNA e incubado a 65°C por 1 hora. Periodicamente, o mix, foi agitado e realocado ao equipamento. Para confirmar se o material havia sido extraído, realizou-se uma eletroforese em gel de agarose aplicando 5 μ L do DNA amplificado e purificado, nos poços do gel, conduzindo a eletroforese a 120 V e 500 mA por 30 minutos. Para concluir, o produto final, foi deixado em overnight em temperatura de 4°C e armazenado de 2 a 8°C.

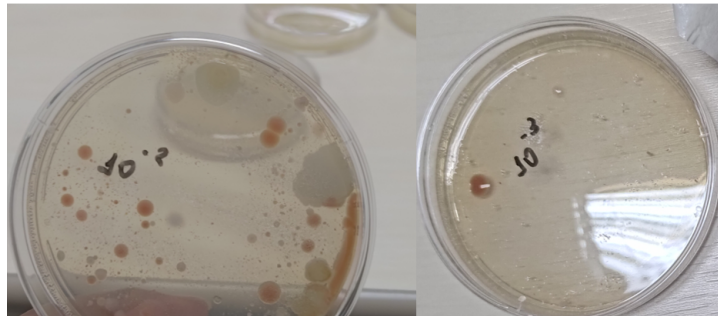
Com a confirmação que o DNA extraído inicialmente, foi amplificado e purificado corretamente, as amostras correspondentes aos microrganismos positivos a degradação de polietileno, foram enviadas para o sequenciamento genético de DNA em laboratório especializado. Em seguida, as sequências obtidas pelo sequenciamento foram comparadas e analisadas em similaridade ao banco de dados do National Center for Biotechnology Information (NCBI) utilizando-se do programa BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) .

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 RESULTADOS QUANTO AO ISOLAMENTO DOS MICRORGANISMOS

Partindo-se da metodologia de diluição seriada, por meio das soluções de 10^{-2} e 10^{-3} (Figura 13), inoculadas em placas contendo meio Nutriente Ágar, selecionou-se os microrganismos, para a etapa de isolamento. A segregação por parte das colônias distintas foram realizadas, através da apresentação das diversificadas morfologias, procedimento similar ao realizado por Tachibana et al. (2010), no qual segregou seus isolados por meio de características visuais apresentadas nas placas que surgiram após a incubação dos materiais diluídos. Fatores como a cor e de estruturas da colônia foram definidos como uma forma de análise e segregação dos microrganismos.

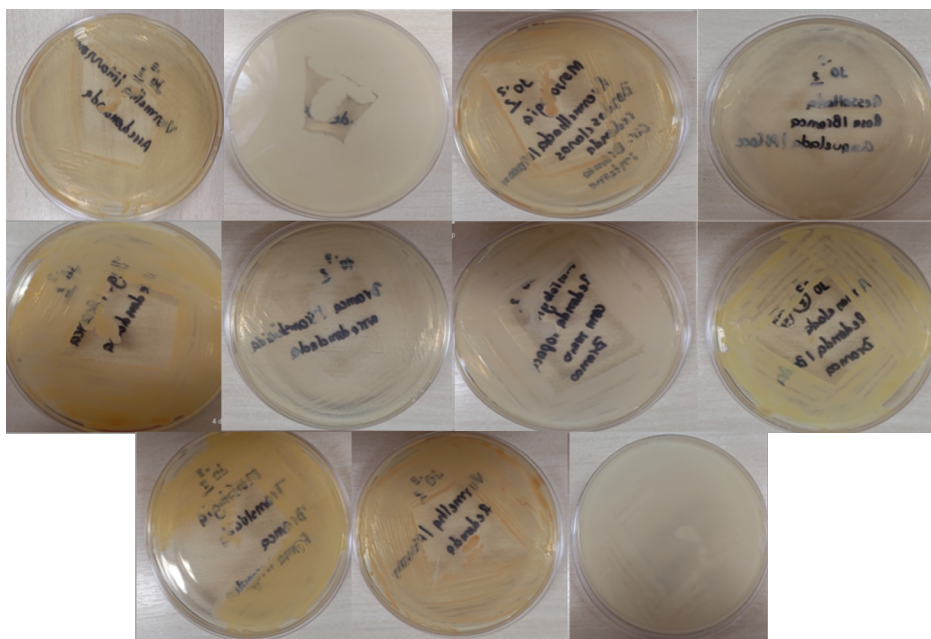
Figura 13 – Placas contendo os microrganismos resultantes das diluições de 10^{-2} e 10^{-3}



Fonte: Autoria própria.

Em relação a realização do isolamento, 11 microrganismos foram selecionados e isolados em placas de petri, contendo Nutriente Ágar. O isolamento das amostras auxiliaram no espalhamento das colônias e assim obter isolados puros, facilitando a análise futura, ao se inserir em meios específicos (NAKEI et al., 2022).

Figura 14 – Placas contendo os microrganismos isolados nas diluições de 10^{-2} e 10^{-3}



Fonte: Autoria própria.

5.2 IDENTIFICAÇÃO DE ISOLADOS DEGRADADORES DE POLIETILENO (PEBD)

Com a obtenção dos isolados, seguiu-se para a identificação das espécies coletadas, que possuem capacidade de degradar compostos com composição majoritária de polietileno, inoculando os microrganismos em um meio constituído por meio mínimo mineral, somados a um meio de comparação com PEG (4000), analogia realizada, pois a estrutura carbono-carbono do PEG tem uma forma similar ao do polietileno, todavia é mais solúvel em água do que o PE por causa da presença do grupo funcional hidroxila, o tornando mais fácil de degradar em relação ao polietileno. Os onze isolados segregados das diluições passaram por análise quanto ao desenvolvimento de halos ao redor das colônias inoculadas (NADEMO; SHIBESHI; GEMEDA, 2023; USHA; SANGEETHA; PALANISWAMY, 2011; NAKEI et al., 2022; WILKES; ARISTILDE, 2017).

Conforme apresentado na Tabela 5, dos onze isolados, identificados de acordo com suas colorações e formatos, gerados durante seus crescimentos em placa com meio Nutriente Ágar, nas diluições de 10^{-2} e 10^{-3} , apenas três apresentaram formação de halos após a coloração das placas, contendo o meio mínimo, em junção com o pó de polietileno. Como forma de identificação inicial, as espécies apontadas na Figura 15, foram descritas por meio de codinomes: “Branca Densa e Arredondada” (B.D.A), pertencente a estrutura 1; “Translúcida Branca Irregular” (T.B.I); referente a formação 2 e por fim concernente a nomeação “Amarelada Redonda Borda Branca” (A.R.B), a amostragem 3.

Os resultados apresentados para as placas na Figura 15, quanto a presença dos

Tabela 5 – Resultados apresentados quanto aos onze isolados e após a geração de halos em meio específico com pó de polietileno (0.94 g/mL a 25°C).

Características morfológicas		Diluições	Formação de halos
Cor	Formato		
Avermelhada/Marrom	Arredondada	10 ⁻²	-
Branca	Irregular	10 ⁻²	-
Rosa/Branco	Irregular	10 ⁻³	-
Branca/Bege	Arredondada	10 ⁻²	-
Avermelhada/Marrom	Arredondada	10 ⁻²	-
Branca	Irregular	10 ⁻²	+
Avermelhada/Marrom	Arredondada	10 ⁻²	-
Branca	Arredondada	10 ⁻²	+
Avermelhada/Marrom	Arredondada	10 ⁻³	-
Amarelada	Arredondada	10 ⁻³	+
Branca/Opaca	Arredondada	10 ⁻²	-
Branca/Translúcida	Arredondada	10 ⁻³	-

Fonte: Autoria própria.

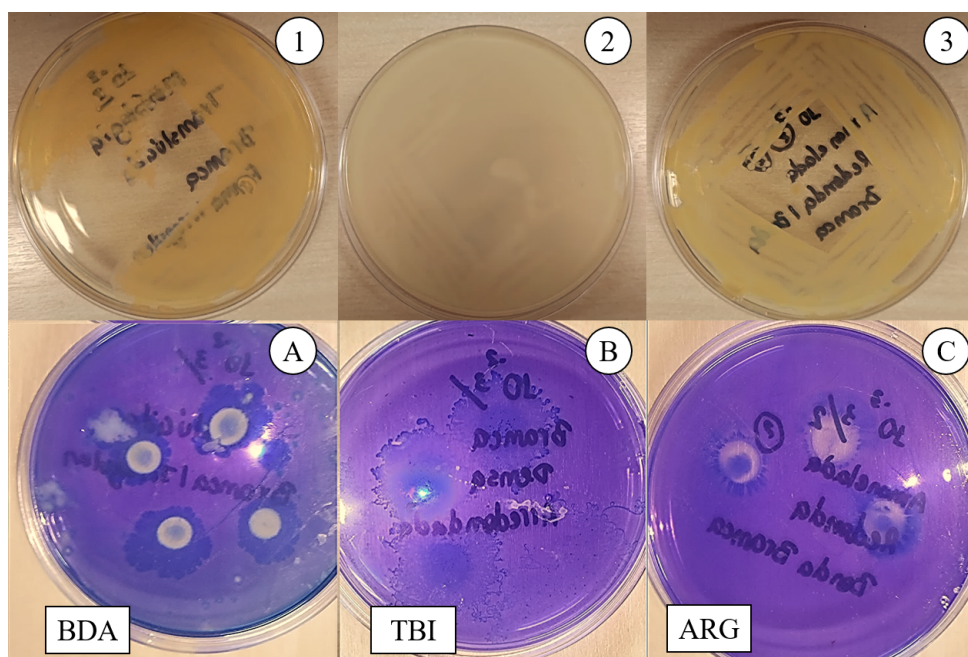
três microrganismos positivos para biodegradação de materiais poliméricos, devido a aparição zonas claras no fundo azul do corante, nos infere, que o organismo consumiu o polímero anexado ao meio mineral, fato esse descrito pelos autores Nademo, Shibeshi e Gameda (2023), após realizarem o mesmo procedimento em seus espécimes coletados e observarem, após a coração de seus meios, com Azul de Comassie-R. A presença dessas zonas, segundo Nakei et al. (2022), determina que por meio das aferições tomadas, é possível inferir quanto a capacidade de degradação dos organismos de estudo, sendo aquelas que possuírem diâmetros com medições mais perceptíveis, uma eficiência degradativa mais relevante quanto as demais. Levando o fato descrito, os resultados encontrados apontaram que a colônia B.D.A, foi quem apresentou maior diâmetro em termos de zonas claras, com o valor de 1,41 cm (14,1 mm), oposto a T.B.I, com 0,57 cm (5,7 mm) e A.R.G, que apresentou a menor medida em relação as outras duas espécies, com 0,48 cm (4,8 mm), medições e fatos descritos na Tabela 6.

Tabela 6 – Medidas dos halos em meio sólidos contendo PEG 4000 e pó de Polietileno

Tipos de microrganismos (cm)	Pó de Polietileno (cm)	PEG 4000 (cm)
B.D.A	1,406	1,432
T.B.I	0,561	0,658
A.R.G	0,478	0.175

Fonte: Autoria própria.

Figura 15 – Placas de microrganismos isolados, que apresentaram resultados positivos para degradação de polietileno, através da formação de halos



Fonte: Autoria própria.

Referente fenômeno, quanto a formação de halos nas placas contendo o polímero diluído, é reportado por Augusta, Müller e Widdecke (1993 apud ZEENAT et al., 2021), inferindo que as zonas claras são causadas pelas enzimas hidrolisantes extracelulares, secretadas pelos microrganismos alvo, que hidrolisam e suspendem o polímero em meio sólido, produzindo produtos solúveis em água ao mesmo tempo que geram esses espaços nos entornos das colônias. Essa metodologia, estima se o microrganismo trabalhado tem uma boa capacidade de excretar depolimerases, que hidrolisam os polímeros, em partes menores e de fácil assimilação para as espécies especificadas e aderidas ao meio.

A formação de zonas claras ao redor do halo indica que essas enzimas estão sendo excretadas, o que nos leva a inferir, que o microrganismo aplicado tem uma capacidade maior em degradar polímeros (LUCAS et al., 2008; BAHL et al., 2021). Tomada essa discussão e analisando os dados encontrados a bactéria B.D.A, no qual apresentou maiores diâmetros na amostragem do polímero e no padrão com PEG 4000, no leva a inferir que esse organismo, possui uma boa capacidade em excretar essas enzimas e assim o tornando um possível e potencial biodegradador de polímeros.

Para as três espécies B.D.A, T.B.I e A.R.G, foram realizadas a metodologia de coloração de gram, a fim de identificar e segregar os microrganismos que são gram-positivos ou gram-negativos. O princípio da técnica está baseado na diferenças de composições da parede celular de microrganismos e na capacidade de retenção dessa

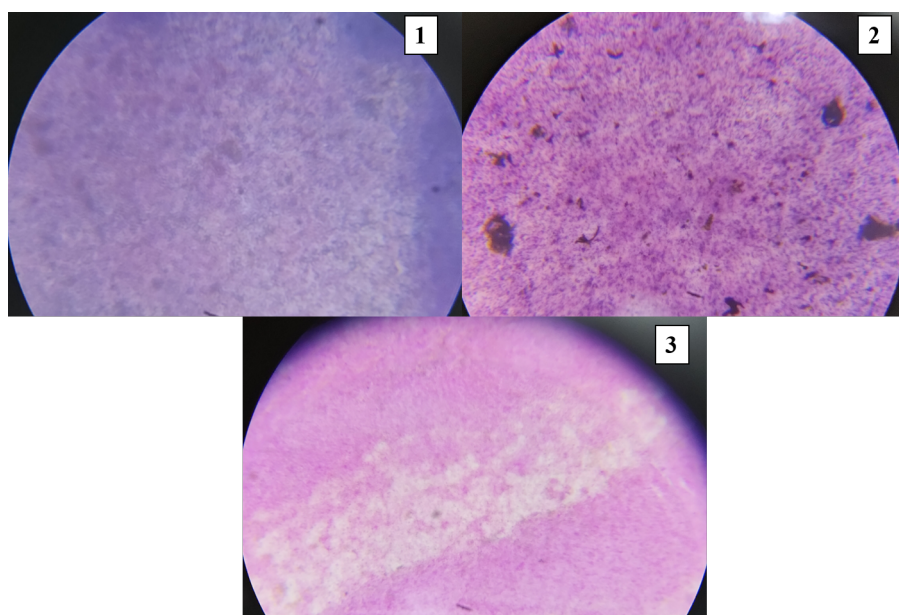
organela quanto aos corantes utilizados. As bactérias gram-positivas possuem uma parede celular mais espessa e diferente a das bactérias gram-negativas. Em princípio, os dois tipos de células se coram pelo cristal violeta associado ao iodo e o complexo formado por ambos acaba se ligando a componentes presentes na parede das bactérias positivas, que possuem na sua composição magnésio e ácidos ribonucleicos, formando um complexo (Mg-RNA-CV-I) de difícil remoção (VERMELHO, 2006).

Durante a utilização da mistura entre álcool e acetona, é onde se diferencia a composição das paredes celulares, pois os dois solventes, dissolvem os lipídios presentes nessas estruturas e desidratam as células. Caso o microrganismo, seja gram-positivo o corante com alto peso molecular, não se difunde para o meio extracelular, assim permanecendo com a cor arroxeada nas amostras. Em oposto, as gram-negativas, as camadas da parede celular que as constituem são extremamente mais delgadas, possuindo uma segunda membrana, mais externa, de natureza lipídica. Ao utilizar-se das soluções solventes, essa segunda segregação é solubilizada e como a camada de parede celular é mais fina, de composição diferente da parede das bactérias gram-positivas, o complexo cristal violeta/iodo se difunde, deixando a célula descorada, que quando aplicado o contra corante safranina, as células adquirem a cor rosada do novo corante (VERMELHO, 2006).

Tomadas essas analogias, após os procedimentos de coloração dos esfregaços contendo amostras celulares recolhidas de colônias crescidas em meio sólido e partindo-se dos resultados evidenciados na Figura 16, infere-se que B.D.A (1), pelo aparecimento de uma tonalidade arroxeada, considera-se que é uma espécie gram-positiva, enquanto A.R.G (3), que denotou-se uma coloração rosada, conclui-se que o microrganismo é uma espécie gram negativa e por fim T.B.I (2), no qual observou-se uma mistura das duas matizes encontradas na metodologia.

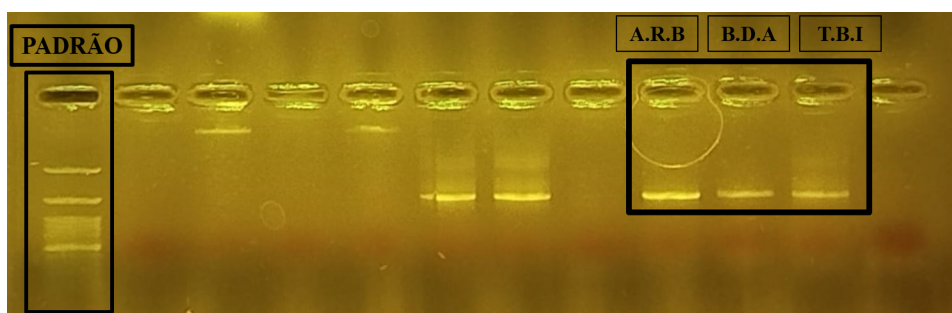
Com a coloração de gram realizada, buscou-se identificar a nível molecular por meio da PCR, as espécies dos microrganismos com detecção positiva para a degradação de polietileno (PEBD). Para confirmar que o material foi amplificado corretamente, realizou-se uma eletroforese em gel de agarose, conforme exposto na Figura 17, em que por meio da aparição de bandas no gel, observadas através do transiluminador UV, indicou-se que a reação de PCR foi bem sucedida, para os DNAs extraídos de cada amostra estudada (LIPAY; BIANCO, 2015).

Figura 16 – Microscopias ópticas em objetiva de 100x dos esfregaços, realizados após coloração de gram, das amostras que obtiveram crescimento positivo em meio com pó de polietileno



Fonte: Autoria própria.

Figura 17 – Eletroforese após a realização da PCR nas amostras de A.R.G, B.D.A e T.B.I



Fonte: Autoria própria.

Com a confirmação de extração do DNA e as sequências dos fragmentos de gene das linhagens isoladas sequenciadas, realizou-se com os resultados, uma comparação com dados semelhantes disponíveis no GenBank, por meio do alinhamento, permitindo a identificação dessas espécies, procedimentos similares, realizados pelos autores Aguiar (2023) e Peixoto (2013). Os resultados dos sequenciamentos indicaram, conforme apresentado na Tabela 7, com 97,87%, que a linhagem bacteriana da amostra B.D.A, é pertencente ao *Paenibacillus alvei*. Para A.R.G, com 98,83%, a linhagem é correspondente ao microrganismo *Rhodanobacter spathiphylli*. Em oposição, a amostra (T.B.I), apresentou durante a leitura das bandas em seu sequenciamento, uma duplicidade, o que pode ser inferir, que haja um possível consórcio entre dois microrganismos, fato esse denotado pela miscelânea de cores quanto a coloração de gram, conforme demonstrado na Figura 16, para a amostra (2), formação de halos (B), pertencentes a T.B.I.

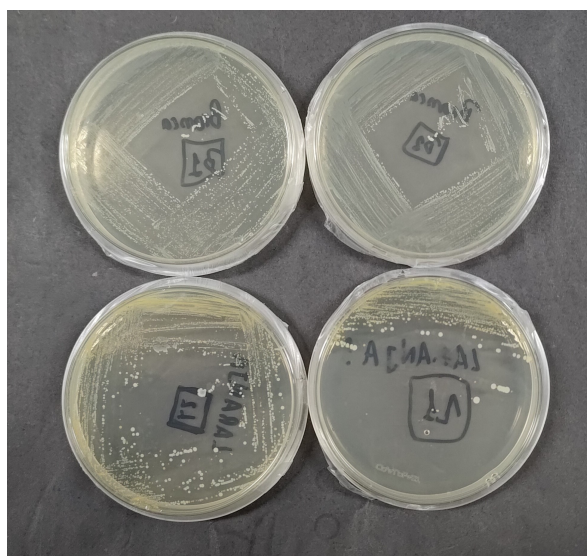
Tabela 7 – Microrganismos identificados após realização da PCR

Amostras	Diluição	Gram	Formação de halos	Espécie
Branca Irregular (T.B.I)	10 ⁻²	+/-	+	Inconclusiva*
Branca arredondada (B.D.A)	10 ⁻²	+	+	<i>Paenibacillus alvei</i>
Amarelada arredondada (A.R.G)	10 ⁻³	-	+	<i>Rhodanobacter spathiphylli</i>

Fonte: Autoria própria.

Observado essa situação com a amostra de T.B.I, buscou-se identificar, um possível consórcio entre microrganismos devido as características denotadas. Para isso e a tornar-se evidente tais fatos, realizou-se uma diluição seriada da amostra de cultivo líquido em Nutriente ágar, até a diluição de 10⁻³, no qual foi utilizada para cultivo em placa de petri, contendo meio NA (Nutriente Ágar) sólido. Com essa metodologia foi possível realizar a captura das colônias e observar os crescimentos distintos nas placas com as amostras, a fim de obter o isolamento das mesmas. Consoante a Figura 18, denota-se por meio da coloração das inoculações, a formação de dois microrganismos distintos na amostra de T.B.I, comprovando os fatos resultantes e observados na Figura 16 e pelo resultado inconclusivo do sequenciamento dessas amostras, relatado na Tabela 7.

Figura 18 – Placas de isolamento contendo isolados extraídos da amostra T.B.I



Fonte: Autoria própria.

5.3 ANÁLISE DOS MATERIAIS SÓLIDOS EM MEIO LIQUÍDO

Quanto às análises, dos materiais plásticos (sacolas plásticas) que foram depositados em meio líquido mineral e postas sob atuação dos microrganismos *Paenibacillus Alvei*, *Rhodanobacter spathiphylli* e T.B.I, por meio do FTIR, foi possível avaliar qualitativamente a extensão da oxidação do polímero e compreender o mecanismo de degradação, identificando funções químicas específicas formadas

durante a fase de oxidação, por meio das alterações nas bandas emitidas pelo equipamento. Para isso, há a necessidade de compreender o espectro FTIR e sua importância na detecção da degradação. Tendo em vista, o apontado, os gráficos para essa metodologia, se subdividem em 4 partes e que cada parte ou zona determina qual a dimensão estrutural trabalhada. Na zona (1), compreendida entre as bandas 2500-4000 cm^{-1} , encontram-se as bandas que representam as ligações simples das moléculas que constituem o material a ser analisado, na (2), entre 2000-2500 cm^{-1} , as triplas ligações, na (3), entre 1500-2000 cm^{-1} , as duplas ligações e por fim na (4), as zonas de impressão digital, segundo Nandiyanto, Ragadhita e Fiandini (2022).

Partindo-se disso e expandindo os conceitos para as estruturas poliméricas, em especial o polietileno, material base das amostras anexadas no meio líquido, Smith (2021), descreve que para se analisar as principais bandas que marcam o polietileno no FTIR, deve-se pontuar sua formação estrutural. Por serem compostos de hidrocarboneto, as principais características que os marcam é justamente sua linearidade e possuem apenas carbono e hidrogênio em suas composições. Os hidrocarbonetos mais simples, são os alcanos, que contêm CH_3 (metil) e CH_2 (unidades de metileno), devido a essas características os seus espectros são dominados pelos picos de alongamento e flexão C-H dos grupos metil e metileno. Quanto aos números de onda para essas condições durante a leitura do equipamento, pode se observar na Tabela 8, os valores que os condicionam.

Tabela 8 – Posição dos picos alongados correspondentes aos grupos metil e metileno

Vibração	Faixas de Número de Onda (cm^{-1})
CH_2 assimétrico	2917+-10
CH_2 simétrico	2852+-10
CH_3 assimétrico	1317+-10
CH simétrico	718+-10

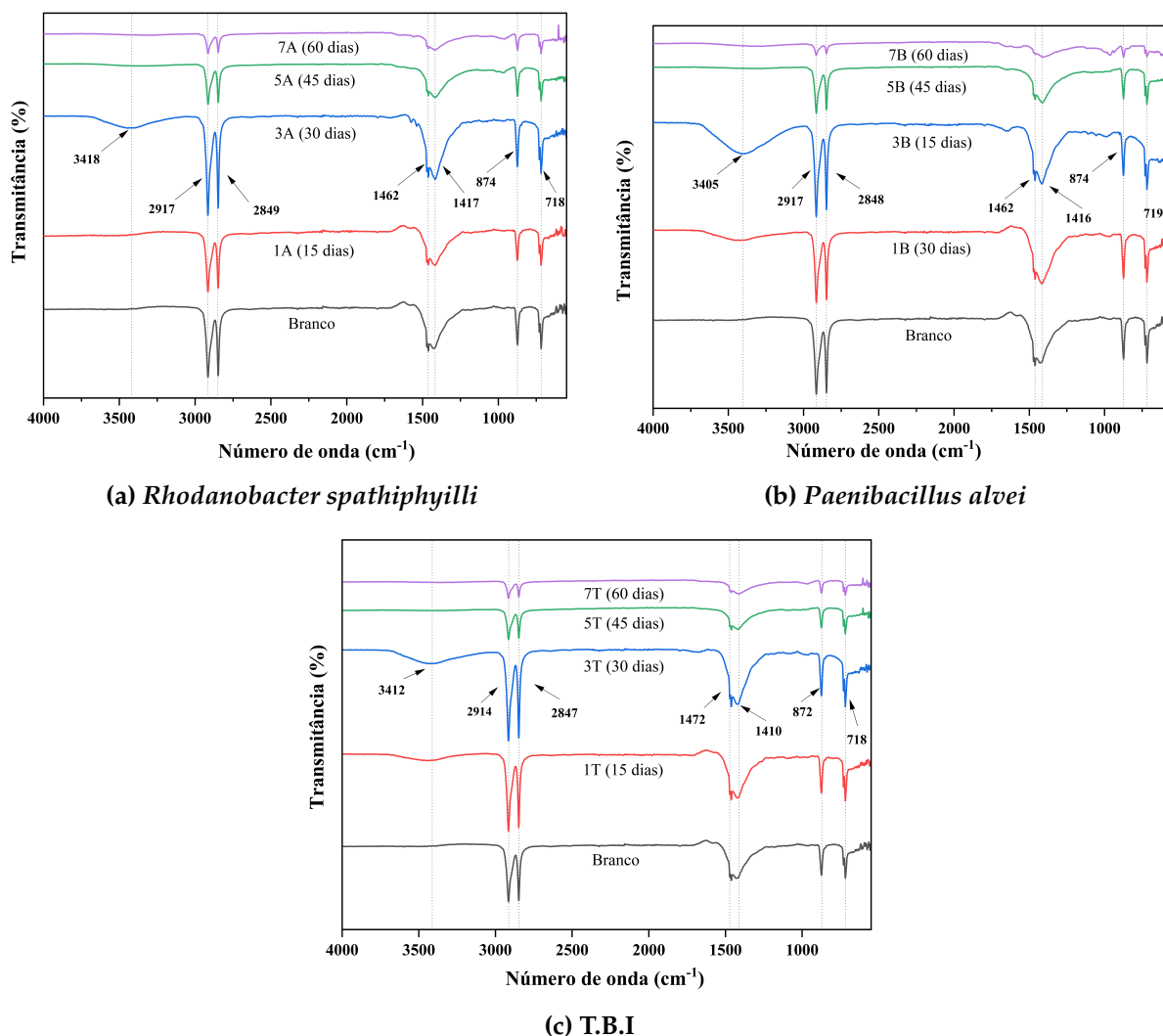
Fonte: Adaptado de (SMITH, 2021).

Em consonância e observando a Figura 19, que apresenta a leitura para as três amostras, denota-se que no branco, o material de controle, gerou-se uma formação gráfica característica para um composto que possui como classificação ser da família dos polietilenos, fato esse denotado na Tabela 8, que expõe os valores de referência similares para esses produtos, fato esse também designado pelos autores Gulmine et al. (2002 apud RAJANDAS et al., 2012), em que designam essas faixas, para o material com os seguintes valores: 2918 (CH_2) cm^{-1} , 2851 (CH_2) cm^{-1} , 1468 (CH_3) cm^{-1} , 1373 e 718 cm^{-1} (CH). Os picos, nos três gráficos se encontram dentro dessas condições e se apresentam nos comprimentos de onda, em proximidade ao valores apresentados

referentes a literatura: 2917 cm^{-1} para CH_2 assimétrico, 2848 cm^{-1} para CH_2 simétrico, 1416 cm^{-1} para bandas de CH_3 e 718 cm^{-1} para CH_2 .

Para adentrar quando a biodegradação polimérica, torna-se necessário compreender os mecanismos que ocorrem para que haja a biodegradação desses materiais. A primeira etapa do mecanismo geral de degradação do PE é a auto-oxidação, onde há formação inicial de radicais $\text{R}\bullet$ e $\text{H}\bullet$, que envolvem a ativação do PE, devido a perda de hidrogênio após entrada de energia ou a formação de complexos de transferência de carga. Essa reação gera um "efeito dominó" levando a formação de estruturas dentro do polímero ou a oxidação, via O_2 atmosférico e água da sua cadeia de carbono. Esta oxidação produz outras moléculas reativas que podem resultar na formação de outros radicais para reiniciar o processo ou estabilizar na forma de um grupo hidroxil, carbonil ou nitro e muitas vezes resultam em uma formação de um dupla de ligação (PEIXOTO; SILVA; KRUGER, 2017). As principais bandas a serem analisadas e que indicariam uma atuação do microrganismo na superfície do polímeros são: $\text{C}=\text{O}$, $\text{C}-\text{O}$ e $\text{O}-\text{H}$, devido ao fato de serem geradas durante essa etapa (SANDT et al., 2021).

Figura 19 – FTIR correspondentes aos três microrganismos positivos a degradação de polietileno



Partindo-se do descrito, ressalta-se que os materiais plásticos, não passaram por tratamentos químicos, para facilitar a abertura da molécula do composto, o que geraria novos picos nas regiões de 1000 a 1700 cm^{-1} . Levando-se em consideração, esse fator, observa-se que para os três microrganismos sobretudo na última banda correspondente aos dados 7A (*Rhodanobacter Spathiphylli*), 7B (*Paenibacillus alvei*) e 7T (T.B.I), para 60 dias de contato, uma diminuição significativa nas intensidades quando comparadas as bandas do branco, fato esse observado pelos autores Bardají, Furlan e Stehling (2019) e Park e Kim (2019), em suas análises, indicando que houve atuação significativa dos microrganismos nas amostras anexadas em meio líquido. É possível denotar nos três microrganismos, de forma mais acentuada no trigésimo dia, uma banda de C=O (carbonyl), entre 1650 e 1680 cm^{-1} , no qual segundo Adithama et al. (2023), indicam uma mudança no grupo éster, cetonas e aldeídos na molécula polimérica.

Na faixas de 3600-3200 cm^{-1} , observadas na Figura 19 das três amostras é

possível observar uma leve inflexão na banda nessas regiões, fato esse descrito por Kowalczyk et al. (2016) que aponta a correspondência ao grupo de -OH, advindo de um grupo carboxil. A presença do grupo hidroxil proporciona uma oxidação da cadeia de polietileno, em seguida, ocorre-se a fixação de um átomo de hidrogênio e a acidificação do meio. A acidificação do meio, indica a presença de metabólitos dos microrganismos, demonstrando sua ação degradativa. Quanto a oxidação, ela influencia na propriedades do polietileno, tornando a sua superfície mais adesiva e hidrofílica, aumentando a adesão e degradação bacteriana (WILKES; ARISTILDE, 2017). Assim como denotado pelas três espécies de amostras coletadas, em 3A, 3B e 3T, correspondentes ao trigésimo dia, Kowalczyk et al. (2016), denota que, o aparecimento desses picos, estão presentes entre os dias 36 e 40 do experimento, o que se assemelha com os dados coletados para as três espécies trabalhadas, que apresentaram, essas características entre trigésimo e o quadragésimo quinto dia, de degradação.

5.4 COMPRATIVOS ENTRE OS RESULTADOS ENCONTRADOS E AOS REFERENTES NA LITERATURA

Em assimilação ao descrito os organismos identificados referente a *Rhodanobacter spathiphylli* e a *Paenibacillus alvei*, apresentaram resultados próximos aos descritos na literatura. Quanto a *Rhodanobacter spathiphylli*, as pesquisas em termos de degradação de polímeros, ainda não foram expandidas, todavia, no gênero em que a espécie pertence, das *Rhodanobacter sp.*, encontra-se trabalhos quanto a biorremediação de compostos tóxicos no ambiente, como radiação, poluentes e metais bio acumuladores.

Quanto a *Paenibacillus alvei*, em termos de literatura, o microrganismo é bem conhecido no que tange a degradação de polietileno. Partindo-se de Park e Kim (2019), o autor descreve que o microrganismo extraído de uma amostra de solo, possuiu uma boa capacidade de degradação, pois apresentou, diminuição de bandas características no FTIR (2918 (CH_2), 2851 (CH_2), 1468 (CH_3), 1373 e 718 cm^{-1} (CH)), além de conseguir reduzir o peso do material após pesagem final. O mesmo foi suscitado, por Bardají, Furlan e Stehling (2019), que observou alterações na estrutura pelo FTIR e aparição de bandas, correspondentes a degradação e na superfície do polímero anexado ao meio líquido, por meio de microscopia eletrônica de varredura, denotou-se ranhuras e rachaduras no filme plástico.

As principais característica das bactérias do gênero *Rhodanobacter*, é serem microrganismos biorremediadores, diminuindo ou desaparecendo com as cargas moleculares acumuladas de compostos altamente tóxicos. Fato esse demonstrado por (GREEN et al., 2012), no qual determinou que bactérias do gênero *Rhodanobacter* detectadas em subsuperfícies contaminadas de um aterro nuclear, apresentaram uma boa capacidade em desnitrificar esses excedentes, ou seja, converter compostos de

nitrogênio, como o nitrato, em formas gasosas como óxidos e gás de nitrogênio. Além disso, Caldeira et al. (2021), expôs bactérias *Rhodanobacter sp.*, em ambientes contaminados por metais pesados como (alumínio, gálio e índio). Após a alocação, a espécie apresentou resistência as ações desses materiais, induzindo que esses organismos conseguem atuar como um possível biorremediador, por se manterem atuantes, sob condições adversas, como o baixo pH encontrado no meio reacional.

Buscando assimilar, com o desenvolvido, levando-se em conta que os polímeros são resultantes de bioacumulação, especialmente em forma de microplásticos, que persistem no ambiente por um longo período de tempo (ROY et al., 2021), por serem materiais que possuem como características alta resistência, serem rígidos, fortes e resistentes à corrosão, segundo (BRINSON et al., 2015). Partindo-se do exposto, pode-se inferir que esses microrganismos, tenham capacidade, mesmo ainda não sendo explorada, mas encontrada por meio da atuação da mesma, em meio contendo o polietileno como fonte principal de carbono para sua alimentação. Além disso, sua atuação sob a superfície do polímero em meio líquido, captada por meio da leitura do FTIR, demonstrou nas bandas geradas, características da atuação de um organismo degradando as estruturas do composto polimérico.

Em assimilação ao descrito, T.B.I, que apresentou por meio das técnicas, de gram e PCR, o apontamento de um provável consórcio entre duas espécies, e ainda não é possível inferir a qual espécie ambos os microrganismos presentes pertencem, mas por meio do resultado positivo quando a formação de halos, pode-se indicar que há dois potenciais degradadores. Essa caracterização, tem como princípio, o fato dos microrganismos degradantes de polímeros excretarem enzimas extracelulares que se difundem através do ágar e degradam o polímero em materiais solúveis em água, conforme explicita Tokiwa et al. (2009). Somados a isso, Adithama et al. (2023), ao corar suas amostras com Azul de Comassie-R, inferiu que a presença dessas zonas, indicaram que os isolados bacterianos, utilizaram-se do LDPE em pó que se encontravam superfície do ágar, como fonte de carbono, fato que se assemelhou a T.B.I, que no meio corado, obteve essa formação característica.

6 CONCLUSÃO

Por meio deste estudo, foi possível identificar possíveis degradadores de polietileno, ao se extrair as amostragens do solo do Aterro Sanitário, da cidade de Toledo, no estado do Paraná. A partir da seleção e isolamento dos organismos encontrados nesse recinto, partindo-se de metodologias no escopo da microbiologia, encontrou-se três organismos com referida atuação, ambos inicialmente designados como T.B.I, B.D.A e A.R.G.

Verificou-se após os isolamento dos microrganismos selecionados durante a diluição seriada, em meio de nutricional focado exclusivamente ao pó de polietileno agregado, que dos 11 isolados, três apresentaram a formação de halos no entorno de suas colônias. Essa formação mais clara, indica que houve uma atuação enzimática por parte dos microrganismos em degradar o composto suspenso. Quanto ao tamanho de cada halo apresentado, B.D.A, foi a que apresentou maior diâmetro de medição, seguida por de T.B.I e a A.R.B.

Para identificar esses microrganismos, realizou-se a PCR das amostras, no qual por meio do amplificação do gene 16s e sequenciamento do mesmo, foi possível por meio do gene sequenciado, pesquisar sequências similares no GenBank (BLAST). As espécies identificadas para cada isolado foram: a *Rhodanobacter Spathiphylli*, *Paenibacillus alvei* e T.B.I, no qual por ocorreu uma exceção durante o sequenciamento genético, pois apresentou-se, duas bandas distintas e ilegíveis, o que indica que há um consórcio de duas espécies atuando juntas, fato comprovado com a coloração de gram e isolamento das amostras. Através da coloração de gram, foi possível indicar características bioquímicas intrínsecas aos microrganismos.

Na caracterização pelo FTIR foram identificadas alterações significativas nas intensidades das bandas de cada microrganismo, nos seus grupamentos chaves do quadragésimo quinto dia ao sexagésimo dia. Os fatos podem ser explicados, pela presença de grupos -OH, no meio reacional, gerando acidificação do meio, que indica a presença de metabólitos desses organismos no meio reacional.

De modo geral, foi possível concluir que a bioprospecção realizada, encontrou microrganismos com boas capacidades de degradação de polímeros, em especial o polietileno, que se encontra na classe dos PEBD. Por meio dos experimentos realizados *Rhodanobacter Spathiphylli*, *Paenibacillus alvei* e do consórcio de microrganismos de T.B.I, foi possível observar essa relação. Por fim, através do determinado e dos ensaios realizados, foi possível abrir novas perspectivas quanto a ação dos microrganismos em materiais plásticos de deposição, apresentando novas espécies e ampliação dos conhecimentos retratados.

REFERÊNCIAS

- ABREMA. **PANORAMA DOS RESÍDUOS SÓLIDOS NO BRASIL 2023**. 2023. Disponível em: <https://www.abrema.org.br/panorama/>.
- ADAMS, S. M. Assessing cause and effect of multiple stressors on marine systems. **Marine Pollution Bulletin**, Elsevier BV, v. 51, n. 8–12, p. 649–657, jan 2005. ISSN 0025-326X. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.marpolbul.2004.11.040>.
- ADITHAMA, R. M. et al. Biodegradation of low-density polyethylene microplastic by new halotolerant bacteria isolated from saline mud in bledug kuwu, indonesia. **Bioresource Technology Reports**, Elsevier BV, v. 22, p. 101466, jun. 2023. ISSN 2589-014X. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biteb.2023.101466>.
- AGUIAR, A. P. Prospecção de fungos filamentosos marinhos na biodegradação de microplástico. Universidade Estadual Paulista (Unesp), 2023. Disponível em: <https://repositorio.unesp.br/items/e52c89de-99ba-4e7c-9479-4c9313ffaf52>.
- ALI, M. F.; ALI, B. M. E.; SPEIGHT, J. G. **Handbook of industrial chemistry**. [S.l.]: McGraw-Hill Companies, New York, 2005.
- ALIMBA, C. G.; FAGGIO, C. Microplastics in the marine environment: Current trends in environmental pollution and mechanisms of toxicological profile. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, Elsevier BV, v. 68, p. 61–74, maio 2019. ISSN 1382-6689. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.etap.2019.03.001>.
- ALSHEHREI, F. Biodegradation of synthetic and natural plastic by microorganisms. **Journal of Applied & Environmental Microbiology**, v. 5, n. 1, p. 8–19, 2017. Disponível em: <http://pubs.sciepub.com/jaem/5/1/2>.
- AUGUSTA, J.; MÜLLER, R.-J.; WIDDECKE, H. A rapid evaluation plate-test for the biodegradability of plastics. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Springer Science and Business Media LLC, v. 39, n. 4–5, p. 673–678, jul 1993. ISSN 1432-0614. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1007/BF00205073>.
- BAHL, S. et al. Biodegradation of plastics: A state of the art review. **Materials Today: Proceedings**, Elsevier BV, v. 39, p. 31–34, 2021. ISSN 2214-7853. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.matpr.2020.06.096>.
- BARDAJÍ, D. K. R.; FURLAN, J. P. R.; STEHLING, E. G. Isolation of a polyethylene degrading paenibacillus sp. from a landfill in brazil. **Archives of Microbiology**, Springer Science and Business Media LLC, v. 201, n. 5, p. 699–704, 2019. ISSN 1432-072X. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1007/s00203-019-01637-9>.
- BARTHOLOMEW, J. W.; MITTWER, T. The gram stain. **Bacteriological Reviews**, American Society for Microbiology, v. 16, n. 1, p. 1–29, mar. 1952. ISSN 0005-3678. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1128/br.16.1.1-29.1952>.
- BHARDWAJ, H.; GUPTA, R.; TIWARI, A. Communities of microbial enzymes associated with biodegradation of plastics. **Journal of Polymers and the Environment**, Springer Science and Business Media LLC, v. 21, n. 2, p. 575–579, 2012. ISSN 1572-8900. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1007/s10924-012-0456-z>.

BRINSON, H. F. et al. Characteristics, applications and properties of polymers. **Polymer engineering science and viscoelasticity: An introduction**, Springer, p. 57–100, 2015.

CALDEIRA, J. B. et al. Relevance of feoab system in rhodanobacter sp. b2a1ga4 resistance to heavy metals, aluminium, gallium, and indium. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Springer Science and Business Media LLC, v. 105, n. 8, p. 3301–3314, abr. 2021. ISSN 1432-0614. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1007/s00253-021-11254-6>.

CO-OPERATION, O. for E.; DEVELOPMENT. **Global Plastics Outlook: Economic Drivers, Environmental Impacts and Policy Options**. OECD, 2022. ISBN 9789264804234. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1787/de747aef-en>.

COMUNICAÇÃO. **O sétimo continente**. 2023. Disponível em: https://www.cedagro.org.br/noticia_completa.php?cod=42.

DOMMERGUES, Y.; MANGENOT, F. **Ecologie microbienne du sol**. [S.l.], 1970.

EUROPE, P. **Plastics – the fast Facts 2023**. <https://plasticseurope.org/knowledge-hub/plastics-the-fast-facts-2023/>, 2023.

GANDRA, A. **Índice de reciclagem no Brasil é de apenas 4Abrelpe**. 2022. Disponível em: <https://agenciabrasil.ebc.com.br/geral/noticia/2022-06/indice-de-reciclagem-no-brasil-e-de-4-diz-abrelpe>.

GREEN, S. J. et al. Denitrifying bacteria from the genus rhodanobacter dominate bacterial communities in the highly contaminated subsurface of a nuclear legacy waste site. **Applied and Environmental Microbiology**, American Society for Microbiology, v. 78, n. 4, p. 1039–1047, 2012. ISSN 1098-5336. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.06435-11>.

GULMINE, J. et al. Polyethylene characterization by ftir. **Polymer Testing**, Elsevier BV, v. 21, n. 5, p. 557–563, 2002. ISSN 0142-9418. Disponível em: [http://dx.doi.org/10.1016/S0142-9418\(01\)00124-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0142-9418(01)00124-6).

HADAD, D.; GERESH, S.; SIVAN, A. Biodegradation of polyethylene by the thermophilic bacterium *brevibacillus borstelensis*. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford University Press (OUP), v. 98, n. 5, p. 1093–1100, maio 2005. ISSN 1365-2672. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2672.2005.02553.x>.

IBGE. **Cartas e Mapas, coleções municipais**". 2024. Disponível em: https://geoftp.ibge.gov.br/cartas_e_mapas/mapas_municipais/colecao_de_mapas_municipais/2022/PR/toledo/.

JOEL, F. R. **Polymer science & technology: introduction to polymer science**. Eds, v. 3, p. 4–9, 1995.

JR, S. V. C. **Ciência dos polímeros**. Artiliber editora, São Paulo, v. 24, 2002.

JUNG, J.-W. et al. Chronic toxicity of endocrine disrupting chemicals used in plastic products in korean resident species: Implications for aquatic ecological risk assessment. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, Elsevier BV, v. 192, p. 110309, abril 2020. ISSN 0147-6513. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.110309>.

KHAMPRATUENG, P.; RICE, D.; ANAL, A. K. Biodegradation of low-density polyethylene by the bacterial strains isolated from the dumping site community. **Discover Applied Sciences**, Springer, v. 6, n. 7, p. 348, 2024.

KOWALCZYK, A. et al. *Achromobacter xylosoxidans* as a new microorganism strain colonizing high-density polyethylene as a key step to its biodegradation. **Environmental Science and Pollution Research**, Springer Science and Business Media LLC, v. 23, n. 11, p. 11349–11356, 2016. ISSN 1614-7499. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1007/s11356-016-6563-y>.

KRZAN, A. et al. Standardization and certification in the area of environmentally degradable plastics. **Polymer Degradation and Stability**, Elsevier BV, v. 91, n. 12, p. 2819–2833, 2006. ISSN 0141-3910. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.polymdegradstab.2006.04.034>.

LEE, G. H. et al. Biotechnological plastic degradation and valorization using systems metabolic engineering. **International Journal of Molecular Sciences**, MDPI AG, v. 24, n. 20, p. 15181, 2023. ISSN 1422-0067. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.3390/IJMS242015181>.

LIPAY, M. V.; BIANCO, B. *Biologia molecular: métodos e interpretação*. Rio de Janeiro: Roca, 2015.

LOKENS GARD, E. **Plásticos Industriais: teoria e aplicações**. [S.l.]: Cengage Learning Edições, 2013.

LUCAS, N. et al. Polymer biodegradation: Mechanisms and estimation techniques – a review. **Chemosphere**, Elsevier BV, v. 73, n. 4, p. 429–442, set 2008. ISSN 0045-6535. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2008.06.064>.

MALLISETTY, R. et al. Biodegradation of low density polyethylene (ldpe) by *paenibacillus* sp. and *serratia* sp. isolated from marine soil sample. **Materials Today: Proceedings**, Elsevier BV, jun. 2023. ISSN 2214-7853. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.matpr.2023.05.639>.

MICHAELI, W. et al. **Tecnologia dos plásticos**. [S.l.]: Editora Blucher, 1995.

NADEMO, Z. M.; SHIBESHI, N. T.; GEMEDA, M. T. Isolation and screening of low-density polyethylene (ldpe) bags degrading bacteria from addis ababa municipal solid waste disposal site “koshe”. **Annals of Microbiology**, Springer Science and Business Media LLC, v. 73, n. 1, jan 2023. ISSN 1869-2044. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1186/s13213-023-01711-0>.

NAKEI, M. D. et al. **Degradation of polyethylene plastic bags and bottles using microorganisms isolated from soils of Morogoro, Tanzania**. Frontiers Media SA, 2022. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2022.1077588>.

NANDIYANTO, A. B. D.; RAGADHITA, R.; FIANDINI, M. Interpretation of fourier transform infrared spectra (ftir): A practical approach in the polymer/plastic thermal decomposition. **Indonesian Journal of Science and Technology**, Universitas Pendidikan Indonesia (UPI), v. 8, n. 1, p. 113–126, 2022. ISSN 2528-1410. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.17509/ijost.v8i1.53297>.

NATURE. **The future of plastic**. 2018. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41467-018-04565-2>.

NIELSEN, T. D. et al. Politics and the plastic crisis: A review throughout the plastic life cycle. **WIREs Energy and Environment**, Wiley, v. 9, n. 1, ago 2019. ISSN 2041-840X. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1002/wene.360>.

ODIAN, G. Wiley, 2004. 1–38 p. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1002/047147875X.ch1>.

OTAKE, Y. et al. Biodegradation of low-density polyethylene, polystyrene, polyvinyl chloride, and urea formaldehyde resin buried under soil for over 32 years. **Journal of Applied Polymer Science**, Wiley, v. 56, n. 13, p. 1789–1796, jun 1995. ISSN 1097-4628. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1002/app.1995.070561309>.

PAOLI, M. A. D. **Degradação e estabilização de polímeros**. [S.l.]: Artliber São Paulo, 2009.

PARK, S. Y.; KIM, C. G. Biodegradation of micro-polyethylene particles by bacterial colonization of a mixed microbial consortium isolated from a landfill site. **Chemosphere**, Elsevier BV, v. 222, p. 527–533, maio 2019. ISSN 0045-6535. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.01.159>.

PEIXOTO, J.; SILVA, L. P.; KRUGER, R. H. Brazilian cerrado soil reveals an untapped microbial potential for unpretreated polyethylene biodegradation. **Journal of Hazardous Materials**, Elsevier BV, v. 324, p. 634–644, 2017. ISSN 0304-3894. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhazmat.2016.11.037>.

PEIXOTO, J. B. Prospecção de microorganismos com potencial para biodegradação de polietileno. 2013. Disponível em: <https://repositorio.unb.br/handle/10482/15429>.

POTTS, J. **Biodégradation. In aspects of degradation and stabilization of polymers**. HHG Jellinek. [S.l.]: Elsevier Scientific Publishing Co, 1978.

RAJANDAS, H. et al. A novel ftir-atr spectroscopy based technique for the estimation of low-density polyethylene biodegradation. **Polymer Testing**, Elsevier BV, v. 31, n. 8, p. 1094–1099, 2012. ISSN 0142-9418. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.polymertesting.2012.07.015>.

RÅNBY, B. Photodegradation and photo-oxidation of synthetic polymers. **Journal of Analytical and Applied Pyrolysis**, Elsevier BV, v. 15, p. 237–247, mar 1989. ISSN 0165-2370. Disponível em: [http://dx.doi.org/10.1016/0165-2370\(89\)85037-5](http://dx.doi.org/10.1016/0165-2370(89)85037-5).

ROY, R. et al. Isolation of a soil bacterium for remediation of polyurethane and low-density polyethylene: a promising tool towards sustainable cleanup of the environment. **3 Biotech**, Springer Science and Business Media LLC, v. 11, n. 1, jan. 2021. ISSN 2190-5738. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1007/s13205-020-02592-9>.

SANDT, C. et al. Use and misuse of ftir spectroscopy for studying the bio-oxidation of plastics. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, Elsevier BV, v. 258, p. 119841, set 2021. ISSN 1386-1425. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.saa.2021.119841>.

- SEN, S. K.; RAUT, S. Microbial degradation of low density polyethylene (ldpe): A review. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, Elsevier BV, v. 3, n. 1, p. 462–473, mar 2015. ISSN 2213-3437. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jece.2015.01.003>.
- SEYMOUR, R. B. Polymer science before and after 1899: Notable developments during the lifetime of maurits dekker. **Journal of Macromolecular Science: Part A - Chemistry**, Informa UK Limited, v. 26, n. 8, p. 1023–1032, ago 1989. ISSN 0022-233X. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1080/00222338908052032>.
- SHAH, A. A. et al. Biological degradation of plastics: A comprehensive review. **Biotechnology Advances**, Elsevier BV, v. 26, n. 3, p. 246–265, maio 2008. ISSN 0734-9750. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2007.12.005>.
- SIVAN, A.; SZANTO, M.; PAVLOV, V. Biofilm development of the polyethylene-degrading bacterium rhodococcus ruber. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Springer Science and Business Media LLC, v. 72, n. 2, p. 346–352, mar. 2006. ISSN 1432-0614. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1007/s00253-005-0259-4>.
- SMITH, B. The infrared spectra of polymers ii: polyethylene. MJH Life Sciences, 2021. Disponível em: <https://www.spectroscopyonline.com/view/the-infrared-spectra-of-polymers-ii-polyethylene>.
- SPEIGHT, J. G. Monomers, polymers, and plastics. **Handbook of Industrial Hydrocarbon Processes**, Gulf Professional Publishing, v. 2, p. 597–649, 2020.
- TACHIBANA, K. et al. Isolation and characterization of microorganisms degrading nylon 4 in the composted soil. **Polymer Degradation and Stability**, Elsevier BV, v. 95, n. 6, p. 912–917, jun. 2010. ISSN 0141-3910. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.polymdegradstab.2010.03.031>.
- THOMPSON, R. C. et al. Plastics, the environment and human health: current consensus and future trends. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, The Royal Society, v. 364, n. 1526, p. 2153–2166, jul 2009. ISSN 1471-2970. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1098/rstb.2009.0053>.
- THUSHARI, G.; SENEVIRATHNA, J. Plastic pollution in the marine environment. **Heliyon**, Elsevier BV, v. 6, n. 8, p. e04709, ago 2020. ISSN 2405-8440. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e04709>.
- TOKIWA, Y. et al. Biodegradability of plastics. **International Journal of Molecular Sciences**, MDPI AG, v. 10, n. 9, p. 3722–3742, 2009. ISSN 1422-0067. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.3390/ijms10093722>.
- TOLINSKI, M. **Additives for polyolefins: getting the most out of polypropylene, polyethylene and TPO**. [S.l.]: William Andrew, 2015.
- TRIPATHI, N.; SAPRA, A. Gram staining. 2020.
- USHA, R.; SANGEETHA, T.; PALANISWAMY, M. Screening of polyethylene degrading microorganisms from garbage soil. **Libyan agriculture research center journal international**, v. 2, n. 4, p. 200–204, 2011.
- VERMELHO, A. B. **Práticas de microbiologia**. [S.l.]: Guanabara Koogan, 2006.

WILKES, R.; ARISTILDE, L. Degradation and metabolism of synthetic plastics and associated products by pseudomonas sp.: capabilities and challenges. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford University Press (OUP), v. 123, n. 3, p. 582–593, 2017. ISSN 1364-5072. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1111/jam.13472>.

YAO, Z.; SEONG, H. J.; JANG, Y.-S. Environmental toxicity and decomposition of polyethylene. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, Elsevier BV, v. 242, p. 113933, set 2022. ISSN 0147-6513. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ecoenv.2022.113933>.

ZEENAT et al. Plastics degradation by microbes: A sustainable approach. **Journal of King Saud University - Science**, Elsevier BV, v. 33, n. 6, p. 101538, set 2021. ISSN 1018-3647. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jksus.2021.101538>.