



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO SEMI-ÁRIDO
PRÓ-REITORIA DE GRADUAÇÃO
DEPARTAMENTO DE BIOCÊNCIAS
CURSO DE BACHARELADO EM BIOTECNOLOGIA

MARIA CAROLINA ROCHA DEL PICCHIA MONTEIRO AMARAL

**PROSPECÇÃO DE BACTÉRIAS EM ATERRO SANITÁRIO E
AVALIAÇÃO DO POTENCIAL BIORREMEDIADOR DE
POLIETILENO DE ALTA DENSIDADE (PEAD)**

MOSSORÓ, RN

2024

MARIA CAROLINA ROCHA DEL PICCHIA MONTEIRO AMARAL

**PROSPECÇÃO DE BACTÉRIAS EM ATERRO SANITÁRIO E
AVALIAÇÃO DO POTENCIAL BIORREMEDIADOR DE
POLIETILENO DE ALTA DENSIDADE (PEAD)**

Monografia apresentada à Universidade Federal Rural do Semi-árido como parte dos requisitos para obtenção de título de Bacharel em Biotecnologia.

Orientadora: Lidianne Leal Rocha, Profa. Dra.

MOSSORÓ, RN

2024

© Todos os direitos estão reservados a Universidade Federal Rural do Semi-Árido. O conteúdo desta obra é de inteira responsabilidade do (a) autor (a), sendo o mesmo, passível de sanções administrativas ou penais, caso sejam infringidas as leis que regulamentam a Propriedade Intelectual, respectivamente, Patentes: Lei nº 9.279/1996 e Direitos Autorais: Lei nº 9.610/1998. O conteúdo desta obra tomar-se-á de domínio público após a data de defesa e homologação da sua respectiva ata. A mesma poderá servir de base literária para novas pesquisas, desde que a obra e seu (a) respectivo (a) autor (a) sejam devidamente citados e mencionados os seus créditos bibliográficos.

AA485p Amaral, Maria Carolina Rocha Del Picchia Monteiro.
Prospecção de bactérias em aterro sanitário e avaliação do potencial biorremediador de polietileno de alta densidade (PEAD)
/ Maria Carolina Rocha Del Picchia Monteiro Amaral. - 2024.
65 f. : il.

Orientadora: Lidianne Leal Rocha. Monografia (graduação) - Universidade Federal Rural do Semi-árido, Curso de Biotecnologia, 2024.

1. Plástico. 2. Biodegradação. 3. Bactérias. 4. Aterros sanitários. I. Rocha, Lidianne Leal, orient. II. Título.

Ficha catalográfica elaborada por sistema gerador automático em conformidade com AACR2 e os dados fornecidos pelo autor(a).

Biblioteca Campus Mossoró / Setor de Informação e Referência

Bibliotecária: Keina Cristina Santos Sousa e Silva

CRB: 15/120

O serviço de Geração Automática de Ficha Catalográfica para Trabalhos de Conclusão de Curso (TCC's) foi desenvolvido pelo Instituto de Ciências Matemáticas e de Computação da Universidade de São Paulo (USP) e gentilmente cedido para o Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal Rural do Semi-Árido (SISBI-UFERSA), sendo customizado pela Superintendência de Tecnologia da Informação e Comunicação (SUTIC) sob orientação dos bibliotecários da instituição para ser adaptado às necessidades dos alunos dos Cursos de Graduação e Programas de Pós-Graduação da Universidade.

MARIA CAROLINA ROCHA DEL PICCHIA MONTEIRO AMARAL

PROSPECÇÃO DE BACTÉRIAS EM ATERRO SANITÁRIO E AVALIAÇÃO DO POTENCIAL BIORREMEDIADOR DE POLIETILENO DE ALTA DENSIDADE (PEAD)

Monografia apresentada à Universidade Federal Rural do Semi-árido como parte dos requisitos para obtenção de título de Bacharel em Biotecnologia.

Defendido em: 19/04/2024

BANCA EXAMINADORA

Documento assinado digitalmente
 **LIDIANNE LEAL ROCHA**
Data: 25/04/2024 20:15:51-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Lidiane Leal Rocha, Profa. Dra. (UFERSA)
Presidente

Documento assinado digitalmente
 **EMANUELLE FONTENELE RABELO**
Data: 26/04/2024 11:41:12-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Emanuelle Fontenele Rabelo, Profa. Dra. (UFERSA)
Membro Examinador

Documento assinado digitalmente
 **LÍVIO CARVALHO DE FIGUEIREDO**
Data: 26/04/2024 15:58:03-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Lívio de Carvalho Figueirêdo, Prof. Dr. (UFERSA)
Membro Examinador

Aos meus exemplos de garra e determinação, Michelle e Sônia, dedico.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Espiritualidade por até aqui me sustentar e me dar a força necessária para conquistar os meus sonhos e objetivos.

Agradeço aos meus pais, Michelle e Ricardo, avó Sônia, e madrastra Amanda, por todo suporte e amor. Sem vocês, nada disso seria possível.

Aos meus irmãos, Marcos e Priscilla, que mesmo longe tornam a vida mais leve.

Aos meus amigos, Lorena e Leonardo, pela parceria, ombro amigo, suporte e momentos felizes durante todos esses anos de convivência. Com vocês, essa vivência foi muito mais divertida.

À Beatriz por todo suporte psicológico e emocional. Sem você, a jornada teria sido árdua.

Aos meus amigos, Thairone e Caio, por toda ajuda nessa reta final, pelas palavras de apoio, amizade e momentos alegres.

Ao Hian, por toda parceria, apoio e suporte. Você me ajuda a ver o lado bom de tudo, mesmo quando a situação está caótica.

Aos meus amigos, Livia, Mariana, Thiago, Ariel, Dantas e Gabriel. Vocês tornaram os anos de faculdade mais divertidos e especiais.

Aos meus amigos do LABCEMOL, Brito e Luciano, por estarem comigo no início, me ensinarem tanto e compartilharem comigo dias tão produtivos e divertidos.

À Sara, pela amizade repentina, por me ensinar e incentivar tanto e, se for necessário, me jogar do penhasco.

Aos meus amigos do LABIOMA, Liv, Adelino, Layza e Wellison, por tornarem os dias de trabalho mais leves.

À Profa. Dra. Lidianne Leal, pelo aceite em me orientar na pesquisa, sempre contribuindo para o meu desenvolvimento profissional de forma humanizada.

À banca examinadora, pela disponibilidade e contribuições necessárias para este trabalho.

À UFERSA, pelo apoio estrutural e pelas oportunidades profissionais que me foram geradas.

RESUMO

Os plásticos são um dos principais problemas ambientais da atualidade. Entre eles, o polietileno de alta densidade (PEAD) destaca-se por possuir alto peso molecular e hidrofobicidade. Aliado a isso, seu descarte frequente e sua lenta taxa de decomposição, favorecem sua recalcitrância no ambiente. O uso de bactérias de diferentes locais tem sido relatadas na biodegradação de variados polímeros, uma vez que estas conseguem liberar compostos e enzimas, facilitando a mineralização destes. No entanto, poucos estudos investigam e demonstram níveis satisfatórios de biodegradação de PEAD por bactérias. O objetivo do trabalho foi isolar bactérias de um aterro sanitário e investigar o potencial destas para degradação plástica. Amostras de solo, resíduos plásticos e chorume foram coletados do aterro sanitário do município de Mossoró (RN), a partir de diferentes pontos. O protocolo de isolamento dividiu-se em dois grupos, com e sem pré-enriquecimento com BHI, contendo discos de PEAD. As amostras foram agitadas à temperatura ambiente por 45 dias e repicadas para obtenção de culturas puras. As bactérias obtidas foram caracterizadas morfológicamente e quanto a resposta tintorial. Todos os isolados foram investigados quanto a capacidade de degradar polietilenoglicol (PEG) como triagem para a degradação de polietileno. Foi avaliada a produção de enzimas lipases, esterases e lacases, com a utilização de meios seletivos, para cálculo do índice enzimático. Foram obtidos 46 isolados, onde a maioria foi proveniente do solo próximo da célula inativa. Deste total, 20 isolados configuram-se como promissores degradadores de polietileno. Foi observado a produção de lipases por 4 isolados em meio contendo Tween 80, já no meio contendo azeite de oliva 1% foram observados a produção por 12 isolados. A produção de esterase foi observada em 13 isolados. Os testes para detecção de lacases revelaram a adsorção do Azul de Bromofenol por 25 isolados, já quando utilizado o guaiacol como substrato, foi detectado produção em 8 isolados. Os dados sugerem que isolados prospectados do aterro sanitário são potenciais degradadores de polietileno e produtores de enzimas-chave em processos de biorremediação, os quais poderão ser investigados posteriormente na degradação de PEAD.

Palavras-chave: plástico, biodegradação, bactérias, aterros sanitários.

ABSTRACT

Plastics are one of the main environmental issues today. Among them, high-density polyethylene (HDPE) stands out for its high molecular weight and hydrophobicity. Coupled with frequent disposal and its slow decomposition rate, this favors its persistence in the environment. The use of bacteria from different sources has been reported in the biodegradation of various polymers, as they can release compounds and enzymes, facilitating their mineralization. However, few studies investigate and demonstrate satisfactory levels of HDPE biodegradation by bacteria. The objective of this study was to isolate bacteria from a landfill and investigate their potential for plastic degradation. Soil samples, plastic residues, and leachate were collected from the landfill in Mossoró (RN), from different points. The isolation protocol was divided into two groups, with and without pre-enrichment with BHI, containing HDPE discs. The samples were agitated at room temperature for 45 days and subcultured to obtain pure cultures. The obtained bacteria were characterized morphologically and by staining response. All isolates were screened for their ability to degrade polyethylene glycol (PEG) as a screening for polyethylene degradation. The production of lipases, esterases, and laccases was evaluated using selective media to calculate the enzymatic index. Forty-six isolates were obtained, with the majority coming from soil near the inactive cell. Of these, 20 isolates were identified as promising polyethylene degraders. Lipase production was observed in 4 isolates in medium containing Tween 80, while in medium containing 1% olive oil, production was observed in 12 isolates. Esterase production was observed in 13 isolates. Tests for laccase detection revealed Bromophenol Blue adsorption by 25 isolates, while when guaiacol was used as a substrate, production was detected in 8 isolates. The data suggest that isolates from the landfill are potential polyethylene degraders and producers of key enzymes in bioremediation processes, which could be further investigated for HDPE degradation.

Keywords: plastic, biodegradation, bacteria, landfills.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	- Distribuição mundial da produção de plásticos.....	17
Figura 2	- Relação dos principais plásticos consumidos no Brasil no ano de 2022.....	18
Figura 3	- Lixo contendo resíduos plásticos depositados no Aterro Sanitário de Mossoró (RN).....	21
Figura 4	- Esquema da degradação plástica e seus mecanismos.	23
Figura 5	- Resíduos plásticos em lixão.....	25
Figura 6	- Ilha de plástico do Pacífico.....	27
Figura 7	- Consequências do plástico na vida animal.....	28
Figura 8	- Mapa de Mossoró (RN), destacando a localização do aterro sanitário.....	37
Figura 9	- Imagem de célula inativa (A), tanque de chorume estabilizado (B), célula ativa (C) e tanque de chorume jovem (D) do aterro de Mossoró.....	38
Figura 10	- Sacolas e discos plásticos de PEAD.....	39
Figura 11	- Isolados obtidos ao final da etapa de isolamento, em placas de AN.....	46
Figura 12	- Zona clara gerada pela ação do isolado A2.6, no meio contendo PEG.	48
Figura 13	- Presença de halo de hidrólise e precipitado insolúvel ao redor das colônias, em meio contendo Tween 20 para detecção de esterase.....	49
Figura 14	- Isolados que adsorveram Azul de Bromofenol e apresentaram coloração diferente do habitual.....	55
Figura 15	- Isolados em placas suplementadas com guaiacol, onde a bactéria identificada como C1.2 exibiu mudanças de coloração do branco para castanho (seta).....	57

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Reagentes constituintes do Meio Salino Mínimo (MSM) e suas concentrações (g/L)	41
Tabela 2 - Triagem de isolados bacterianos com potencial para degradação de PEG.....	47
Tabela 3 - Detecção de linhagens produtoras de lipase (Tween 80).....	50
Tabela 4 - Detecção de linhagens produtoras de lipase em meio contendo azeite 1% e tween 20 0,2%.....	51
Tabela 5 - Bactérias produtoras de esterase em meio contendo tween 20.....	52
Tabela 6 - Isolados bacterianos que apresentaram capacidade de adsorção do Azul de Bromofenol.....	54
Tabela 7 - Isolados positivos para produção de lacase com guaiacol.....	56
Tabela 8 - Caracterização tintorial e morfológica dos isolados que apresentaram mecanismos de degradação de PEG e produção de enzimas, visualizados em microscópio óptico.....	58

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AN	Ágar Nutriente
BHI	Brain Heart Infusion
C	Carbono
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	Cloreto de Cálcio
CN	Caldo Nutritivo
FeSO_4	Sulfato de Ferro (II)
IE	Índice enzimático
K_2HPO_4	Fosfato de Potássio Dibásico
KH_2PO_4	Fosfato de Potássio Monobásico
MSM	Meio Salino Mínimo
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	Sulfato de Magnésio
NaCl	Cloreto de Sódio
NaClO	Hipoclorito de sódio
NH_4SO_4	Sulfato de Amônio
PEAD	Polietileno de Alta Densidade
PEG	Polietilenoglicol
UV	Ultravioleta

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	12
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	14
2.1. Plásticos.....	14
2.1.1 Visão Geral.....	14
2.1.2 Produção Mundial e Nacional de Plásticos.....	16
2.1.3 Geração de Resíduos Plásticos.....	19
2.1.4 Mecanismos de Degradação Natural.....	22
2.1.5 Impactos Ambientais.....	25
2.2 Polietileno (PE).....	28
2.2.1 Polietileno de Alta Densidade (PEAD).....	29
2.3 Biotecnologia Aplicada.....	30
2.3.1 Biodegradação por Bactérias.....	31
2.3.1.1 Produtos do metabolismo microbiano na biodegradação.....	32
3. HIPÓTESES.....	34
4. JUSTIFICATIVA.....	35
5. OBJETIVOS DA PESQUISA.....	36
5.1 Objetivo Geral.....	36
5.2 Objetivos Específicos.....	36
6. MATERIAL E MÉTODOS.....	37
6.1 Coleta das amostras.....	37
6.2 Limpeza das vidrarias para coleta e isolamento.....	38
6.3 Preparação dos filmes de PEAD.....	39
6.4 Isolamento das bactérias de aterro sanitário.....	39
6.5 Avaliação do potencial de degradação de polietileno.....	41
6.6 Avaliação da produção de enzimas hidrolíticas.....	41
6.7 Avaliação da produção de lacases.....	42
6.8 Caracterização morfológica e resposta tintorial dos microrganismos selecionados.....	43
7. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	44
8. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	60
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	61

1. INTRODUÇÃO

Com as transformações industriais e sociais ao longo do tempo, houve uma mudança significativa no padrão de consumo global, resultando em um aumento no uso de produtos de curta duração. Essa prática tem ocasionado uma produção expressiva de resíduos, especialmente de plásticos. Estes, por sua vez, se apresentam como polímeros resistentes, maleáveis, flexíveis e duradouros, que são utilizados em diversos setores industriais para atender às necessidades humanas (Almeida *et al.*, 2021; Thew *et al.*, 2023).

Desde sua criação, os plásticos têm sido amplamente utilizados em diversas áreas e por isso são produzidos em larga escala. Estudos demonstram que são anualmente gerados aproximadamente 400 milhões de toneladas desses polímeros em todo o globo e a tendência é que esse número continue crescendo (Plastics Europe, 2023; Thew *et al.*, 2023).

Apesar das diversas vantagens que o plástico oferece em termos de praticidade e conveniência, sabe-se que muitos destes materiais são descartados logo após o uso, o que contribui significativamente para a geração de resíduos. Nesse sentido, estimativas realizadas, no ano de 2019, pela Organização para Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OECD) indicam que dos 460 milhões de toneladas produzidas neste ano, cerca de 353 milhões de plásticos se tornaram resíduos. Deste total, a maior fração foi depositada em aterros sanitários ou incinerados e apenas 9% foram reciclados. Ainda assim, foi observado que 22% deste total foram descartados inadequadamente, como em lixões ou queimados a céu aberto, promovendo a deposição de 22 milhões de toneladas de rejeitos plásticos no ambiente.

Aliado a isto, os plásticos são considerados polímeros recalcitrantes, podendo demorar décadas para se decompor naturalmente. Como consequência da sua persistência, eles promovem uma série de contaminações ambientais que atingem o ecossistema terrestre, aéreo e aquático, bem como, trazendo prejuízos à saúde humana e animal (Mizoguchi, 2019).

Como reflexo deste processo, animais podem ser afetados através da ingestão direta destes, bem como, com o emaranhamento, ocasionando obstrução das vias digestivas, dificultando a locomoção e, conseqüentemente, a morte. A deterioração plástica ocasiona a liberação de microplásticos, os quais em humanos podem ocasionar uma série de conseqüências a

níveis sistêmicos, culminando em problemas hepáticos, cânceres e desregulação do sistema endócrino, por exemplo (Araujo *et al.*, 2022; Teuten *et al.*, 2009).

Assim, foram traçadas diferentes estratégias a fim de mitigar essa problemática, incluindo iniciativas como a reciclagem, incineração e a deposição em aterros sanitários. Contudo, esses métodos possuem limitações, o que faz com que alguns destes possuam baixa adesão, como na reciclagem, por exemplo (Thew *et al.*, 2023).

Neste contexto, destaca-se a biorremediação, uma técnica biotecnológica que consiste na utilização de organismos vivos ou de seus produtos metabólicos para reduzir ou eliminar contaminantes ambientais. Estudos recentes demonstram a eficácia de diferentes microrganismos, especialmente bactérias, na biodegradação de diversos poluentes ambientais, incluindo plásticos (Mallmann *et al.*, 2019; Skariyachan *et al.*, 2022).

Além disso, é possível isolar uma gama de bactérias de diferentes locais, visando sua utilização biotecnológica. Um desses locais são os aterros sanitários, os quais apresentam variada massa de resíduos sólidos urbanos, sendo, então, colonizados por diversos microrganismos, incluindo bactérias hidrolíticas e fermentativas, acidogênicas, acetogênicas, arqueias metanogênicas e bactérias redutoras de sulfato. Assim, pode-se então explorar esses ambientes, almejando a obtenção de uma diversidade de microrganismos adaptados a poluentes específicos e que potencialmente apresentem mecanismos de degradação intrínsecos (Mata-Alvarez, 2002).

Portanto, o objetivo do presente trabalho foi prospectar bactérias em amostras provenientes de um aterro sanitário, bem como avaliar o potencial de degradação plástica destas para posterior aplicação em estratégias de biorremediação.

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1. Plásticos

2.1.1 Visão Geral

De acordo com Carneiro e colaboradores (2021), antes do advento dos polímeros sintéticos, variados bens de consumo foram produzidos a partir de matérias-primas naturais, tais como: marfim, madeira, cascos e ossos, por exemplo. Contudo, a exploração destes materiais acarretava prejuízos à fauna e flora, além do fato de seus produtos gerados serem majoritariamente manufaturados, eles possuíam baixa escala de produção e preços menos acessíveis.

A fim de substituí-los, iniciou-se a produção dos polímeros sintéticos, o qual se consolidou com a formulação da baquelite pelo pesquisador Leo Baekeland em 1907. Com este feito surgiu o primeiro plástico, o qual se disseminou e sofreu diversas transformações ao longo dos anos (Carneiro *et al.*, 2021).

Com a vantagem de ser flexível e moldável, os plásticos se apresentam como polímeros orgânicos, resultado da união de várias cadeias monoméricas, constituídas por átomos de carbono, hidrogênio, oxigênio, nitrogênio, cloro e bromo (Caixeta *et al.*, 2022).

Inicialmente, estes polímeros sintéticos eram obtidos exclusivamente do petróleo bruto (origem fóssil), os quais passaram por diferentes transformações químicas e originaram diferentes produtos, como, por exemplo: o tereftalato de polietileno (PET), cloreto de polivinila (PVC), poliuretano (PU), polietileno (PE), poliestireno (PS), polipropileno (PP) e poliamida (PA) (Silva, 2021).

A capacidade de gerar variados produtos com o petróleo e a carência de novas tecnologias, favoreceram a disseminação dos plásticos. Ainda mais quando levado em consideração os benefícios de seu uso, o qual pode ser evidenciado por sua enorme versatilidade, resistência, maleabilidade, durabilidade e fácil manipulação (Carneiro *et al.*, 2021).

Entretanto, após décadas de uso, verificou-se o grande impacto que os plásticos ocasionam no meio ambiente e na saúde dos organismos vivos. Por este motivo, a indústria visou produzir plásticos cada vez mais sustentáveis e biodegradáveis, cujo resultado foi a criação dos bioplásticos. Estes, por sua vez, podem ser de base biológica, biodegradável ou ambos, podendo ser produzidos a partir de fontes renováveis, como de vegetais, animais e produtos lácteos, minerais e até de produtos microbianos (Campos, 2022; European Bioplastics, 2018).

Ademais, baseado em sua composição química, eles são classificados ainda em homopolímeros ou heteropolímeros. Os homopolímeros são formados por um único tipo de monômero que se repete; já os heteropolímeros são formados por dois ou mais monômeros em sequência, que irão apresentar variações conforme o tipo de plástico produzido (Caixeta *et al.*, 2022).

Quanto aos processos tecnológicos, estes são divididos em: termoplásticos ou termofixos. Os termoplásticos são polímeros de cadeias lineares ou ramificadas que possuem a capacidade de suportar variações de temperatura e se moldar a ela, podendo ser reaproveitados. Enquanto os termofixos, ou termorrígidos, são constituídos por muitas ligações cruzadas em sua estrutura. Esta configuração confere a eles o comportamento termofixo, ou seja, ao serem submetidos ao aquecimento não suportam variações de temperatura e sofrem degradação; por este motivo, não são passíveis de reutilização (Frimaio, 2019; Rodrigues, 2018).

Ainda assim, para conferir aos plásticos estabilidade e características desejáveis, durante sua fabricação podem ser adicionados a eles uma série de aditivos. Estes possuem a capacidade de melhorar um polímero sem alterar toda sua estrutura química (Rodrigues, 2018). Os principais aditivos utilizados na fabricação de plásticos estão descritos a seguir:

Quadro 1. Tipos de aditivos presentes em plásticos e seus exemplos.

ADITIVOS	EXEMPLOS
Plastificantes	Ftalatos

Retardadores de chama	Ácido bórico e retardantes de chama bromados
Antioxidantes e estabilizadores de UV	Bisfenol A e hidroxitolueno butilado
Estabilizadores de calor	Cádmio e compostos de chumbo
Agentes de deslizamento	Amidas de ácidos graxos
Agentes de cura	Diaminodifenilmetano
Biocidas	Compostos de arsênio
Corantes e pigmentos	Compostos de cádmio, ftalocianinas e sudan

Fonte: Adaptado de (Caixeta *et al.*, 2022) e (Zanoni *et al.*, 2016)

Nesse cenário, os plásticos derivados do petróleo e os bioplásticos que contêm esses aditivos em sua composição podem ter suas propriedades melhoradas, observadas através do aumento da maleabilidade, resistência a variações de temperatura e radiação ultravioleta (UV) e redução da inflamabilidade, por exemplo. Em contrapartida, estes modificadores podem ser adicionados em qualquer parte da etapa de polimerização ou processamento, em qualquer proporção, afetando diretamente sua toxicidade e biodegradabilidade, contribuindo para sua recalcitrância no ambiente e periculosidade para saúde humana (Liwarska-Bizukoje, 2021).

2.1.2 Produção Mundial e Nacional de Plásticos

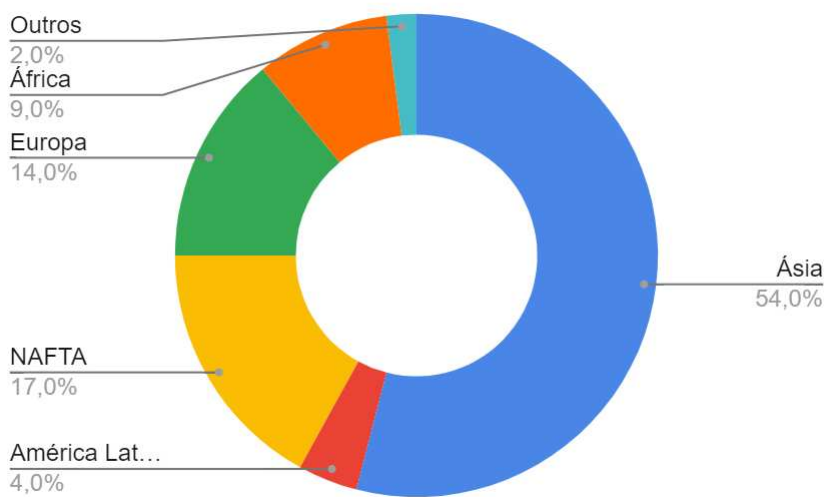
Em virtude dos benefícios de sua utilização e a possibilidade de gerar diferentes polímeros com características de interesse, a base plástica pode ser aplicada em diferentes setores industriais, tais como: setores de embalagens, de construção, de automóveis, elétricos e eletrônicos, lazer, agricultura e outros. Dentre estes, no continente europeu, o setor que mais procura por plásticos é o setor de embalagens, o qual engloba 40% das buscas. Esta distribuição

reflete uma tendência observada a nível mundial: a utilização de embalagens plásticas para descarte instantâneo ou quase imediato (Costa *et al.*, 2019).

Segundo Mizoguchi (2019), até meados da década de 40 a produção global de plásticos não alcançava 1 milhão de toneladas anuais. Entretanto, com o advento da Segunda Guerra Mundial sua utilização se tornou massiva e, à época, estes polímeros foram empregados em itens que iam de pentes até paraquedas, além de componentes de aviões e armas. Desde então, sua fabricação sofreu uma grande intensificação, aumentando cerca de 8,4% ao ano entre 1950 e 2015. Já quando avaliado a geração de resíduos plásticos ao nível per capita, ocorreu aumento de 65 vezes, passando de cerca de 0,8 kg de plástico por pessoa para 55 kg, durante o mesmo período (Mizoguchi, 2019; Geyer *et al.*, 2017).

Estimativas da Plastics Europe (2023), apontam que no ano de 2022 foram fabricados cerca de 400,3 milhões de toneladas de plásticos em todo o globo. Contudo, a distribuição desta produção ocorreu de forma mais acentuada no continente asiático (54%), especialmente na China, a qual deteve cerca de 32% da produção mundial. Em seguida, verificou-se o bloco econômico NAFTA (EUA, México e Canadá) com 17%, o continente europeu com 14%, o continente africano com 9% e a América Latina com apenas 4% de toda produção, conforme pode ser observado na figura abaixo:

Figura 1. Distribuição mundial da produção de plásticos.



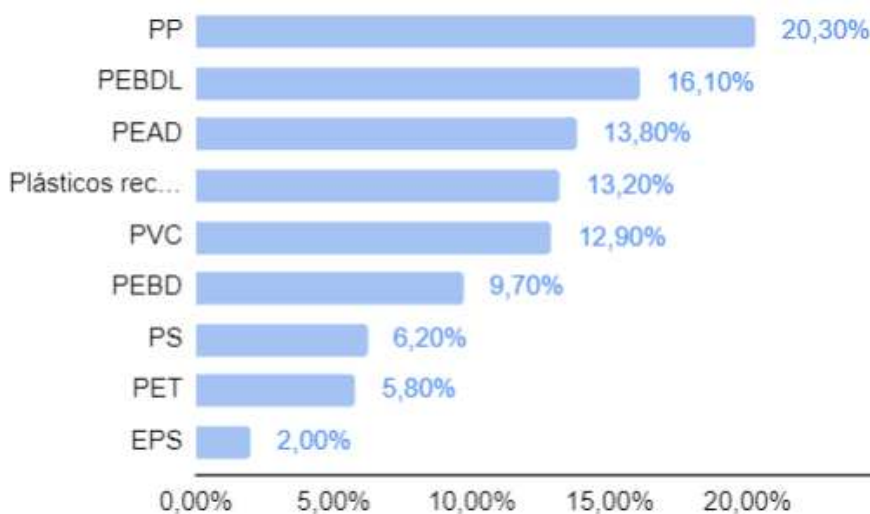
Fonte: Adaptado de (Plastics Europe, 2023)

Apesar da baixa colocação no ranking mundial de produção de plásticos, o Brasil tem crescido exponencialmente. De acordo com dados da Associação Brasileira da Indústria do Plástico (Abiplast) de 2022, o Brasil produziu cerca de 6,7 milhões de toneladas desses polímeros, apresentando participação de 2% a nível global.

Nesse cenário, em todo o globo são produzidos diversos tipos de plásticos, os quais irão atender diferentes demandas da sociedade. Ademais, há alguns que são mais populares no Brasil e estão presentes em diferentes bens de consumos duráveis ou não, como: poliestireno (EPS), poliuretano (PU), polipropileno (PP), policloreto de vinila (PVC), polietileno de alta densidade (PEAD) e de baixa densidade (PEBD), polietileno linear de baixa densidade (PEBDL), politereftalato de etileno (PET) e acetato-vinil de etileno (EVA), por exemplo (Caixeta *et al.*, 2022).

Com base nisto, o perfil do consumo brasileiro, no ano de 2022, dos diferentes tipos de polímeros sintéticos foi delimitado e pode ser observado na Figura 2.

Figura 2. Relação dos principais plásticos consumidos no Brasil no ano de 2022.



Fonte: Adaptado de Abiplast, 2022.

A partir da Figura 2, observa-se que o polipropileno é o polímero mais consumido com 20,30%, o que pode ser atestado devido sua extensa aplicação em embalagens de alimentos, na produção de copos plásticos, brinquedos e seringas descartáveis, por exemplo. Enquanto os

demais polímeros possuem diferentes aplicações, como na fabricação de filmes, embalagens de bebidas, materiais de construção, produtos eletrônicos, elétricos e resinas (Caixeta *et al.*, 2022).

Com a taxa de crescimento apresentada ao longo das décadas, estudos indicam que em 2050 a produção global poderá ser de 500 a 1800 milhões de toneladas. Tais projeções levantam uma série de debates visto que esses materiais contribuem significativamente para geração de resíduo e, conseqüentemente, acabam por trazer uma série de impactos ambientais para todo globo terrestre (Chen, Yan, 2020; Gallo *et al.*, 2018).

2.1.3 Geração de Resíduos Plásticos

O crescente aumento da produção de plásticos favorece a geração de resíduos e o acúmulo de lixo, sobretudo por possuírem uma vida útil reduzida e uma lenta taxa de degradação no ambiente (Gallo *et al.*, 2018).

Segundo a Abiplast (2022), no ano de 2021 o Brasil gerou aproximadamente 4,3 milhões de toneladas de resíduos plásticos. Ademais, pesquisas apontam que há atualmente 150 milhões de toneladas destes resíduos apenas no ambiente marinho e, com a manutenção do ritmo de produção, a estimativa é de que até o ano de 2050, haja nos oceanos mais plásticos do que peixes, em peso. Tal prognóstico evidencia ainda mais a problemática de sua utilização em grande escala e seu descarte inadequado (World Economic Forum, 2016).

Desse modo, os plásticos se tornaram um grande problema ambiental, os quais devem ser gerenciados adequadamente. Como resultado, houve uma série de discussões internacionais e nacionais para traçar estratégias visando mitigar essa problemática. Essas discussões culminaram na produção de cartas, tratados e Projetos de Lei para melhor lidar com esses resíduos (Caixeta *et al.*, 2022).

As principais soluções elaboradas estão inseridas em três categorias: contenção, mitigação e remediação. Inserida nessas, tem-se o processo de reciclagem, a qual recupera a parte reutilizável de um produto e a reintroduz no ciclo de produção novamente. Isso se torna

especialmente útil porque diminui a necessidade de produção de novos plásticos e dá destino ao plástico já gerado (Arpia *et al.*, 2021).

Além desta, há também o método de recuperação de energia, que utiliza de processos térmicos para destruir o polímero, podendo ocorrer por meio de combustão ou pirólise. Quando submetido a altas temperaturas, o plástico é degradado por completo e parte da energia usada pode ser recuperada, além de reduzir o volume de resíduos. Entretanto, a utilização dessa técnica apresenta a desvantagem da liberação de vapores e gases poluentes, que são resultados da própria estrutura química desses polímeros sintéticos e dos aditivos usados na produção (Geyer *et al.*, 2017).

Ademais, a destinação mais frequente para esses resíduos é sua deposição em aterros sanitários ou, inadequadamente, no meio ambiente. Neste caso, o descarte ocorre com a perda total do material. Quando em aterros, ocorre também o descarte, porém alguns cuidados são considerados, como a impermeabilização do solo e o controle do volume de lixo depositado, por exemplo (Geyer *et al.*, 2017).

Contudo, sabe-se que uma parte considerável dos resíduos gerados são descartados incorretamente, contaminando os ecossistemas terrestres, aquáticos e a atmosfera. Além disso, por serem recalcitrantes e uma grande parcela destes não serem biodegradáveis, seu processo de degradação pode naturalmente levar de décadas a séculos, agravando ainda mais a situação (Mizoguchi, 2019).

Figura 3. Lixo contendo resíduos plásticos depositados no Aterro Sanitário de Mossoró (RN).



Fonte: (Autoria própria, 2024)

Em virtude dos fatos mencionados, nota-se que há vantagens e desvantagens em todos os métodos atualmente disponíveis. Contudo, a redução do uso e substituição dos materiais são as formas mais desejáveis e benéficas. A substituição dos plásticos de origens fósseis por bioplásticos, configuraria uma boa estratégia, visto que estes são obtidos de fontes renováveis, acarretando menos problemas ambientais (Yasin *et al.*, 2022). Porém, atualmente observa-se uma lenta modificação nas preferências dos consumidores nesse sentido.

Nesse caso, a reciclagem destaca-se como uma solução adequada para destinação de resíduos plásticos. Apesar disso, estudos realizados pela Abiplast (2022) mostram que o Brasil alcançou um índice de reciclagem de apenas 23,4% em 2021. Esta porcentagem pode ser atribuída a problemas como a contaminação dos plásticos com outros materiais, além da utilização de polímeros diferentes em camadas, por exemplo (Geyer *et al.*, 2017).

A distribuição desse processo foi mais expressivo nas regiões Sudeste e Sul do país, revelando uma baixa adesão na reciclagem pós-consumo, indicando a utilização de outras formas de destinação. Além disso, mostra que a maioria das empresas que realizam esse serviço são mais

comuns nos grandes centros econômicos do país, enquanto regiões menos desenvolvidas possuem um baixo nível de reciclagem e reaproveitamento desses polímeros (Abiplast, 2022).

Do total de plásticos produzidos anualmente, aproximadamente 70% foi encaminhada para aterros, reciclagem ou unidade de recuperação de energia; enquanto os 30% restantes foram descartados inadequadamente, evidenciando o grau de relevância que esse xenobiótico representa (Liwarska-Bizukojc, 2021).

2.1.4 Mecanismos de Degradação Natural

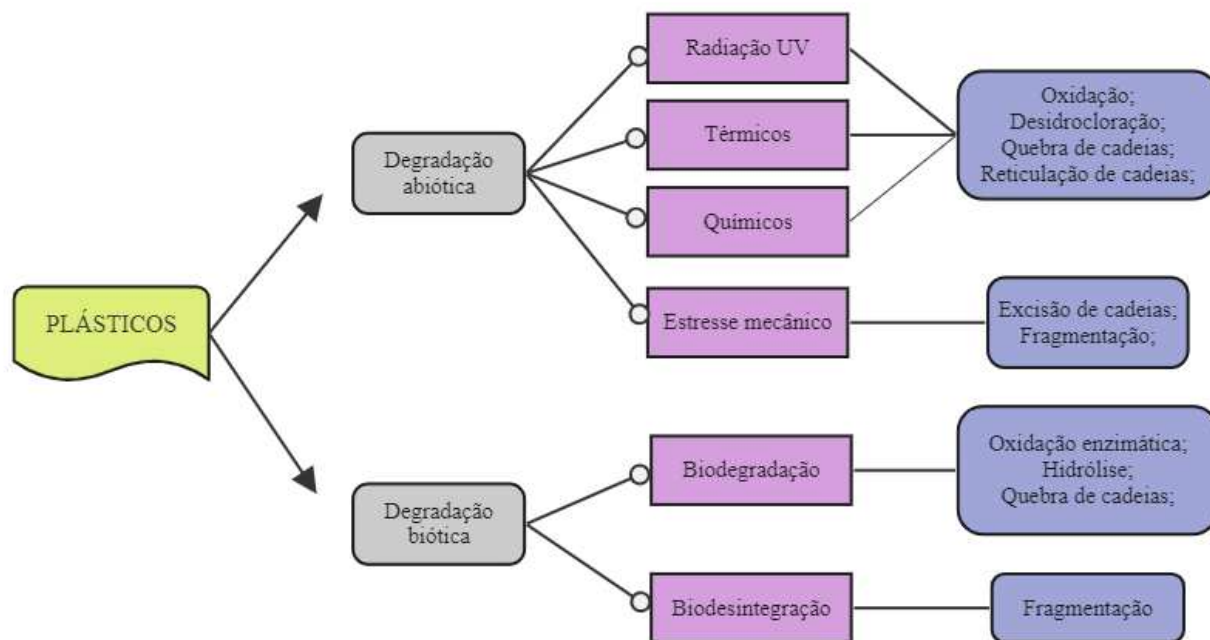
A fim de que a degradação natural dos plásticos ocorra são necessárias um conjunto de condições que favoreçam esse processo, os quais são ditados pela presença dos fatores abióticos e bióticos (Caixeta *et al.*, 2022).

A degradação abiótica está relacionada com as condições do ambiente que circunda o poluente, nesse caso, as propriedades físicas e químicas, como: temperatura, pH, umidade, salinidade, nível de oxigênio e luz. Além disso, as propriedades da superfície na qual o plástico se encontra, como topografia, hidrofobicidade da superfície e, ainda, distribuição das cargas elétricas, peso molecular, os tipos de grupos funcionais e aditivos adicionados (Caixeta *et al.*, 2022; Zhang *et al.*, 2021).

Enquanto a degradação biótica ou biológica, ocorre pela presença de organismos vivos que possuem a capacidade de metabolizar esses poluentes ou liberar compostos e substâncias capazes de promover a destruição desses materiais. Dentre esses compostos, destacam-se as enzimas, ácidos, gases e os surfactantes, por exemplo (Zhang *et al.*, 2021).

Ademais, a degradação destes polímeros pode ocorrer por meio de métodos térmicos, fotodegradativos, químicos, mecânicos e biológicos. Entre eles, podemos citar processos como: a pirólise, a biodegradação, irradiação, hidrólise e fragmentação (Guo, Wang, 2019; Rabello, White, 1997; Zhang *et al.*, 2021). Os tipos de degradação plástica e seus mecanismos estão resumidos na Figura 4.

Figura 4. Esquema da degradação plástica e seus mecanismos.



Fonte: Adaptado de Zhang *et al.*, 2021.

Um dos precursores da deterioração dos plásticos no ambiente natural é a fotodegradação. Trata-se de um processo que envolve uma série de reações químicas, mediadas por radicais livres, iniciadas através da exposição à luz solar. O principal agente responsável pela liberação desses radicais é a irradiação ultravioleta (UV) de alta energia UV-B (290 – 315 nm) e de média energia UV-A (315 – 400 nm), cuja interação com o oxigênio atmosférico produz os radicais peroxi. Assim, durante a reação alguns compostos são produzidos, como: cetonas, ácidos carboxílicos, ésteres, aldeídos e álcoois. Por meio desses, pode ocorrer a cisão da cadeia e a reticulação dos polímeros (Rabello, White, 1997; Zhang *et al.*, 2021).

Os métodos térmicos referem-se ao uso de altas temperaturas para quebra dos plásticos. Quando adicionado calor suficiente, ocorre a cisão das cadeias e a liberação de radicais, estes em contato com o oxigênio, desencadeiam uma cascata de reações resultando na redução ou aumento do tamanho das moléculas, causando a cisão e reticulação das cadeias. Contudo, por se tratar de

uma técnica altamente exotérmica, torna-se improvável que esta ocorra no ambiente natural (Arpia *et al.*, 2021; Zhang *et al.*, 2021).

Já os métodos químicos ocorrem pela presença de compostos químicos orgânicos, que podem ser encontrados na natureza ou não. Estes compostos promovem a formação de radicais via reações fotoquímicas, resultando na deterioração dos polímeros. Pode-se citar os compostos: ozônio (O_3), dióxido de enxofre (SO_2), dióxido de nitrogênio (NO_2) e compostos orgânicos voláteis (VOCs). Ademais, técnicas baseadas em processos químicos não são muito empregados, pois podem ocasionar a liberação de resíduos e frações tóxicas (Arpia *et al.*, 2021; Zhang *et al.*, 2021).

Enquanto a degradação mecânica ocorre como resultado de forças externas sobre os polímeros, as quais podem advir da colisão e atrito destes com rochas e sedimentos, além do processo de congelamento e descongelamento (Arpia *et al.*, 2021).

Por fim, o processo biótico está relacionado com a degradação realizada por organismos vivos de diferentes tamanhos e espécies. De acordo com Zhang e colaboradores (2021), para que isto ocorra, diferentes mecanismos podem ser utilizados, tais como: mordida, mastigação ou fragmentação digestiva e, ainda, liberação de moléculas biologicamente ativas que tenham capacidade de metabolizá-lo. Nesse cenário, destaca-se o papel crucial que os organismos têm desempenhado na degradação biológica de plásticos, incluindo bactérias, fungos e insetos.

Ainda assim, com a liberação de compostos e enzimas extracelulares, a deterioração biótica é promovida por processos de hidrólise e oxidação enzimática. Como resultado, têm-se a quebra do polímero e a liberação de pequenos fragmentos moleculares, os quais podem ser ainda assimilados ou não pelos microrganismos como fonte de carbono (Chen, Xiong *et al.*, 2019).

Em decorrência destes mecanismos, os plásticos apresentam mudanças visuais e estruturais, em virtude de modificações nas suas propriedades físico-químicas. Essas mudanças incluem: alterações na cor, superfície, cristalinidade, tamanho das partículas, densidade, além de fissuras e fraturas em sua estrutura (Guo, Wang, 2019).

2.1.5 Impactos Ambientais

Apesar dos mecanismos de degradação e gestão de resíduos, o descarte excessivo de plásticos causam a sobrecarga dos ecossistemas terrestres, aquáticos e na atmosfera, trazendo impactos negativos na saúde humana e animal.

Por se tratarem de polímeros sintéticos, sua produção e destinação principal ocorre no meio terrestre, sendo descartados em quantidades de 4 a 23 vezes mais do que em ambientes marinhos. Uma vez descartados, esses são encaminhados para aterros sanitários e lixões, onde a falta de controle desses ambientes favorece a contaminação do solo (Atlas Do Plástico, 2020; Silva, 2021).

Figura 5. Resíduos plásticos em lixão.



Fonte: (Agência Brasil, 2014).

Com a deterioração desses materiais em pequenos fragmentos, têm-se os chamados microplásticos (MP) com tamanhos inferiores a 5 mm e os nanoplásticos (NP) com menos de 1 μ m. Esse processo, aliado à deposição em grandes volumes de resíduos plásticos, resulta na

contaminação desses ambientes. Como consequência, os solos ficam impróprios para diversas atividades, dificultando o crescimento da vegetação, alterando a estrutura do solo e o habitat dos organismos. Além disso, esses fragmentos diminutos podem alcançar os lençóis freáticos e contaminar as águas, além de afetar o metabolismo de diferentes animais, à medida que a exposição a essas partículas aumenta (Costa *et al.*, 2019; Silva, 2021).

Nesse sentido, dados do Atlas do Plástico (2020) mostram que são encontradas em média 325 partículas plásticas por litro de água engarrafada, usada para consumo humano. Essa abundância é reflexo da contaminação de fontes de água potável por este xenobiótico.

Já no ecossistema aéreo, sua dispersão pode ocorrer por meio de diferentes formas. De acordo com Silva (2021, p.23), esse processo ocorre “por meio da erosão eólica, uma vez que partículas plásticas se desprendem dos pneus por conta do desgaste, partículas de tintas, fibras sintéticas, resíduos de atividades agrícolas, eles são levados para atmosfera por conta dos ventos”.

Ainda assim, quando submetidos a incineração, esses resíduos promovem a liberação de produtos nocivos como dioxinas, furanos, além de gases tóxicos e CO₂ na atmosfera. Esse impacto ambiental pode contribuir significativamente para o efeito estufa e aumentar o risco de doenças respiratórias (Silva, 2021).

Ademais, como reflexo das ações humanas e descarte inadequado, outro ecossistema amplamente prejudicado é o aquático. Com o decorrer dos anos, milhões de toneladas de plásticos têm alcançado esses ambientes, principalmente devido às atividades costeiras (Jambeck *et al.*, 2015; Silva, 2021).

Por possuírem densidade menor que da água, Eriksen e colaboradores (2014) estimaram mais de 5 trilhões de fragmentos plásticos flutuando nos oceanos à época. O volume citado corresponde a um peso de mais de 250 mil toneladas à deriva no mar, os quais ao entrarem em contato com as correntes marinhas rotativas, ou giros oceânicos, se dispersam destes e concentram-se em pontos específicos.

Um exemplo notório desta problemática é o chamado Grande Porção de Lixo do Pacífico (GPLP) ou vórtice de lixo do Pacífico. Relatos de 2019 indicam que o lixo plástico

acumulado neste ponto ultrapassava as 80.000 toneladas, se estendendo por cerca de 1,6 milhões km² entre o Havá e a Califórnia. Entretanto, como desde então, a produção destes polímeros não desacelerou, acredita-se que esse número tenha crescido ainda mais (Costa *et al.*, 2019; Lebreton *et al.*, 2018; Silva, 2021).

Figura 6. Ilha de plástico do Pacífico.



Fonte: (Power, C., 2023).

Além disso, outra preocupação que tem surgido é a perda de flotabilidade dos plásticos. Mudanças nessa característica dificultam a separação dos resíduos sólidos da água, promovendo o acúmulo de MP nas porções mais profundas das águas. Com a deposição desses nas profundezas, a taxa de degradação é consideravelmente reduzida. Isso pode ser explicado, pois esses locais possuem baixas temperaturas e níveis menores de luz e oxigênio, afetando o metabolismo de microrganismos degradadores de plásticos (Lebreton *et al.*, 2018).

Em virtude dos fatos mencionados, essa situação causa prejuízos significativos ao ambiente e a todos os organismos que habitam nele. A presença de plásticos é associada a uma

série de efeitos adversos nos animais, incluindo a ingestão desses e emaranhamento, bloqueio do trato digestivo, ferimentos, perda de mobilidade, redução do tamanho e sobrevivência da prole e até mesmo morte (Gregory, 2009; Mizoguchi, 2019).

Figura 7. Consequências do plástico na vida animal.



Fonte: (TNH1, 2018).

Ademais, estes efeitos já foram documentados em mais de 250 espécies marinhas, tais como: tartarugas, pinguins, baleias, peixes, crustáceos e mais de 100 espécies de aves marinhas. No entanto, como essas espécies fazem parte da cadeia alimentar, os impactos da poluição podem ser sentidos em todos os níveis tróficos, afetando até mesmo a saúde dos seres humanos (Gregory, 2009; Mizoguchi, 2019).

2.2 Polietileno (PE)

A partir da decomposição térmica de hidrocarbonetos saturados obtêm-se o eteno, cuja polimerização resulta no plástico chamado polietileno (PE). O polietileno é um alceno de aparência cristalina e flexível que se enquadra na categoria de termoplástico. Assim, por não

possuir ligações cruzadas em sua estrutura, possui uma maior maleabilidade e capacidade de suportar diferentes temperaturas (Treptow, 2018; UFSC, 2023).

Os PE são caracterizados por seu alto peso molecular, que varia de 28.000 a 280.000 g.mol⁻¹, por sua cadeia carbônica compacta e sua elevada hidrofobicidade, características essas, que os tornam inertes frente a diversos reagentes químicos. Além disso, à exceção dos aditivos empregados, não exibem toxicidade e em temperaturas inferiores a 60 °C são solúveis em variados solventes (Coutinho *et al.*, 2003; Treptow, 2018).

Em função disso, eles possuem uma grande aplicabilidade no cotidiano, sendo, então, utilizados em uma gama de produtos comerciais. Com isso, o mercado desses polímeros têm crescido acentuadamente, cerca de duas vezes a mais do que o Produto Interno Bruto (PIB) (Coutinho *et al.*, 2003; UFSC, 2023).

Ademais, o polietileno pode ser classificado de acordo com sua densidade, como: polietileno de baixa densidade (PEBD), polietileno de alta densidade (PEAD), polietileno linear de baixa densidade (PELBD), polietileno de ultra alto peso molecular (PEUAPM) e polietileno de ultra baixa densidade (PEUBD) (Coutinho *et al.*, 2003). Contudo, o enfoque deste estudo foi o PEAD.

2.2.1 Polietileno de Alta Densidade (PEAD)

Os PEAD são sintetizados por meio de diferentes iniciadores, como catalisadores Ziegler-Natta, catalisadores metallocênicos e processo Philips, em pressão e temperatura bem estabelecida. Como resultado, obtêm-se polímeros com alto peso molecular, cadeias dobradas, resistência ao calor, altas densidades e maiores cristalinidades quando comparados aos PEBD. Além disso, os PEAD apresentam baixa reatividade química, sendo estáveis em diferentes soluções, independente do pH (Coutinho *et al.*, 2003; Napoli, 2022).

Por estes motivos, os PEAD possuem elevada rigidez, resistência à abrasão, ao impacto, sendo úteis na confecção de baldes, bacias, brinquedos, recipientes para alimentos, tampas para garrafas, bombonas, tanques e tambores e, ainda, no isolamento de fios telefônicos,

geomembranas, revestimento de tubulações metálicas, tubos para redes de saneamento e de distribuição de gás (Coutinho *et al.*, 2003; Napoli, 2022).

Nesse cenário, esta resina teve participação de 13,8% na produção nacional de plásticos, no ano de 2022, demonstrando sua relevância na indústria e no uso cotidiano (Abiplast, 2022). No entanto, suas características de hidrofobicidade e resistência, somadas à sua alta produção, fazem com que esses materiais apresentem uma alta recalcitrância nos ecossistemas. Assim, é essencial desenvolver estratégias de degradação para reduzir os efeitos negativos de seu uso. Uma estratégia que pode ser empregada é a aplicação da biotecnologia ambiental.

2.3 Biotecnologia Aplicada

Visando mitigar os efeitos desses xenobióticos, as pesquisas se voltaram para a utilização da biotecnologia como meio para alcançar este fim de forma mais ecológica (Bardají, 2018).

Na área da biotecnologia ambiental tem-se a biorremediação, que consiste na utilização de organismos vivos como plantas, insetos e microrganismos eucariontes e procariontes para remediar contaminantes no ambiente, dentre os quais, os plásticos (Mallmann *et al.*, 2019).

Para que isto ocorra, faz-se necessário conhecer as características físico-químicas e propriedades dos poluentes, bem como, do meio que o circunda. Ainda assim, diferentes estratégias podem ser utilizadas, como é o caso da biorremediação *in situ* e *ex situ*. A primeira se refere a remediação do poluente em campo, ou seja, sem remoção dele do local onde está inserido; já o segundo, refere-se a remoção do poluente para outro local, a fim de estudar sua degradação (Mallmann *et al.*, 2019; Spilborghs, 1997).

Visando a remediação dos polímeros plásticos, a principal estratégia de biorremediação utilizada atualmente é a biodegradação por microrganismos, especialmente, por bactérias (Mallmann *et al.*, 2019).

2.3.1 Biodegradação por Bactérias

A biorremediação microbiana envolve mecanismos que “[...] degradam ou transformam contaminantes a formas menos tóxicas, ou não tóxicas, visando a recuperação do ambiente contaminado” (Mallmann *et al.*, 2019, p.2).

Nesse sentido, bactérias e fungos têm sido avaliados em pesquisas quanto ao seu potencial biorremediador, dentre estes, as bactérias têm apresentado grande relevância. Dessa forma, variadas linhagens têm sido identificadas, como *Brevibacillus*, *Bacillus*, *Comamonas*, *Clostridium*, *Acinetobacter*, *Aspergillus*, *Rhodococcus*, *Staphylococcus* e *Pseudomonas*, por exemplo (Almeida *et al.*, 2021; Costa *et al.*, 2015).

Diferentes estudos vêm relatando a utilização de bactérias ou consórcios microbianos com fins remediadores. As estratégias utilizadas podem envolver técnicas *in situ* ou *ex situ* e, ainda, utilizar microrganismos nativos ou geneticamente modificados. Além disso, pode-se utilizar microrganismos autóctones — do próprio ambiente —, ou ainda, alóctones — que são estranhos ao ambiente que se visa remediar (Almeida *et al.*, 2021; Mallmann *et al.*, 2019; Skariyachan *et al.*, 2022).

Nesse contexto, a ocorrência da biodegradação plástica depende da presença dos fatores bióticos e abióticos e envolve as etapas de biodeterioração, biofragmentação, bioassimilação e mineralização (Skariyachan *et al.*, 2022).

De acordo com Almeida e colaboradores (2021), a biodeterioração envolve a formação de biofilme pelos microrganismos e secreção de substâncias poliméricas extracelulares (EPS). Os EPS promovem a adesão bacteriana aos plásticos e causam a quebra das ligações químicas, originando fissuras e poros com a formação de compostos ácidos. Com a presença de fissuras e poros, ocorre a biofragmentação, cuja etapa envolve a quebra do polímero em fragmentos menores, através da ação de enzimas oxigenases e hidrolases. A terceira etapa, a bioassimilação, envolve a entrada dos monômeros na célula microbiana, por transporte passivo ou ativo. Após internalização destes na célula, ocorre a mineralização, a qual refere-se a utilização desses monômeros em processos de respiração ou fermentação, causando a oxidação destes e a liberação de compostos como água, dióxido de carbono, metano e nitrogênio.

Ademais, a atuação das bactérias nesse processo envolve a liberação de substâncias e compostos orgânicos, tais como ácidos, solventes, gases, biossurfactantes e enzimas. Esses compostos ou moléculas vão atuar na quebra dos polímeros em pequenos fragmentos (Skariyachan *et al.*, 2022; Thew *et al.*, 2023).

Ainda assim, sabe-se que esse processo ocorre de forma mais facilitada em plásticos mais hidrolisáveis, como em bioplásticos, do que em pouco hidrolisáveis, como os de origem fóssil. Nesse último, enquadram-se o PE, PP e PVC, os quais são menos suscetíveis à degradação por enzimas extracelulares. Contudo, diferentes estudos vêm relatando os benefícios da utilização dos pré-tratamentos na biodegradação dos plásticos, hidrolisáveis e não hidrolisáveis. Esses pré-tratamentos auxiliam no aumento da degradação enzimática e microbiana, podendo incluir a utilização de radiação UV, fragmentação mecânica e tratamento com plasma, por exemplo (Yasin *et al.*, 2022).

Apesar das extensas vantagens de utilização desta técnica, há ainda desafios a serem ultrapassados. Segundo Thew e colaboradores (2023), alguns desses desafios são: a deficiência de métodos padronizados para avaliar a capacidade de deterioração de microrganismos e enzimas, além da avaliação dos efeitos de aditivos sintéticos no processo de biodegradação e a ineficiente caracterização de enzimas que atuam nesse processo.

Dessa forma, surge então a necessidade de realizar a prospecção de microrganismos em diferentes ambientes visando sua utilização em estratégias de biorremediação.

2.3.1.1 Produtos do metabolismo microbiano na biodegradação

Por apresentarem uma elevada plasticidade genética, os microrganismos possuem uma grande capacidade de se adaptarem às mais diversas condições. Em um ambiente com certa carga de poluentes, seu organismo sofre modificações para degradar muitas vezes esse material e utilizar ele parcial ou totalmente como fonte de energia (Santos, 2014).

Uma das estratégias utilizadas por eles é a produção de enzimas, catalisadoras naturais de reações que desempenham papéis fundamentais no metabolismo. Elas possuem sítios de

ligações específicos e atuam de diferentes maneiras, porém sua catálise muitas vezes envolve reações hidrolíticas e oxidativas (Campos, Oliveira, 2022).

Neste sentido, as enzimas podem agir sobre as cadeias laterais ou centrais dos polímeros, promovendo a oxidação de grupos funcionais, ou hidrólise de ligações, ocasionando modificações na sua estrutura e hidrofobicidade, facilitando o acesso dos microrganismos aos polímeros (Costa *et al.*, 2015).

A relevância destas se dá principalmente pela estabilidade frente às variações de pH, temperatura, solventes e sais. Além de configurarem uma estratégia ecológica e de baixo custo de produção. Dessa forma, uma gama de enzimas podem atuar na biodegradação dos plásticos, tais como: hidrolases e oxidorreduções. Estas, por sua vez, podem ser obtidas de bactérias e desempenhar diferentes estratégias de degradação (Edson, 2017; Costa *et al.*, 2015).

As hidrolases apresentam um papel importante em processos industriais e biodegradativos, uma vez que realizam a quebra de moléculas na presença de água. Dentre as hidrolases, as lipases e esterases são observadas com maior frequência na degradação biotecnológica de polímeros, por possuírem a capacidade de hidrolisar ácidos graxos de tamanhos variados. As lipases têm como substrato ácidos graxos de cadeia longa, enquanto as esterases, hidrolisam ácidos graxos de cadeia curta (Campos, Oliveira, 2022; Kumar *et al.*, 2012).

Já as oxidorreduções possuem a capacidade de degradar polímeros através da transferência de elétrons de uma molécula para outra, ou ainda, por promover a formação de radicais livres. Elas incluem diferentes subclasses de enzimas, tais como as oxidases. Nesta última, estão contidas as lacases. As lacases são metaloproteínas que possuem como co-fator íons de cobre. Elas possuem ampla especificidade para compostos aromáticos contendo grupos hidroxila e amina, sendo úteis na degradação de diferentes xenobióticos, bem como na descoloração de corantes, como o azul de bromofenol (Costa *et al.*, 2015; Kumar *et al.*, 2016; Forootanfar *et al.*, 2012).

3. HIPÓTESES

Aterros sanitários abrigam microrganismos possíveis de se isolar em meios de cultura através de técnicas de enriquecimento.

Os microrganismos isolados possuem potencial para produzir enzimas-chave na catálise de plásticos e habilidade para degradar polietilenoglicol.

4. JUSTIFICATIVA

A necessidade de encontrar meios de degradar plásticos é fundamental para enfrentar um dos principais problemas da atualidade: a poluição plástica. Os plásticos são um dos polímeros mais utilizados em nossa sociedade, possuindo diferentes tipos e aplicações. Entretanto, devido à sua lenta decomposição e à sua massiva produção, têm-se como resultado o acúmulo expressivo desses resíduos no meio ambiente. Em virtude disso, essa problemática tem ocasionado uma série de impactos negativos a nível global, tais como: a contaminação dos solos, dos rios e mares, poluição atmosférica e prejuízos à saúde animal e humana.

Nesse sentido, foram tomadas medidas para reduzir essa situação, como a reciclagem, incineração e criação de aterros sanitários, mas esses mecanismos apresentam algumas deficiências e possuem baixa adesão nas cidades. Desse modo, torna-se indispensável o desenvolvimento de novas estratégias que sejam eficazes na mitigação desta questão. A alternativa mais interessante para esse fim é a biorremediação, que utiliza organismos vivos para remediar contaminações ambientais. Isso inclui a biodegradação promovida por bactérias, que através de diferentes processos podem promover a quebra desses xenobióticos, mineralizá-los e ainda os utilizar como fonte de carbono para sua sobrevivência.

Em virtude disso, torna-se essencial a prospecção de bactérias degradadoras de plásticos em diferentes ambientes, como em aterros sanitários, a fim de identificá-las e avaliar seu potencial degradador em diferentes tipos desses polímeros. Esses estudos servirão como base para futuras pesquisas e aplicações de técnicas biorremediadoras.

5. OBJETIVOS DA PESQUISA

5.1 Objetivo Geral

Isolar bactérias de amostras de solo, resíduos plásticos e chorume de um aterro sanitário e investigar o potencial para degradação de plástico.

5.2 Objetivos Específicos

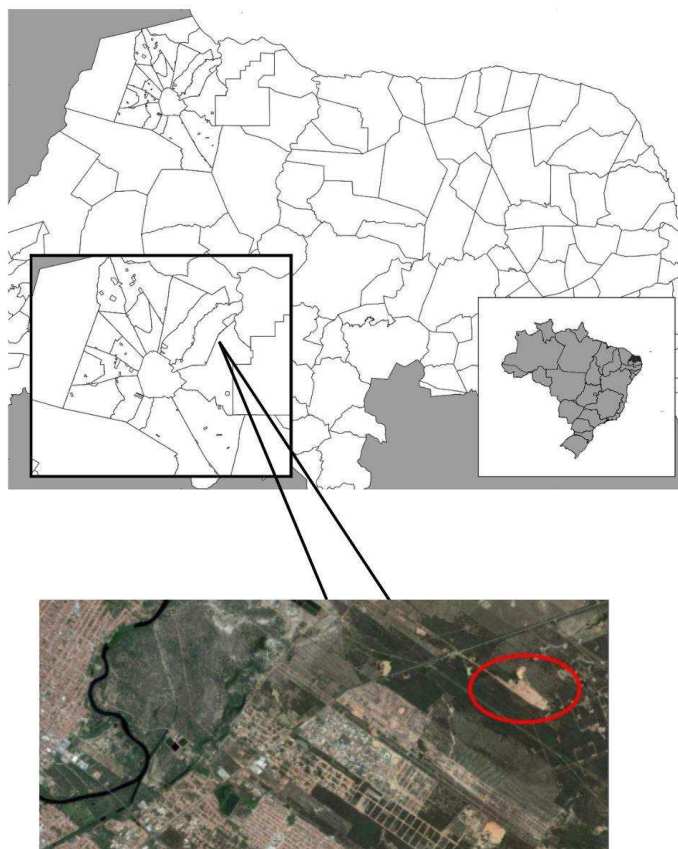
- Isolar bactérias de amostras de solo, resíduos e chorume do aterro, utilizando técnicas de enriquecimento;
- Realizar a caracterização morfológica e resposta tintorial dos isolados;
- Testar o potencial de produção de enzimas relacionadas à degradação de plásticos, tais como hidrolases e lacases;
- Testar o potencial dos isolados bacterianos em degradar polietilenoglicol (PEG) como forma de triagem para degradação de polímeros plásticos.

6. MATERIAL E MÉTODOS

6.1 Coleta das amostras

A fim de se obter bactérias com potencial de degradação de polietileno, foram coletadas amostras de solo, resíduos plásticos e chorume de um aterro sanitário, no município de Mossoró (Rio Grande do Norte, Brasil). O aterro está localizado às margens da BR 110, no sentido Mossoró/Areia Branca, sob as coordenadas geográficas: 5° 10' 54,94'' de latitude sul, 37° 16' 40,70'' de longitude oeste e altitude de 34 m, conforme exibido na Figura 8.

Figura 8. Mapa de Mossoró (RN), destacando a localização do aterro sanitário.



(Fonte: Autoria própria, 2024)

As amostras foram obtidas de diferentes pontos do aterro, tais como: de células ativas, inativas, tanque de chorume jovem (05 anos de deposição), tanque de chorume estabilizado (14 anos de deposição - inativo) e das redondezas das células, evidenciados na Figura 9. Foi realizada amostragem da porção mais superficial do solo para obtenção de microrganismos aeróbios, cuja coleta ocorreu com cerca de 3 a 5 cm de profundidade, os quais foram acondicionados em frascos plásticos e vidrarias estéreis.

Figura 9. Imagem de célula inativa (A), tanque de chorume estabilizado (B), célula ativa (C) e tanque de chorume jovem (D) do aterro de Mossoró.



Fonte: (Autoria própria, 2023)

No total, foram selecionadas 8 amostras, as quais foram identificadas através de letras, são elas: solo próximo da célula inativa (A); amostra de chorume jovem (B); solo da célula ativa com infiltrado de chorume (C); solo da célula ativa 1 (D); solo da célula inativa (E); solo da célula ativa 2 (F); solo próximo da célula ativa com amostra de plástico (G) e chorume estabilizado (H).

Os exemplares foram conservados em gelo para o transporte até o Laboratório de Biotecnologia e Microbiologia Ambiental (LABIOMA), localizado no Departamento de Biociências do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da UFERSA.

6.2 Limpeza das vidrarias para coleta e isolamento

Para controle das fontes de carbono no experimento, as vidrarias utilizadas foram submetidas ao hipoclorito de sódio (NaClO) por 30 minutos, em seguida lavados com água e detergente. Decorrida a lavagem, foram enxaguados com água destilada e autoclavados a 121 °C por 15 minutos.

6.3 Preparação dos filmes de PEAD

Filmes de PEAD foram obtidos a partir de sacolas plásticas, coletadas de um supermercado na cidade de Mossoró–RN. As sacolas foram cortadas em discos de 5 cm de diâmetro (Figura 10) nas porções que não apresentavam tinturas de impressão. Em seguida, foram limpas com água corrente e água destilada, desinfetadas com álcool 70° e enxaguadas com água destilada autoclavada. Após isso, foram submetidas a luz UV por 15 minutos.

Figura 10. Sacolas e discos plásticos de PEAD.



Fonte: (Autoria própria, 2023)

6.4 Isolamento das bactérias de aterro sanitário

Para o isolamento das bactérias, a metodologia foi baseada na descrita por Bardaji *et al.* (2019), com adaptações. O protocolo de isolamento foi dividido em 2 grupos experimentais: com e sem pré-enriquecimento com BHI.

No primeiro grupo, 1 g de solo/resíduos ou 1 mL de chorume foram adicionadas a tubos contendo meio Brain Heart Infusion (BHI). Após 24h de incubação, a temperatura ambiente, 10 mL da cultura foram adicionados a um erlenmeyer com 90 mL de Meio Salino Mínimo (MSM), cuja composição está contido na Tabela 1. Após adição do meio, foram adicionados os discos de PEAD. No grupo 2, sem pré-enriquecimento com BHI, foram adicionados 10 g de solo/resíduos ou 10 mL de chorume em 90 mL de MSM contendo apenas PEAD, como fonte única de carbono. Em ambos grupos, foram adicionados apenas 1 disco de PEAD por amostra, exceto na amostra que já continha resíduos plásticos (identificada com a letra G), nesta não ocorreu adição.

Nas amostras dos dois grupos, após 7, 15, 30 e 45 dias de incubação foram retirados 100 μ L de cultura enriquecida e inoculados em placas de Ágar Nutritivo (AN), através de técnica de *spread plate*, para verificação das colônias. Foram realizadas diluições das amostras em salina fisiológica (NaCl) 0,85% p/v, em duplicata. As amostras permaneceram em agitação constante (150 rpm) à temperatura ambiente, durante 45 dias.

Ao final deste período, foi realizado o repique das colônias que apresentavam características culturais diferentes para novas placas contendo meio AN, através de técnica de esgotamento em estrias, a fim de se obterem culturas puras.

Após o isolamento em culturas puras, os microrganismos foram cultivados em Caldo Nutritivo (CN), onde posteriormente foi adicionado glicerol a uma concentração final de 20% (v/v), para manutenção na Coleção de Microrganismos Ambientais do Laboratório de Biotecnologia e Microbiologia Ambiental (LABIOMA), na UFERSA.

Tabela 1. Reagentes constituintes do Meio Salino Mínimo (MSM) e suas concentrações (g/L).

Reagente	Concentração (g/L)
Fosfato de Potássio Dibásico (K_2HPO_4)	0,5
Fosfato de Potássio Monobásico (KH_2PO_4)	0,04
Cloreto de Sódio (NaCl)	0,1
Cloreto de Cálcio ($CaCl_2 \cdot 2H_2O$)	0,002
Sulfato de Amônio ($NH_4(2SO_4)$)	0,2
Sulfato de Magnésio ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$)	0,02
Sulfato de Ferro (II) ($FeSO_4$)	0,001

6.5 Avaliação do potencial de degradação de polietileno

A fim de selecionar isolados bacterianos, foi verificado a capacidade deles em degradar polietilenoglicol (PEG), a forma solúvel do polietileno, como forma de avaliação preliminar de microrganismos que possivelmente têm capacidade de degradar polietileno.

A triagem foi realizada pelo método de zona clara, baseada na metodologia de Nademo *et al.* (2023). O meio foi composto por MSM, polietilenoglicol 0,2% (p/v) e ágar 1,5% (p/v) e esterilizado (121 °C, 15 minutos). Após teste de esterilidade, alíquotas de 3 µL foram inoculadas

e as placas foram incubadas a temperatura ambiente por 9 dias. Os ensaios foram realizados em triplicata e repetidos 2 vezes.

Após o tempo de incubação, os halos foram revelados através de solução de Coomassie Brilliant Blue 0,1%, para visualização do halo ao redor da colônia. A solução foi preparada dissolvendo metanol (40% v/v) em ácido acético (10% v/v), com adição de Coomassie R-250 a 0,1% (p/v). A solução foi adicionada e após 20 minutos, o excesso desta foi retirada e avaliados os diâmetros das colônias e dos halos para cálculo do índice enzimático.

A atividade degradativa foi determinada utilizando o índice enzimático (IE) como forma de medição das zonas claras. O IE consiste na razão entre o diâmetro da zona clara e o diâmetro da colônia ($IE = D/d$), onde: D = diâmetro total (colônia + halo) e d = diâmetro da colônia (Hankin; Anagnostakis, 1975). Dos IE foram calculados a média e o desvio padrão, a fim de observar a dispersão dos resultados. Os índices enzimáticos são considerados satisfatórios quando apresentam IE iguais ou superiores a 1,5 (Florencio *et al.*, 2012).

6.6 Avaliação da produção de enzimas hidrolíticas

Para detecção da produção de hidrolases, como lipases e esterases, a metodologia foi baseada na descrita por Ramnath e colaboradores (2017). A atividade esterásica foi determinada com o uso de Tween 20, enquanto para avaliar a enzima lipase foi utilizado o Tween 80. O meio para teste enzimático foi composto por: peptona (10 g/L), NaCl (5 g/L), $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ (0,1 g/L), ágar (20 g/L) e Tween 20 ou 80 1% (v/v). Os isolados foram inoculados (3 μ L) e incubados a temperatura ambiente por 2 dias. Este método é baseado na hidrólise do Tween, o qual ocasiona a precipitação do sal cloreto de cálcio. Dessa forma, o resultado é visualizado através de formação de precipitado branco ao redor da colônia. Os ensaios foram realizados em triplicata e repetidos 3 vezes.

De forma adicional, para confirmação da atividade de lipase, foi composto meio contendo AN (28 g/L), azeite de oliva 1% (v/v) e 0,2% (v/v) de Tween 20. Os substratos foram autoclavados separadamente e após esterilização (121 °C por 15 minutos), foi utilizado vórtex para promover a emulsificação destes (Babavalian *et al.*, 2014; Sperb, 2015). As placas

permaneceram em temperatura ambiente e após 48 horas foi verificado presença ou ausência de halo, bem como, realizado o cálculo do índice enzimático ($IE = D/d$), conforme Hankin e Anagnostakis (1975). Dos IE foram calculados a média e o desvio padrão e os índices considerados satisfatórios apresentam valores iguais ou superiores a 1,5 (Florencio *et al.*, 2012). Os ensaios foram realizados em triplicata e repetidos 2 vezes.

6.7 Avaliação da produção de lacases

A fim de detectar a produção de lacases pelos microrganismos, foi testado inicialmente sua capacidade de descoloração com o azul de bromofenol. Assim, o meio foi composto por: triptona 1% (p/v), extrato de levedura 0,5% (p/v), ágar 1,5% (p/v) e azul de bromofenol 0,2% (p/v), baseado em Ramnath *et al.* (2017). As placas foram incubadas a temperatura ambiente, durante 5 dias, para visualização de descoloração do meio como indicativo da produção destas enzimas.

De forma adicional, foi realizado análise com substrato que possui especificidade para lacases, o guaiacol. Assim, colônias foram inoculadas em placas contendo ágar nutritivo (28 g/L) e guaiacol 0,5 mM. As placas foram mantidas em temperatura ambiente por 96 horas para visualização de coloração marrom nas colônias, conforme Sheikhi *et al.* (2012). Ambos ensaios foram realizados em triplicata e repetidos 2 vezes.

6.8 Caracterização morfológica e resposta tintorial dos microrganismos selecionados

Os isolados que apresentaram resultados positivos no *screening* e produção enzimática, foram submetidos a coloração de Gram e analisados também em microscópio óptico quanto sua morfologia celular para caracterização.

7. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Poucos estudos na literatura buscam investigar a biodegradação bacteriana do polietileno de alta densidade (PEAD) e, ainda, pouco se sabe sobre os mecanismos e enzimas envolvidos neste processo. Isto se deve ao fato de não haver uma padronização nas técnicas, meios e condições utilizadas, dificultando a comparação dos resultados obtidos nestes ensaios. Ainda assim, os resultados obtidos apresentam baixas taxas de biodegradação (Costa *et al.*, 2015; Matjašič *et al.*, 2021; Gu, 2020). Nesse sentido, o presente trabalho teve como objetivo isolar bactérias e investigar o potencial destas para posterior degradação plástica.

Assim, foram coletadas amostras do aterro municipal de Mossoró, visando o isolamento de microrganismos que degradem plástico em formas menos recalcitrantes, principalmente por estarem em um ambiente em contato direto com esses xenobióticos. Dessa forma, foram selecionadas amostras de diferentes pontos representativos, como de células ativas — onde ocorre atual deposição de lixo —; inativas — sem deposição atual de lixo —; tanque de chorume jovem — onde há 5 anos ocorre a deposição de chorume —; tanque de chorume estabilizado — sem deposição atual de chorume, com 14 anos de vida útil —, bem como, das redondezas das células.

A coleta de amostras nas redondezas das células se dá por nesses locais apresentarem ainda resíduos plásticos, decorrente do transporte e da ação do vento. Ainda assim, em locais como a célula inativa, o lixo presente estava recoberto por terra e parte da célula estava coberta por vegetação, sendo necessário coletar amostras nas imediações do local também.

No período inicial de isolamento, foi observado que as amostras apresentaram crescimento considerável quando pré-enriquecidas com BHI, porém quando tinha apenas PEAD como fonte de carbono, a quantidade de colônias era inferior. Através disto, pode-se entender que mesmo com o carbono remanescente da amostra, os microrganismos que não foram previamente pré-enriquecidos apresentaram menor capacidade de crescimento, isto se deve ao BHI fornecer nutrientes satisfatórios para o crescimento microbiano, favorecendo a seleção de microrganismos.

Durante os 45 dias de isolamento, foi observada diminuição na quantidade de colônias. Isto pode ser atribuído ao consumo das fontes de carbono dos meios, o que facilita selecionar microrganismos que possivelmente conseguem utilizar o plástico como fonte de C.

No período de 30 dias do protocolo de isolamento, alíquotas foram plaqueadas em AN para observação das colônias, sendo visualizados 46 isolados com características culturais diferentes. Ao final dos 45 dias, as amostras foram novamente plaqueadas e repicadas, onde os 46 isolados se repetiram e estes foram mantidos em coleção e analisados (Figura 11).

Figura 11. Isolado obtido ao final da etapa de isolamento (45 dias), em placa de AN.



Fonte: (Autoria própria, 2024).

Do total de isolados obtidos, os que apresentaram maior número de isolados são provenientes do solo próximo da célula inativa (A), com 11 isolados, onde 3 foram enriquecidos somente com MSM (A1) e 8 são do grupo pré-enriquecido com BHI (A2). A partir da amostra do chorume jovem (B), foi possível isolar 4 bactérias, onde foi obtido 1 isolado do grupo do MSM (B1) e as demais foram do grupo do BHI (B2). Da amostra de solo da célula ativa com infiltrado de chorume (C), foi possível obter 7 isolados, onde 4 fazem parte do grupo do MSM (C1) e 3 do grupo pré-enriquecido (C2).

A partir do solo da célula ativa 1 (D), foram isoladas 5 bactérias, sendo 2 no grupo somente com MSM (D1) e no grupo com BHI foram obtidas 3 bactérias (D2). No solo da célula inativa (E) foram isoladas 5 bactérias, sendo 2 no grupo somente com MSM (E1) e no grupo com BHI foram obtidas 3 bactérias (E2). Já do solo da célula ativa 2 (F), foram isolados 4 bactérias em cada, duas em cada grupo (F1 e F2). Na amostra de solo próximo da célula ativa com resíduo plástico (G), foram obtidas 6 colônias, 4 no grupo com apenas MSM (G1) e 2 no grupo com BHI (G2). Na amostra de chorume estabilizado (H), foram obtidos 4 colônias, duas em cada grupo (H1 e H2).

Em todas as amostras foram obtidos diferentes isolados, os quais foram identificados e diferenciados pela letra (indicando a localização), número (1 ou 2, indicando o grupo ao qual pertencem) e após um ponto (.) outro número foi utilizado para diferenciar os diferentes isolados de uma mesma amostra (Ex. A2.1, A2.2, A2.3).

Com o elevado número de culturas puras, surgiu a necessidade de selecionar os microrganismos que seriam então submetidos para o ensaio de biodegradação. Assim, foi realizada triagem destes com o polietilenoglicol (PEG) através do método de zona clara. Após 9 dias, os halos foram revelados com solução de Coomassie Brilliant Blue 0,1% para cálculo do índice enzimático, conforme pode ser observado na Tabela 2 abaixo:

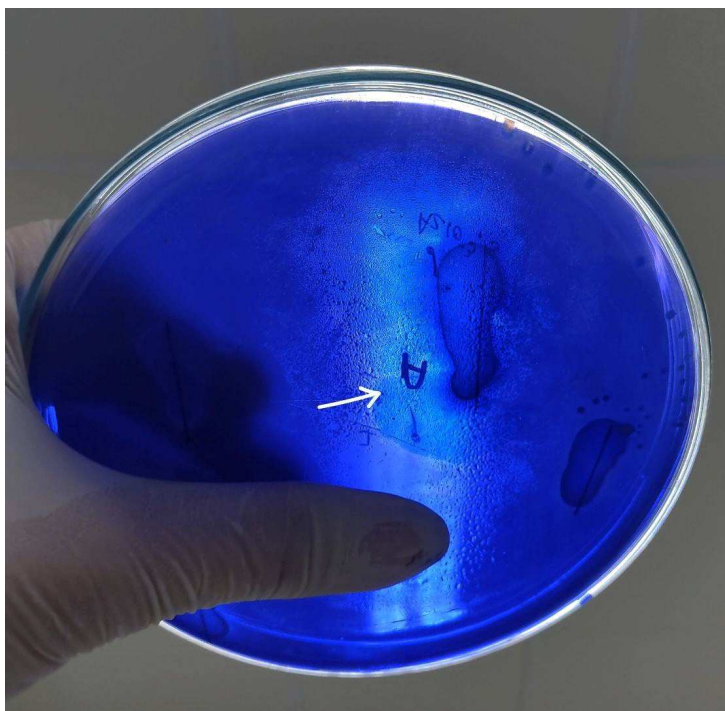
Tabela 2. Triagem de isolados bacterianos com potencial para degradação de PEG.

Isolado	Índice Enzimático	Isolado	Índice Enzimático
B2.1	1,3 ± 0,2	C1.3	1,4 ± 0,1
C2.2	1,2 ± 0,14	A1.2	1,3 ± 0,13
A2.1	2 ± 0,36	A2.2	2,1 ± 0,75
A2.8	2,1 ± 0,42	G1.2	1,3 ± 0,1
E2.2	1,2 ± 0,12	G2.1	1,4 ± 0,03
F2.2	1,1 ± 0,05	H1.1	1,6 ± 0,28
H2	1,5 ± 0,27	C1.1	1,3 ± 0,15
E2.1	1,3 ± 0,12	A2.5	1,5 ± 0,34
A2.6	2,2 ± 0,36	G2.2	1,2 ± 0,1
A1.1	1,9 ± 0,73	B2.3	1,4 ± 0,11

O índice enzimático é a relação entre diâmetro do halo de hidrólise e o diâmetro da colônia (Hankin; Anagnostakis, 1975). Cada identificador representa um isolado diferente, obtido de diferentes locais (representado pelas letras), de grupos diferentes (apenas em MSM - 1; pré-enriquecidos com BHI - 2) e após o ponto estão representados diferentes isolados de uma mesma amostra. Exibe-se o cálculo da média dos IE e os desvios-padrão (triplicata/amostra). Fonte: (Autoria própria, 2024).

As bactérias que exibiram zona clara no meio azul foram consideradas degradadoras de polietileno, conforme observado na Figura 12. Isso se dá devido à presença do polietilenoglicol no meio, o qual é caracterizado por ser a forma solúvel deste polímero (Gupta *et al.*, 2016; Nademo *et al.*, 2023). Dessa forma, 20 isolados apresentaram capacidade para degradação de polietileno (Tabela 2), os quais 14 isolados foram previamente enriquecidos com BHI, enquanto os 6 restantes não passaram por esse processo. Os índices enzimáticos iguais ou superiores a 1,5 foram considerados os melhores resultados, variando entre 1,5 e 2,2. Os isolados com índices próximos ao 1,5 foram considerados potenciais degradadores (Florencio *et al.*, 2012). Ademais, as médias dos IE demonstraram baixos desvios-padrão (com valores inferiores a 1), variando entre 0,05 e 0,75, o que indica baixa dispersão dos dados.

Figura 12. Zona clara gerada pela ação do isolado A2.6, no meio contendo PEG.



A seta identificada na figura indica o local onde ocorre a zona clara, ao redor do isolado. Fonte: (Autoria própria, 2024).

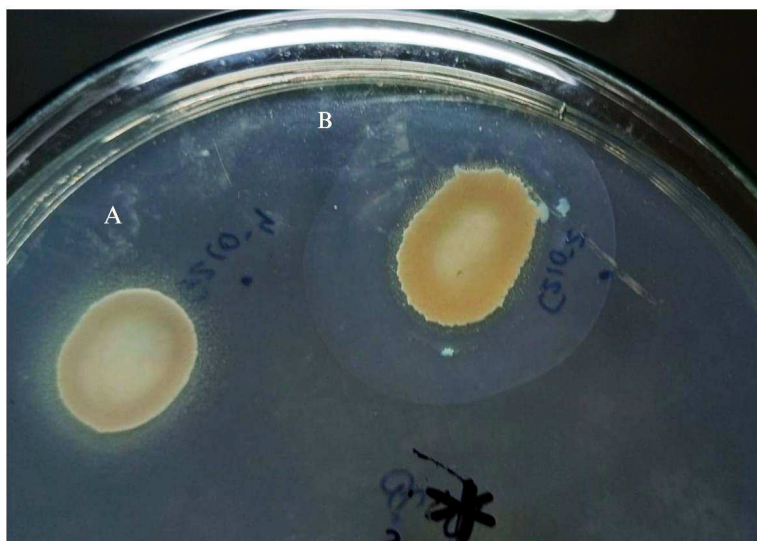
Os isolados que apresentaram as maiores médias de IE e mais baixos desvios-padrão configuram-se como potenciais candidatos para ensaios de biodegradação. Desse total, 4 isolados (A2.1, A2.8, A1.1 e C1.3) exibiram maior reprodutibilidade nas repetições. Ainda assim, estes foram obtidos do solo próximo da célula inativa (A) e do solo da célula ativa com infiltrado de chorume (C) e, ainda, enriquecidos com BHI previamente (A2.1 e A2.8) ou não (A1.1 e C1.3).

Nesse cenário, sabe-se que as reações hidrolíticas favorecem a degradação de polímeros sintéticos, ao promoverem a oxidação de grupos funcionais e mudanças na estrutura destes, facilitando a ação dos microrganismos (Costa *et al.*, 2015). Assim, foi investigado a produção de duas importantes hidrolases: lipases e esterases. Para isso, foi utilizado meio contendo Tween.

O Tween 80 foi usado para a detecção de lipases, visto que é mais facilmente hidrolisado por essa enzima, por conter ésteres de ácido oleico. Já o Tween 20 foi usado para esterases, por

este conter ésteres de ácidos graxos de cadeia inferior. O princípio deste método é baseado na precipitação dos sais de cálcio. Ao ser hidrolisado, o Tween libera ácidos graxos que se ligam ao cálcio do meio, formando cristais insolúveis ao redor da colônia (Kumar, *et al.*, 2012; Ramnath, *et al.*, 2017), observado na Figura 13.

Figura 13. Presença de halo de hidrólise e precipitado insolúvel ao redor das colônias, em meio contendo Tween 20 para detecção de esterase.



O isolado representado pela letra A corresponde a cepa G2.2, a qual evidencia os precipitados. Enquanto o representado pela letra B, corresponde ao isolado C2.1, o qual apresenta precipitado ao redor da colônia, bem como, halo de hidrólise. A mesma forma de visualização ocorre em lipase quando o meio é suplementado com Tween 80.

Dos 46 isolados prospectados, 4 produziram lipase utilizando tween 80 como substrato. Os resultados dos índices enzimáticos podem ser observados na Tabela 3.

Tabela 3. Detecção de linhagens produtoras de lipase (Tween 80).

Isolado	Índice Enzimático
E2.2	$1,2 \pm 0,07$
B2.3	$1,4 \pm 0,15$
C1.3	$1,7 \pm 0,25$
G1.1	$1,6 \pm 0,35$

O índice enzimático é a relação entre diâmetro do halo de hidrólise e o diâmetro da colônia (Hankin; Anagnostakis, 1975). Cada identificador representa um isolado diferente, obtido de diferentes locais (representado pelas letras), de grupos diferentes (apenas em MSM - 1; pré-enriquecidos com BHI - 2) e após o ponto estão representados diferentes isolados de uma mesma amostra. Exibe-se o cálculo da média dos IE e os desvios-padrão (triplicata/amostra). Fonte: (Autoria própria, 2024).

Nesse total, os 3 primeiros isolados conseguiram produzir lipases e simultaneamente degradar PEG, sendo provenientes do solo da célula inativa (E2.2), do chorume jovem (B2.3) e da célula ativa com infiltrado de chorume (C1.3). Já o isolado G1.1 foi o único que não apresentou essa dupla atividade, sendo obtido das proximidades da célula ativa com resíduo plástico na amostra. Ademais, os isolados C1.3 e G1.1 apresentaram IE satisfatórios, com valores iguais ou superiores a 1,5 (Florencio *et al.*, 2012), enquanto E2.2 e B2.3 foram considerados potenciais produtores de lipases. Todas as colônias apresentaram baixos desvios-padrão, com valores entre 0,07 e 0,35.

Adicionalmente, foi testado meio contendo azeite de oliva a 1% com tween 20 0,2% para detecção de lipase. Após 48h, as placas foram observadas quanto a presença ou ausência de halo (Tabela 4).

Tabela 4. Detecção de linhagens produtoras de lipase em meio contendo azeite 1%.

Isolado	IE	Isolado	IE
E2.2	$3,6 \pm 2,02$	C2.3	$2,7 \pm 0,21$
D2.2	$1,3 \pm 0,19$	A2.1	$1,2 \pm 0,03$
F2.1	$1,3 \pm 0,16$	D2.1	$1,4 \pm 0,1$
F1.2	$1,2 \pm 0,04$	C1.3	$1,5 \pm 0,25$
B2.2	$2,3 \pm 0,73$	A2.7	$1,6 \pm 0,22$
G1.3	$1,4 \pm 0,16$	A1.2	$2,2 \pm 0,2$

O IE é a relação entre diâmetro do halo de hidrólise e o diâmetro da colônia (Hankin; Anagnostakis, 1975). Cada identificador representa um isolado diferente, obtido de diferentes locais (representado pelas letras), de grupos diferentes (apenas em MSM - 1; pré-enriquecidos com BHI - 2) e após o ponto estão representados diferentes isolados de uma mesma amostra. Exibe-se o cálculo da média dos IE e os desvios-padrão (triplicata/amostra). Fonte: (Autoria própria, 2024).

A partir da Tabela 4, observa-se que dois isolados (E2.2 e C1.3) conseguiram produzir lipases em ambos os meios, confirmando assim a presença destas enzimas. Além disso, quando o meio foi composto por azeite de oliva 1%, mais microrganismos (12) apresentaram capacidade de produção de lipases, quando comparados com o meio contendo tween 80 (Tabela 3). Os melhores índices apresentam variação entre 1,5 e 3,6, totalizando 6 isolados com atividade satisfatória. Todas as colônias apresentaram baixos desvios-padrão (variando entre 0,03 e 0,73) com exceção do isolado E2.2, o qual apresentou maior IE (3,6) e alto desvio-padrão (2,02). Tal resultado pode ser atribuído a uma baixa reprodutibilidade nos ensaios.

Para identificação dos microrganismos produtores de esterases, foi realizado novamente o método de precipitação de cálcio, porém utilizando tween 20 como substrato. A visualização ocorreu através da formação de precipitado branco ao redor das colônias e os índices enzimáticos foram calculados (Tabela 5).

Tabela 5. Bactérias produtoras de esterase em meio contendo tween 20.

Isolado	IE	Isolado	IE
C1.2	1,3 ± 0,15	D1.2	1,7 ± 0,47
D2.2	1,4 ± 0,07	E2.1	1,8 ± 0,66
G2.2	1,4 ± 0,14	F1.1	1,6 ± 0,42
C2.1	1,6 ± 0,45	C1.4	1,3 ± 0,2
D2.1	1,4 ± 0,21	F1.2	1,4 ± 0,25
G1.1	1,3 ± 0,2	C1.1	1,5 ± 0,3
A2.7	1,5 ± 0,27		

O IE é a relação entre diâmetro do halo de hidrólise e o diâmetro da colônia (Hankin; Anagnostakis, 1975). Cada identificador representa um isolado diferente, obtido de diferentes locais (representado pelas letras), de grupos diferentes (apenas em MSM - 1; pré-enriquecidos com BHI - 2) e após o ponto estão representados diferentes isolados de uma mesma amostra. Exibe-se o cálculo da média dos IE e os desvios-padrão (triplicata/amostra). Fonte: (Autoria própria, 2024).

A partir da Tabela 5, observa-se que diferentes microrganismos conseguiram hidrolisar o tween 20 e promover a precipitação do cálcio, indicando a produção de esterases. Ademais, quatro isolados (D2.2, D2.1, A2.7 e F1.2) conseguiram produzir lipases e esterases simultaneamente. Os melhores resultados têm seu IE variando entre 1,5 e 1,8, totalizando 6 isolados. Dentre esses, os desvios-padrão variavam entre 0,07 e 0,66, indicando uniformidade nos dados.

Estes resultados demonstram que aterros abrigam microrganismos que conseguem produzir enzimas com potencial aplicação biotecnológica. Kumar *et al.* (2012) investigaram cepas de *Bacillus* sp., obtidas do lixo comum, as quais exibiram atividades satisfatórias de lipase e esterase.

Ainda assim, pesquisas realizadas por Fukuzaki e colaboradores (1989) mostraram a ação de enzimas no processo de degradação de copolímeros, principalmente a partir da catálise de esterases, enquanto a lipase proveniente de *Rhizopus delemer* apresentou a maior atividade de degradação.

Khandare *et al.* (2021) revelaram a presença de enzimas lipases, esterases, manganês peroxidases e lacases durante a degradação de Polietileno de Baixa Densidade (LDPE).

Nesse sentido, foi investigado também a produção de enzimas lacases, as quais possuem capacidade de oxidar variados compostos fenólicos e aminas aromáticas (Kumar *et al.*, 2016). Assim, buscou-se detectar a presença dessas enzimas através do método de descoloração de corantes, com a utilização do Azul de Bromofenol (Ramnath *et al.*, 2017). Os resultados positivos são demonstrados através da mudança de coloração do azul para amarelo ao redor da colônia e a adsorção também tem sido relatada (Singh *et al.*, 2010).

Através deste ensaio não foi possível detectar isolados com capacidade de descoloração nas condições estabelecidas. Contudo, os microrganismos que conseguiram crescer no meio, realizaram adsorção do corante, observado por meio das colorações que variavam entre roxo e azul. Os microrganismos que adsorveram estão resumidos na Tabela 6.

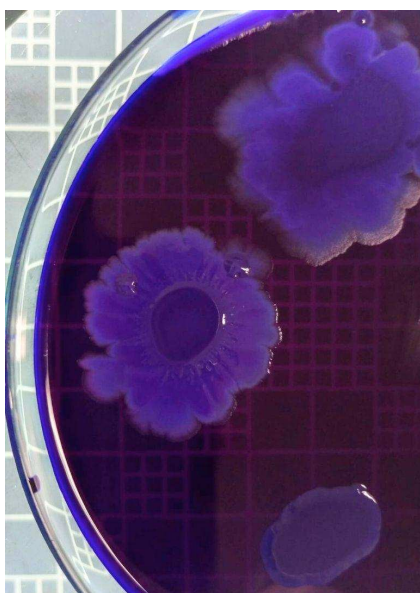
Tabela 6. Isolados bacterianos que apresentaram capacidade de adsorção do Azul de Bromofenol.

Isolado	Resultado	Isolado	Resultado	Isolado	Resultado
D2.2	+	C1.1	+	F2.2	+
C1.2	+	C2.1	+	A2.8	+
B2.1	+	H1.2	+	H2.2	+
E2.3	+	F1.2	+	A2.2	+
D1.1	+	A2.6	+	A2.4	+
B2.3	+	A2.7	+	C2.3	+
F1.2	+	G1.4	+	A2.2	+
C1.4	+	E2.1	+	A2.5	+
D1.2	+				

Cada identificador representa um isolado diferente, obtido de diferentes locais (representado pelas letras), de grupos diferentes (apenas em MSM - 1; pré-enriquecidos com BHI - 2) e após o ponto estão representados diferentes isolados de uma mesma amostra. Os resultados representados por (+) indicam os isolados que cresceram e adsorveram. Os demais isolados não apresentados não cresceram nos meios (triplicata/amostra). Fonte: (Autoria própria, 2024).

Do total de bactérias, 25 conseguiram crescer e adsorver o corante, como observado na Figura 14. De acordo com Knapp *et al.* (1995), a adsorção tem sido relatada como um dos primeiros mecanismos de descoloração, onde o corante é adsorvido na superfície celular microbiana.

Figura 14. Isolados que adsorveram Azul de Bromofenol e apresentaram coloração diferente do habitual.



Fonte: (Autoria própria, 2024)

Ademais, diferentes substratos podem atuar como indicadores da produção de lacases, como, por exemplo, o substrato guaiacol. Este reagente sintético tem como característica principal ser um composto fenólico passível de oxidação por estas enzimas. Assim, foi realizado teste adicional com este substrato, onde resultados positivos foram visualizados pela formação de coloração vermelha-marrom nas colônias (Kiiskinen, *et al.*, 2004; Sheikhi, *et al.*, 2012). Os resultados para produção de lacase, em meio suplementado com guaiacol, estão resumidos na Tabela 7.

Tabela 7. Isolados positivos para produção de lacase com guaiacol.

Isolado	Resultado
E2.2	+
C1.3	+
A1.3	+
D1.2	+
C1.2	+

Fonte: (Autoria própria, 2024)

Kiiskinen e colaboradores (2004) sugerem em suas análises que a utilização de guaiacol permite uma detecção mais facilitada de lacases, podendo servir como uma forma de triagem da sua atividade. A partir dos ensaios realizados nesse estudo, observa-se que 5 isolados exibiram produção de enzimas lacase, quando em contato com o substrato guaiacol.

Os isolados positivos em Ramnath *et al.* (2017) e Sheikhi *et al.* (2012) sofreram alterações na coloração normal das colônias, variando entre o vermelho e marrom. Nossos isolados apresentaram alterações em suas colorações normais, variando entre rosa e castanho, visualizados na Figura 15.

Figura 15. Isolados em placas suplementadas com guaiacol, onde a bactéria identificada como C1.2 exibiu mudanças de coloração do branco para castanho (seta).



(Fonte: Autoria própria, 2024)

Ainda assim, esses isolados foram obtidos do solo da célula inativa (E) e suas proximidades (A), bem como, do solo da célula ativa 1 (D) e do solo da célula ativa com infiltrado de chorume (C). A partir deste último ponto (C), duas bactérias demonstraram capacidade de produção de lacases (C1.2 e C1.3). Estes dados evidenciam que a constante deposição de resíduos e a presença de chorume no solo, tornam este ambiente rico em nutrientes, os quais atuam como selecionadores de microrganismos. Estes, por sua vez, adaptam-se à presença dos xenobióticos e demonstram capacidade para produção de enzimas extracelulares, as quais degradam resíduos e seus subprodutos.

A ação dessas enzimas tem sido relatada na degradação plástica, como em Santo *et al.* (2013), ocorrendo redução no peso molecular do polietileno, quando incubados com lacases de *Rhodococcus ruber*, durante 30 dias de experimentação.

Ray *et al.* (2023) propôs uma oxidação biocatalítica promovida por essas enzimas, como forma de pré-tratamento, para melhorar a degradação de polietileno e policarbonato. Por meio deste estudo, foi verificado a oxidação superficial dos plásticos através de análises por microscopia eletrônica de varredura (MEV) e espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR). Esta oxidação promoveu uma redução na hidrofobicidade, facilitando a formação de biofilmes microbianos.

Para caracterização tintorial e morfológica, foram observados alguns aspectos, tais como: resposta tintorial por coloração de Gram (positivo ou negativo), morfologia (cocos, bacilos, estreptococos, estreptobacilos, sarcina, diplococos, diplobacilos) e ainda foram observadas características visuais das colônias, através das colorações (branca, amarelada, laranja, rosa e levemente castanho) e na intensidade destas; textura (lisa, rugosa e gelatinosa) e tamanho das colônias (pequenas, médias e grandes). Os isolados que apresentaram capacidade de degradação de PEG e produção de lipases, esterases e lacases foram avaliados e resumidos na tabela 8:

Tabela 8. Caracterização tintorial, morfológica e visual dos isolados que apresentaram mecanismos de degradação de PEG e produção de enzimas, visualizados em microscópio óptico.

Isolado	Resposta Tintorial		Tamanho	Pigmento
	(Gram)	Morfologia		
B2.1	-	Estreptobacilos	Média	Branco
C2.2	+	Bacilos	Grande	Branco
A2.1	+	Cocos	Pequena	Rosa claro
A2.8	+	Bacilos	Média	Laranja
E2.2	+	Estreptobacilos	Média	Branco
F2.2	+	Bacilos	Média	Branco
H2.1	+	Estreptobacilos	Grande	Branco
E2.1	+	Estreptobacilos	Média	Amarelo claro
A2.6	+	Cocos	Pequena	Laranja
A1 .1	+	Bacilos	Média	Castanho claro
B2.3	+	Bacilos	Média	Rosa claro
C1.3	+	Sarcina	Média	Amarelo
G1.1	+	Estreptobacilos	Média	Castanho claro
D2.2	+	Diplobacilo	Média	Branco
F2.1	+	Estreptobacilos	Média	Amarelo claro
F1.2	-	Cocos	Média	Branco
B2.2	+	Estreptobacilos	Média	Branco

G1.3	+	Bacilos	Média	Branco
C1.2	+	Bacilos	Grande	Branco
G2.2	+	Estreptobacilos	Média	Branco
C2.1	+	Bacilos	Grande	Amarelo claro
D2.1	+	Estreptobacilos	Média	Branco
A2.7	+	Estreptobacilos	Pequena	Castanho claro
E2.3	+	Estreptobacilos	Média	Castanho claro
D1.1	+	Diplococos	Média	Rosa claro
F1.1	+	Cocos	Média	Amarelo claro
C1.4	+	Diplococos	Média	Branco
H1.2	-	Estreptococos	Média	Castanho claro
D1.2	+	Cocos	Grande	Branco
A2.2	+	Cocos	Pequena	Castanho claro
A2.4	+	Estreptobacilos	Pequena	Amarelo claro
C2.3	+	Cocos	Grande	Amarelo claro
A2.5	+	Bacilos	Média	Amarelo claro

Fonte: (Autoria própria, 2024)

A tabela 8 evidencia que boa parte dos isolados exibidos configuram-se como sendo Gram-positivos, enquanto apenas 3 são Gram-negativos. Assim, do total de bactérias obtidas, 33 culturas foram eficientes na produção de algum tipo de enzima relacionada a degradação, e em menor escala, na degradação do PEG.

Através dos dados gerados, 12 isolados bacterianos demonstraram capacidade para utilização em processos de biodegradação, os quais foram selecionados por meio da capacidade de utilização do PEG e que apresentaram a produção de algum tipo de enzima simultaneamente. Dentre estes, os escolhidos foram: E2.2 (produziu todos os tipos de enzimas ensaiadas, bem como, degradou PEG); C1.3 (degradação de PEG, produção de lipases e lacases); A1.2 (degradação de PEG e produção de lipases); A2.1 (degradação de PEG e produção de lipases) e E2.1 (degradação de PEG e produção de esterases).

8. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados atestam que aterros sanitários configuram-se como ambientes propícios para o crescimento e seleção microbiana. Estes, por sua vez, podem ser isolados através de técnicas com e sem pré-enriquecimento.

Através deste estudo, foi possível isolar 46 bactérias de amostras de solo, resíduos plásticos e chorume de um aterro sanitário, os quais apresentaram variações em suas morfologias e respostas tintoriais.

Os dados demonstram a presença de 33 isolados que exibiram capacidade de produção de enzimas-chave relacionadas com a biodegradação de plásticos, bem como, em menor escala, na degradação do PEG.

O estudo apresentou resultados favoráveis na seleção e triagem de microrganismos que podem ser utilizados em futuros processos de biodegradação de PEAD, sendo então escolhidos os isolados (E2,2; C1.3; A1.2; A2.1 e E2.1), os quais produziram simultaneamente enzimas e degradaram polietilenoglicol. Estes resultados configuram-se como um avanço para a biorremediação de plásticos e na sustentabilidade ambiental.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABIPLAST. Perfil 2022. 2022. Disponível em:
<https://www.abiplast.org.br/wp-content/uploads/2023/09/perfil_2022_pt.pdf>. Acesso em: 04 mar. 2024.
- AGÊNCIA BRASIL. Embalagens plásticas e garoto no Lixão da Cidade Estrutural, DF-BR. 2008. Disponível:
<https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Lixo_PET_20080220_-_Marcello_Casal_Jr._-_Agencia_Brasil.jpg>. Acesso em: 10 abr. 2023.
- AGÊNCIA BRASIL. Lixão da Estrutural. Flickr. 2014. Disponível em:
<<https://www.flickr.com/photos/agenciasenado/15672548605/>>. Acesso: 12 abr. 2023.
- ALMEIDA, E. M. S.; COELHO, D. C. L. **Uso de sistemas de informações geográficas na gestão dos resíduos sólidos urbanos no município de Mossoró-RN**. 2018. Trabalho de Conclusão de Curso (Ciência e Tecnologia) - Universidade Federal Rural do Semi-árido, Mossoró (RN), 2018.
- ALMEIDA, L. R. O.; OTTONI, J. R.; PASSARINI, M. R. Z. Plásticos no ambiente marinho frio: uma revisão sobre o potencial de biodegradação microbiana. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 3, 2021.
- ARAÚJO, A. C.; MOREIRA, B. G.; LIMA, T. M. P. **Impactos da Degradação do Plástico no Meio Ambiente e na Saúde Humana: Uma Revisão**. 54 f. 2022. Trabalho de Conclusão de Curso (Tecnologia em Processos Químicos) - Faculdade de Tecnologia de Campinas. Campinas, São Paulo (SP), 2022.
- ARPIA, A. A.; CHEN, W.; UBANDO, A. T.; NAQVI, S. R.; CULABA, A. B. Microplastic degradation as a sustainable concurrent approach for producing biofuel and obliterating hazardous environmental effects: A state-of-the-art review. **Journal of Hazardous Materials**, v. 418, n. 15, 2021.
- ATLAS DO PLÁSTICO. Fatos e números sobre o mundo dos polímeros sintéticos. Fundação Heinrich Böll. ISBN, 2020. Disponível em:
<<https://br.boell.org/sites/default/files/2020-11/Atlas%20do%20PI%C3%A1stico%20-%20vers%C3%A3o%20digital%20-%2030%20de%20novembro%20de%202020.pdf>>. Acesso em: 14 abr. 2023.
- BABAVALIAN, H.; AMOOZEGAR, M. A.; ZAHRAEI S.; ROHBAN, R.; SHAKERI, F.; MOGHADDAM, M.M. Comparison of Bacterial Biodiversity and Enzyme Production in Three Hypersaline Lakes; Urmia, Howz-Soltan and Aran-Bidgol. **Indian Journal of Microbiology**, v. 54, p. 444-449, 2014.

BARDAJÍ, D. K. R. **Isolamento de bactérias com potencial para biodegradação de plásticos**. 2018. 84f. Tese (Doutorado em Biociências Aplicadas à Farmácia) - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto (SP), 2018.

CAIXETA, D. S.; MORAIS, E. B. Panorama mundial de produção de plástico e estratégias de degradação. **Enciclopédia Biosfera - Centro Científico Conhecer**, v. 19, n. 39, p. 230, 2022.

CAMPOS, A. S. **Poli (ácido láctico): alternativa sustentável para a substituição dos materiais descartáveis plásticos na Odontologia?**. 2022. 47f. Trabalho de Conclusão de Curso (Odontologia) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis (SC), 2022.

CAMPOS, L. L.; OLIVEIRA, J. C. M. D. **Bioprospecção de bactérias produtoras de enzimas hidrolíticas de interesse industrial a partir de amostras de compostagem**. Faculdade Ciências da Vida. Disponível em:

<https://www.faculadecienciasdavidada.com.br/sig/www/opened/ensinoBibliotecaVirtual/000327_624cd27bc50db_000235_5e3458150c3db_TCC_Lara_3101_corrigido_banca.pdf>. Acesso em: 28 abr. 2023.

CARNEIRO, T. M. Q. A.; SILVA, L. A.; GUENTHER, M. A poluição por plásticos e a educação ambiental como ferramenta de sensibilização. **Revista Brasileira de Educação Ambiental (RevBEA)**, v. 16, n. 6, 2021.

CHEN, X.; XIONG, X.; JIANG, X.; SHI, H.; WU, C. Sinking of floating plastic debris caused by biofilm development in a freshwater lake. **Chemosphere**, v. 222, p. 856-864, 2019.

CHEN, X.; YAN, N. A brief overview of renewable plastics. **Materials Today Sustainability**, v. 7-8, 2020.

COSTA, C. Z.; ALBUQUERQUE, M. C. C.; BRUM, M. C.; CASTRO, A. M. Degradação Microbiológica e Enzimática de Polímeros: Uma Revisão. **Quim. Nova**, v. 38, n. 2, p. 259-267, 2015.

COSTA, J. P.; DUARTE, A. C.; SANTOS, T. R. Plásticos no ambiente. **Revista Recursos Hídricos**, v. 40, n. 1, p. 11-18, 2019.

COUTINHO, F. M. B.; MELLO, I. L.; MARIA, L. C. S. Polietileno: principais tipos, propriedades e aplicações. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 13, n. 1, p. 1-13, 2003.

EDSON, E. A. **Avaliação da produção de hidrolases por microrganismos halófilos de salina do litoral potiguar**. 2017. 44f. (Trabalho de Conclusão de Curso, Biotecnologia) – Universidade Federal Rural do Semiárido, Mossoró, 2017.

ERIKSEN, M.; LEBRETON, L. C. M.; *et al.* Plastic pollution in the world's oceans: more than 5 trillion plastic pieces weighing over 250,000 tons afloat at sea. **PloS One**, v. 9, n. 12, 2014.

EUROPEAN BIOPLASTICS. What are bioplastics? Material types, terminology, and labels - An introduction. 2018. Disponível em:

<https://docs.european-bioplastics.org/publications/fs/EuBP_FS_What_are_bioplastics.pdf>. Acesso em: 17 abr. 2023.

FLORENCIO, C.; COURI, S.; FARINAS, C. S. Correlation between Agar Plate Screening and Solid-State Fermentation for the Prediction of Cellulase Production by *Trichoderma* Strains. **Enzyme Research**, 793708, 2012.

FOROOTANFAR, H.; MOEZZI, A.; *et al.* Synthetic dye decolorization by three sources of fungal laccase. **Iranian Journal of Environmental Health Sciences & Engineering**, v. 9, n. 27, 2012.

FRIMAIO, A. **Desenvolvimento de compostos termoplásticos ou termofixos radiologicamente equivalentes ao tecido humano**. 2019. 139f. Tese (Doutorado, área de Tecnologia Nuclear - Aplicações) - Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (USP), São Paulo (SP), 2019.

FUKUZAKI, H.; YOSHIDA, M.; ASANO, M.; KUMAKURA, M. Synthesis of copoly(D,L-lactic acid) with relatively low molecular weight and *in vitro* degradation. **European Polymer Journal**, v. 25, n.10, p. 1019-1026, 1989.

GALLO, F.; FOSSI, C.; WEBER, R.; SANTILLO, D.; *et al.* Marine litter plastics and microplastics and their toxic chemicals components: the need for urgent preventive measures. **Environmental Sciences Europe**, v. 30, n. 13, 2018.

GEYER, R.; JAMBECK, J. R.; LAW, K. L. Production, use, and fate of all plastics ever made. **Science advances**, v. 3, n. 7, 2017.

GOLWALA, H.; ZHANG, X.; ISKANDER, S. M. Solid waste: An overlooked source of microplastics to the environment. **Science of the Total Environment**, v. 769, n. 15, 2021.

GREGORY, M. R. Environmental implications of plastic debris in marine settings - entanglement, ingestion, smothering, hangers-on, hitch-hiking and alien invasions. **Biological Sciences**, v. 364, n. 1526, p. 2013-2025, 2009.

GU, J.D. Biodegradability of plastics: the issues, recent advances, and future perspectives. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 28, p. 1278-1282, 2021.

GUO, X.; WANG, J. The chemical behaviors of microplastics in marine environment: A review. **Marine Pollution Bulletin**, v. 142, p. 1-14, 2019.

GUPTA, K. K.; DEVI, D.; RANA, D. Isolation and screening of low density polyethylene (LDPE) degrading bacterial strains from waste disposal sites. **World Journal of Pharmaceutical Research**, v. 5, n. 11, p. 1633-1643, 2016.

HANKIN, L.; ANAGNOSTAKIS, S.L. **The use of solid media for detection of enzymes production by fungi.** *Mycologia*, v. 67, p. 597- 607, 1975.

IQBAL, S.; KHALID, Z. M.; MALIK, K. A. Enhanced biodegradation and emulsification of crude oil and hyper production of biosurfactant by gamma ray – induced mutant of *Pseudomonas aeruginosa*. **Letters in Applied Microbiology**, v. 21, p. 176-179, 1995.

JAGTAP, S.; YAVANKAR, S.; PARDESI, K.; CHOPADE, B. Production of bioemulsifier by *Acinetobacter* sp. from healthy human skin of tribal population. **Indian Journal of Experimentl Biology**, v. 48, n.1, p. 70-76, 2009.

JAMBECK, J. R.; GEYER, R.; WILCOX, C.; *et al.* Plastic waste inputs from land into the ocean. **Science**, v. 347, n. 6223, p. 768-771, 2015.

KHANDARE, S. D.; CHAUDHARY, D. R.; JHA, B. Marine bacterial biodegradation of low-density polyethylene (LDPE) plastic. **Biodegradation**, v. 32, p. 127-143, 2021.

KIISKINEN, L. L.; RATTO, M.; KRUUS, K. Screening for novel laccase-producing microbes. *Journal of Applied Microbiology*, v. 97, p. 640–646, 2004.

KNAPP, J. S.; NEWBY, P. S.; REECE, L. P. Decolorization of dyes by wood-rotting basidiomycete fungi. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 17, n. 7, p. 664-668, 1995.

KUMAR, D.; KUMAR, L.; NAGAR, S.; RAINA, C.; *et al.* Screening, isolation and production of lipase/esterase producing *Bacillus* sp. strain DVL2 and its potential evaluation in esterification and resolution reactions. **Arch. Appl. Sci. Res.**, 4 (4), p. 1763-1770, 2012.

KUMAR, R.; KAUR, J.; JAIN, S.; KUMAR, A. Optimization of laccase production from *Aspergillus flavus* by design of experiment technique: Partial purification and characterization. **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology**, v. 14, n. 1, p. 125-131, 2016.

LAET, D. Fotos chocantes mostram efeito do plástico no mar; campanha em Maceió faz alerta. TNH1. 2018. Disponível em: <<https://www.tnh1.com.br/noticia/nid/fotos-chocantes-mostrar-efeito-de-plastico-no-mar-campanha-em-maceio-faz-alerta/>>. Acesso 20 abr. 2023.

LEBRETON, L.; SLAT, B.; FERRARI, F.; *et al.* Evidence that the Great Pacific Garbage Patch is rapidly accumulating plastic. **Scientific reports**, v. 8, n. 1, p. 4666, 2018.

LIWARSKA-BIZUKOJC, E. Effect of (bio)plastics on soil environment: A review. **Science of the Total Environment**, v. 795, n. 15, 2021.

MADALENO, E.; ROSA, D. S.; ZAWADZKI, S. F.; PEDROZO, T. H.; RAMOS, L. P. Estudo do uso de plastificantes de fontes renováveis em composições de PVC. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 19, n. 4, p. 263-270, 2009.

MALLMANN, V.; ARAGÃO, L. W. R.; FERNANDES, S. S. L.; *et al.* As vantagens da biorremediação na qualidade ambiental. **Ensaio e Cienc.**, v. 23, n. 1, p. 12-15, 2019.

MATA-ALVAREZ, J. Biomethanization of the organic fraction of municipal solid waste. 2. ed. Londres: Iwa Publishing. p. 323, 2002.

MATJAŠIČ, T.; SIMČIČ, T.; *et al.* Critical evaluation of biodegradation studies on synthetic plastics through a systematic literature review. **Science of Total Environment**, v. 752, 2021.

MIZOGUCHI, I. H. **Os desafios do plástico e cenários para o futuro**. 2019. 69f. Monografia (Ciências Econômicas) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre (RS), 2019.

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**, v. 73, n. 6, 2023.

NAPOLI, C. M. **Estudo do polietileno de alta densidade reciclado**. 2022. 56f. Trabalho de Conclusão de Curso (Ciência e Tecnologia do Mar) - Universidade Federal de São Paulo, Santos (SP), 2022.

OECD. **Global Plastics Outlook: Policy Scenarios to 2060**. 2022. OECD Publishing, Paris.

PEDROSA, R. M. A. **Produção de biossurfactantes por microrganismos halofílicos oriundos de salina do litoral setentrional potiguar**. 2017. 58f. Monografia (Biotecnologia) - Universidade Federal Rural do Semi-árido, Mossoró (RN), 2017.

PENG, B.; CHEN, Z.; CHEN, J.; YU, H.; *et al.* Biodegradation of Polyvinyl Chloride (PVC) in *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae) larvae. **Environment International**, v. 145, 2020. PLASTICSEUROPE. **Plastics – the Facts 2022**. PlasticsEurope and EuPC, Editors: Brussels. 2022.

PLASTICS EUROPE. Plastics - The fast Facts 2023. 2023. Disponível em: <<https://plasticseurope.org/wp-content/uploads/2023/10/Plasticsthefastfacts2023-1.pdf>>. Acesso em: 04 mar. 2024.

POWER, C. A Grande Mancha de Lixo no Pacífico. AMA - Agentes do Meio Ambiente. 2023. Disponível em: <<https://blog.cidadeama.com.br/a-grande-mancha-de-lixo-no-pacifico/>>. Acesso: 20 abr. 2023.

RABELLO, M. S.; WHITE, J. R. Fotodegradação do Polipropileno: um processo essencialmente heterogêneo. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, 1997.

RAMNATH, L.; SITHOLE, B.; GOVINDEN, R. Identification of lipolytic enzymes isolated from bacteria indigenous to *Eucalyptus* wood species for application in the pulping industry. **Biotechnology Reports**, v. 15, p. 114–124, 2017.

RAY, A. S.; RAJASEKARAN, M.; et al. Laccase driven biocatalytic oxidation to reduce polymeric surface hydrophobicity: An effective pre-treatment strategy to enhance biofilm mediated degradation of polyethylene and polycarbonate plastics. **Science of The Total Environment**, v. 904, 166721, 2023.

RODOLFO JR, A.; MEI, L. H. I. Mecanismos de degradação e estabilização térmica do PVC. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 17, n. 3, p. 263-275, 2007.

RODRIGUES, T. T. **Polímeros nas indústrias de embalagens**. 2018. 59f. Trabalho de Conclusão de Curso (Engenharia Química) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia (MG), 2018.

SANTO, M.; WEITSMAN, R.; SIVAN, A. The role of the copper-binding enzyme – laccase – in the biodegradation of polyethylene by the actinomycete *Rhodococcus ruber*. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 84, p. 204-210, 2013.

SANTOS, J. F. **Proteínas de *Bacillus pumilus* envolvidas na degradação de petróleo e diesel**. 2014. 113f. Mestrado (Biotecnologia) - Universidade Federal do Amazonas, Manaus (AM), 2014.

SHEIKHI, F.; ARDAKANI, M. R.; ENAYATIZAMIR, N.; RODRIGUEZ-COUTO, S. The Determination of Assay for Laccase of *Bacillus subtilis* WPI with Two Classes of Chemical Compounds as Substrates. **Indian J. Microbiol.**, v. 52, n.4, p. 701–707, 2012.

SILVA, H. D. F. **Plástico residual: poluente expandido pela COVID-19 e a atuação da biotecnologia em mitigar o dano ambiental**. 2021. 40f. Monografia (Bacharelado em Biotecnologia) - Universidade Federal de Uberlândia, Patos de Minas (MG), 2021.

SKARIYACHAN, S.; TASKEEN, N.; KISHORE, A. P.; KRISHNA, B. V. Recent advances in plastic degradation – From microbial consortia-based methods to data sciences and computational biology driven approaches. **Journal of Hazardous Materials**, v. 426, 2022

SPERB, J. G. C. Avaliação qualitativa da produção de lipases e biossurfactantes por fungos isolados de resíduos oleosos. **Engvista**, v. 17, p. 385-397, 2015.

SPILBORGHS, M. C. F. **Biorremediação de aquífero contaminado com hidrocarboneto**. 1997. 162f. Dissertação (Mestrado em Recursos Minerais e Hidrogeologia) - Universidade de São Paulo, São Paulo (SP), 1997.

TEUTEN, E. L.; SAQUING, J. M.; KNAPPE, D. R. U.; BARLAZ, M. A.; *et al.* Transport and release of chemicals from plastics to the environment and to wildlife. **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci**, v. 364, n. 1526, p. 2027-2045, 2009.

THEW, C. X. E.; LEE, Z. S.; SRINOPHAKUN, P.; OOI, C. W. Recent advances and challenges in sustainable management of plastic waste using biodegradation approach. **Bioresource Technology**, v. 374, 2023.

THOMPSON, R. C.; MOORE, C. J.; *et al.* Plastics, the environment and human health: current consensus and future trends. **Biological Sciences**, v. 364, n. 1526, p. 2153-2166, 2009.

TREPTOW, J. P. **Estudo do metabolismo de polietileno: desvendando as estratégias metabólicas microbianas envolvidas na biodegradação de plásticos**. 2018. 202f. Tese (Doutorado em Biologia Molecular) - Universidade de Brasília (DF), 2018.

UFSC. Avaliação do Ciclo de Vida - Polietileno. 2023. Disponível em: <https://repositorio.ufsc.br/bitstream/handle/123456789/243724/fichaPolietileno_final.pdf?sequence=1>. Acesso em: 18 abr. 2023.

UNEP - United Nations Environmental Programme. Single Use Plastics: A Roadmap for Sustainability. 2018. Disponível em: <<https://www.unep.org/resources/report/single-use-plastics-roadmap-sustainability>>. Acesso em: 15 abr. 2023.

WORLD ECONOMIC FORUM. The New Plastics Economy: Rethinking the future of plastics. 2016. Disponível em: <<https://www.weforum.org/reports/the-new-plastics-economy-rethinking-the-future-of-plastics>>. Acesso em: 26 abr. 2023.

YASIN, N. M.; AKKERMANS, S.; IMPE, J. F. M. V. Enhancing the biodegradation of (bio)plastic through pretreatments: A critical review. **Waste Management**, v. 150, p. 1-12, 2022.

ZANONI, M. V. B.; YAMANAKA, H. **Corantes: caracterização química, toxicológica, métodos de detecção e tratamento**. Cultura Acadêmica: São Paulo (SP), 1 ed. 2016.

ZHANG, K.; HAMIDIAN, A. H.; TUBIC, A.; *et al.* Understanding plastic degradation and microplastic formation in the environment: A review. **Environmental Pollution**, v. 274, 2021.