

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS – GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

AVALIAÇÃO DA DEGRADAÇÃO DE POLÍMEROS POR
METARHIZIUM ANISOPLIAE

Dissertação de mestrado

Letícia Marconatto

Porto Alegre, 2013

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS – GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

AVALIAÇÃO DA DEGRADAÇÃO DE POLÍMEROS POR
METARHIZIUM ANISOPLIAE

Dissertação de mestrado

Dissertação submetida ao Programa de Pós-
Graduação em Biologia Celular e Molecular
do Centro de Biotecnologia da Universidade
Federal do Rio Grande do Sul como
requisito parcial para obtenção do Grau
de Mestre.

Letícia Marconatto

Orientadora: Prof^a. Dra. Marilene Henning Vainstein

Porto Alegre, 2013

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Fungos de Importância Médica e Biotecnológica, no Centro de Biotecnologia em parceria com Laboratório de Fotoquímica e Superfícies, no Instituto de Química, ambos estabelecidos na Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Ser chique:

A verdade é que ninguém é chique por decreto.

É algumas boas coisas da vida, infelizmente, não estão à venda.

Elegância é uma delas. Assim, para ser chique é preciso muito mais que um guarda-roupa ou closet recheado de grifes famosas e importadas.

Muito mais que um belo carro.

O que faz uma pessoa chique, não é o que essa pessoa tem, mas a forma como ela se comporta perante a vida. Chique mesmo é quem fala baixo. Quem não procura chamar atenção com suas risadas muito altas, nem por seus imensos decotes e nem precisa contar vantagens, mesmo quando estas são verdadeiras.

Chique é atrair, mesmo sem querer, todos os olhares, porque se tem brilho próprio.

Chique mesmo é ser discreto, não fazer perguntas ou insinuações inoportunas, nem procurar saber o que não é da sua conta.

É evitar se deixar levar pela mania nacional de jogar lixo na rua. Chique mesmo é dar bom dia ao porteiro do seu prédio e às pessoas que estão no elevador. É lembrar-se do aniversário dos amigos.

Chique mesmo é olhar nos olhos do seu interlocutor. É “desligar o radar”, “o telefone”, quando estiver sentado à mesa do restaurante, prestar verdadeira atenção a sua companhia.

Chique mesmo é honrar a sua palavra, ser grato a quem o ajuda, correto com quem você se relaciona e honesto nos seus negócios.

Chique mesmo é não fazer a menor questão de aparecer, ainda que você seja o homenageado da noite!

Chique do chique é não se iludir com “trocentas” plásticas do físico... quando se pretende corrigir o caráter: não há plástica que salve grosseria, incompetência, mentira, fraude, agressão, intolerância, ateísmo... falsidade.

Mas, para ser chique, chique mesmo, você tem, antes de tudo, de se lembrar sempre de o quão breve é a vida e de que, ao final e ao cabo, vamos todos terminar da mesma maneira, mortos sem levar nada material deste mundo.

Portanto, não gaste sua energia com o que não tem valor, não desperdice as pessoas interessantes com quem se encontrar e não aceite, em hipótese alguma, fazer qualquer coisa que não lhe faça bem, que não seja correta.

Investir em conhecimento pode nos tornar sábios... mas, Amor e Fé nos tornam humanos!”

Adaptado de “Ser chique” por Glória Kalil

Pois me cingiste de força para a peleja; fizeste abater debaixo de mim aqueles que contra mim se levantaram. (Salmos 18:39)

Dedico este trabalho ao meu esposo Tiago Abreu, o qual esteve ao meu lado, incondicionalmente e incansavelmente, me apoiando, me fortalecendo, me ensinando a controlar meus medos e minhas ansiedades (que não foram poucas).

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que de alguma maneira estiveram presentes durante essa caminhada:

À minha orientadora Prof^a. Dra. Marilene H. Vainstein por todo apoio durante este trabalho e por ter aceitado orientar um projeto tão diferente da rotina do laboratório.

À Dra. Livia e ao Prof^o Dr. Charley pelas muitas vezes em que me auxiliaram em dificuldades do dia-a-dia e pelas conversas informais quando chegávamos ao laboratório.

Ao Prof^o. Dr. Augusto Schrank pela ajuda nos momentos de dúvida.

Ao Prof^o Dr. Daniel E. Weibel pela colaboração estabelecida para o desenvolvimento deste projeto, por suas dúvidas sobre biologia que me fizeram crescer e descobrir coisas novas e por seu bom humor.

Ao doutorando e amigo Felipe Kessler, sem o qual este trabalho não seria possível, pela paciência, pela dedicação e pelos momentos de descontração.

À Gabriela pelo esforço para realização deste trabalho.

Ao pessoal do Laboratório E113, que me acolheu como integrante do grupo.

À Jozi pelas várias vezes em que me auxiliou e a toda equipe do Uniprote.

À Roberta por sido a “ponte” para minha chegada ao Centro de Biotecnologia.

À Silvinha, Grazi, Luciano, e a todo o pessoal da recepção, da secretaria e da vigilância.

À Terezinha e a Rosaura pelos serviços que tornam nossa rotina mais fácil, e pelas conversas de corredor que nos fazem sair um pouco do mundo científico.

Ao Centro de Biotecnologia como um todo pelo suporte oferecido para desenvolvimento deste trabalho.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico CNPq.

E a meus queridos colegas de trabalho dos laboratórios 220, 217 e 222:

Francine, Amanda e Glaci que carinhosamente eu chamava de minhas “ICs”. Vocês tiveram uma grande importância na parte final deste trabalho quando meus braços já não tinham mais forças e o tempo corria contra mim!!

À Sara, sempre tão centrada e dedicada, pela sua amizade, pelas conversas e conselhos!

À Alicia e a Cláudia pelas trilhas sonoras.

À Caru pela companhia nos sábados pela manhã.

À Pati pelas muitas explicações sobre biologia molecular e por seu exemplo de determinação.

À Nati e a Vanessinha pela companhia nos almoços no refeitório.

Ao Rafa que compartilha comigo a saudade das Missões, e por ter se tornado um grande amigo.

À Julia Catarina, que gosto de chamar somente de Catarina, por sua alegria de viver que me contagia todos os dias.

À Liline pela amizade e por seu enorme coração que muitas vezes não a deixa compreender as injustiças do mundo.

Aos demais colegas por seu apoio e amizade: Karol, Natully, Fernanda, Carol, Moara, Vanessa Feder, Paloma, Mateus, Marcos, Jonata e Julia.

Ao Nicolau pelas muitas dicas sobre artigos e por seu exemplo de dedicação.

À Thai por sua pureza que me encanta e, claro, pelos alfajores que muitas vezes me salvaram naqueles momentos de desespero!!!

À Angela pela disposição em sempre ajudar quem está precisando, sou testemunha de que muitas vezes deixou tudo que estava fazendo para ajudar um colega que estava “no sufoco” e também por suas gargalhadas que muitas vezes alegraram meu dia.

À Rana e ao Eder pelos muitos e muitos ensinamentos e pelos momentos de diversão.

À Anelise, pela amizade e pelas muitas dicas que foram de grande importância.

À Fran (do 222), pelos muitos momentos de conversas informais.

Especialmente agradeço à minha família, meus pais Jorge e Laurení e minha irmã Talita, que mesmo longe sei que estão sempre torcendo por mim, desculpem-me pela ausência e pelos momentos de *stress*, e ao meu esposo e não menos importante Tiago Abreu, que acompanhou cada passo dessa jornada e que sempre tinha uma palavra de apoio nos momentos de dificuldade.

Obrigada.

Sumário

1. Introdução	18
2. Revisão bibliográfica.....	18
2.1. História dos polímeros.....	18
2.2. Produção e reciclagem de polímeros	19
2.3. Polímeros	22
2.3.1. Polihidroxibutirato (PHB)	23
2.3.2. Polissulfona (PSU)	24
2.3.3. Poliuretana (PU).....	24
2.4. Modificação superficial.....	25
2.5. Biodegradação.....	26
2.6. <i>Metarhizium anisopliae</i>	28
3. Objetivos.....	32
3.1. Objetivo geral	32
3.2. Objetivos específicos	32
4. Material e métodos.....	33
4.1. Linhagens utilizadas e manutenção.....	33
4.2. Suspensão de esporos de <i>M. anisopliae</i>	33
4.3. Preparação dos polímeros	34
4.4. Condições de cultivo para testes de degradação de polímeros.....	35
4.5. Condições de cultivo para extração de proteínas	35
4.6. Eletroforese Unidimensional.....	36
4.7. Preparação de amostras para espectrometria de massas.....	37
4.8. Análise por Espectrometria de Massas (MS).....	38
4.9. Análise dos resultados	38
4.9.1. Proteínas	38
4.9.2. Gravimetria.....	39
4.9.3. FTIR-ATR (Espectroscopia em Infravermelho por Transformada de Fourier com método de refletância total atenuada)	39
4.9.4. ToF-SIMS (Espectrometria de massas por íons secundários por tempo de voo)	39
5. Resultados e Discussão.....	40
5.1. Desenvolvimento do fungo na presença de polímeros	40

5.2.	Semelhanças de desenvolvimento entre as linhagens	41
5.3.	Lavagem dos polímeros	42
5.4.	PHB	44
5.5.	PSU.....	46
5.6.	PU	50
5.7.	Gravimetria	54
5.8.	FTIR-ATR.....	60
5.8.1.	PHB.....	64
5.8.2.	PSU	73
5.8.3.	PU.....	79
5.9.	Tof-Sims	79
5.9.1.	PHB ST	80
5.9.2.	PHB 60' e 180'	81
5.9.3.	PHB X CG97.....	86
5.9.4.	PHB x E6.....	89
5.10.	Proteínas	96
6.	Conclusão	102
7.	Apêndice.....	105
	Referências Bibliográficas	117

Lista de figuras

Figura 1: Produção e utilização de plásticos.....	20
Figura 2: O Brasil no contexto mundial da reciclagem de plásticos.....	21
Figura 3: Quantidade de plástico reciclado (Mton) no Brasil.	22
Figura 4: Estrutura molecular de PHB.....	23
Figura 5: Armazenamento de PHB em bactérias..	23
Figura 6: Estrutura molecular de PSU.....	24
Figura 7: Estrutura molecular de PU.....	25
Figura 8: Sítios de inserção dos grupos oxigenados nas cadeias poliméricas.....	26
Figura 9: Diagrama esquemático da degradação de polímeros sob condições aeróbias e anaeróbias.....	27
Figura 10: Detalhes morfológicos de <i>Metarhizium anisopliae</i>	29
Figura 11: Estágios de infecção do hospedeiro por <i>M. anisopliae</i>	30
Figura 12: Morfologia das linhagens E6 e CG97 de <i>M. anisopliae</i>	32
Figura 13: Desenvolvimento de <i>M. anisopliae</i>	40
Figura 14: Microscopia ótica mostrando desenvolvimento similar nas duas linhagens (E6 e CG97) de <i>M. anisopliae</i>	42
Figura 15: Lavagem dos polímeros com auxílio de ultrassom.....	43
Figura 16: Microscopia de PHB ST controle.....	45
Figura 17: Microscopia do crescimento da linhagem CG97 sobre PHB ST.....	45
Figura 18: Microscopia do crescimento da linhagem CG97 sobre PHB ST.....	46
Figura 19: Microscopia de PSU ST controle.....	47
Figura 20: Microscopia de PSU ST X E6.	48
Figura 21: Microscopia de PSU 30' X E6.	49
Figura 22: Microscopia de PSU 120' X E6..	50
Figura 23: Microscopia PU sem tratamento.....	51
Figura 24: Microscopia de PU ST X CG97..	51
Figura 25: Microscopia de PU 30' X CG97..	52
Figura 26: Microscopia de PU 120' X CG97.	53
Figura 27: Microscopia Eletrônica de Varredura de PU X CG97.	54
Figura 28: Espectro de infravermelho do fungo <i>M. anisopliae</i>	61
Figura 29: Espectro de infravermelho PHB controles incubados por 10 dias	65
Figura 30: Espectro de infravermelho de PHB controles incubados por 20 dias.....	66
Figura 31: Espectro de Infravermelho de PHB ST X E6.....	68
Figura 32: Espectro de Infravermelho de PHB 60' X E6	70
Figura 33: Espectro de Infravermelho de PHB 180' X E6.....	72
Figura 34: Espectro de infravermelho de PSU controle incubado por 30 dias.....	73
Figura 35: Espectro de infravermelho de PSU controle incubado por 60 dias.....	74
Figura 36: Espectro de Infravermelho de PSU ST X E6.	75
Figura 37: Espectro de Infravermelho de PSU 30' X E6.....	77
Figura 38: Espectro de Infravermelho de PSU 120' X E6.	78

Figura 39: Espectro de íons positivos de PHB ST.	80
Figura 40: Espectro de íons negativos de PHB ST.	81
Figura 41: Espectro de íons positivos de PHB 60'..	82
Figura 42: Espectro de íons negativos de PHB 60'..	83
Figura 43: Espectro de íons positivos de PHB 180'..	84
Figura 44: Espectro de íons negativos de PHB 180'..	84
Figura 45: Fragmentos dos íons positivos para PHB.	85
Figura 46: Fragmentos dos íons negativos para PHB.....	86
Figura 47: Espectro de íons positivos de PHB ST..	87
Figura 48: Espectro de íons negativos de PHB ST..	88
Figura 49: Espectro de íons positivos de PHB ST..	90
Figura 50: Espectro de íons negativos de PHB 60'..	92
Figura 51: Espectro de íons positivos de PHB 180'..	93
Figura 52: Espectro de íons negativos de PHB 180'..	94
Figura 53: Imagem de Tof-Sims de PHB 60' X E6..	95
Figura 54: Aparência do polímero após 10 dias de cultivo.	97
Figura 55: Gel unidimensional mostrando bandas das proteínas de maior concentração nas amostras.....	97
Figura 56: Proteínas secretadas pela linhagem CG97.'.....	98
Figura 57: Proteínas secretadas pela linhagem E6..	99

Lista de Tabelas

Tabela 1: Características das linhagens E6 e CG97 de <i>M. anisopliae</i>	31
Tabela 2: Preparação dos polímeros.....	34
Tabela 3: Gravimetria de PHB.....	55
Tabela 4: Gravimetria de PSU incubado com a linhagem E6.....	56
Tabela 5: Gravimetria de PU incubado com a linhagem CG97.....	57
Tabela 6: Valores de números de onda dos máximos de bandas e picos dos espectros de infravermelho de PHB padrão (cm ⁻¹).....	61
Tabela 7: Valores de números de onda dos máximos de bandas e picos dos espectros de infravermelho de PSU padrão (cm ⁻¹).....	62
Tabela 8: Valores de números de onda dos máximos de bandas e picos dos espectros de infravermelho de PU padrão (cm ⁻¹).....	63
Tabela 9: Valores de números de onda dos máximos de bandas e picos dos Espectros de infravermelho de PHB ST X E6 (cm ⁻¹).....	66
Tabela 10: Valores de números de onda dos máximos de bandas e picos dos espectros de infravermelho PHB 60' X E6 (cm ⁻¹).....	69
Tabela 11: Valores de números de onda dos máximos de bandas e picos dos Espectros de Infravermelho PHB 180' X E6 (cm ⁻¹).....	70
Tabela 12: Valores de números de onda dos máximos de bandas e picos dos espectros de infravermelho de PSU ST x E6 (cm ⁻¹).....	74
Tabela 13: Valores de números de onda dos máximos de bandas e picos dos Espectros de Infravermelho PSU 30' X E6 (cm ⁻¹).....	75
Tabela 14: Valores de números de onda dos máximos de bandas e picos dos Espectros de Infravermelho PSU 120' X E6 (cm ⁻¹).....	77

Lista de abreviaturas e símbolos

μg	Microgramas
μL	Microlitro
μm	Micrometro
120'	120 minutos
180'	180 minutos
1-D	Eletroforese Unidimensional
30'	30 minutos
60'	60 minutos
CH_4	Metano
CHCl_3	Clorofórmio
cm	Centímetro
cm^2	Centímetros quadrados
cm^3s^{-1}	Centímetros cúbicos por segundo
CO_2	Gás Carbônico
CuSO_4	Sulfato de cobre
Da	Daltons
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Sal dissódico do ácido etilenodiaminotetraacético
EUA	Estados Unidos da América
eV	Elétron volts
FeSO_4	Sulfato de ferro
FTIR-ATR	Espectroscopia em Infravermelho por Transformada de Fourier com método de refletância total atenuada
h	Hora
H_2	Hidrogênio
H_2O	Água
HCl	Ácido clorídrico
HMW	<i>High Molecular Weight</i>
KCl	Cloreto de potássio
keV	Quilo elétron volts
KH_2PO_4	Fosfato de potássio monobásico
kV	Quilovolts
LMW	<i>Low Molecular Weight</i>
M	Molar
m/v	Massa por volume
MCC	Meio Cove completo

MCM	Meio Cove mínimo
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
mg	Miligrama
MgSO ₄	Sulfato de magnésio
MgSO ₄ .7H ₂ O	Sulfato de magnésio heptahidratado
min.	Minuto
mL	Mililitro
mM	Milimolar
MO	Microscopia óptica
mol L ⁻¹	Mol por litro
Mton	Mil toneladas
N ₂	Nitrogênio
Na ₂ B ₄ O ₇	Tetraborato de sódio
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
Ng	Nanograma
nm	Nanômetro
O ₂	Oxigênio
PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida
PC	Policarbonato
pH	Potencial hidrogeniônico
PHA	Polihidroxialcanoato
PHB	Polihidroxibutirato
PLA	Poli (ácido láctico)
PMSF	Fenilmetilsulfonilflúor
PP	Polipropileno
PS	Poliestireno
PSU	Polissulfona
PU	Poliuretano
PVC	Policloreto de vinila
SABIA	<i>System for Automated Bacterial Integrated Annotation</i>
SDS	Dodecilsulfato de sódio
ST	Sem tratamento
TEMED	Tetramethylethylenediamine
THF	Tetrahidrofurano
ToF-SIMS	Espectrometria de massas por íons secundários por tempo de voo
TPCK	Tosil fenilalanil clorometil cetona
Tris	2-amino-2-hidroximetil propano- 1,3 diol
UV	Ultravioleta
V	Volts
v/v	Volume por volume

W

xg

ZnSO₄

Watts

Força G

Sulfato de zinco

Resumo

Os polímeros têm sido um problema em nível mundial, porque eles se acumulam no ambiente e se tornam fonte de contaminação. Entre as possíveis soluções sugeridas está a biodegradação combinada ao tratamento de superfície por radiação UV. Este tratamento consiste na inserção de grupos funcionais na superfície do polímero. Trata-se de uma alternativa que mantém as propriedades físicas e mecânicas destes materiais e, ao mesmo tempo, aumenta a hidrofiliabilidade facilitando o processo de biodegradação. Este trabalho avalia a influência dos tratamentos para três diferentes polímeros. Os filmes foram irradiados com UV na presença de atmosfera de O₂ alternando-se os tempos de tratamento. O objetivo deste trabalho foi avaliar a degradação dos polímeros (não tratados e tratados) pela ação de duas linhagens do fungo filamentosso *Metarhizium anisopliae* (E6 e CG97). Os polímeros utilizados foram polissulfona (PSU) , poliuretana (PU) e polihidroxibutirato (PHB). PSU e PU foram incubados em presença de duas linhagens de *M. anisopliae* por 30 e 60 dias, enquanto que PHB (polímero biodegradável) foi incubado por 10 a 20 dias. *M. anisopliae* foi capaz de se desenvolver em PSU e PHB , mas não germinou em PU. A análise gravimétrica indica que PHB tratado por 180 min. incubado com E6 durante 20 dias, apresentou perda de massa de 28,76% . PSU tratado por 120 min. incubado com E6 por 60 dias teve 6,29 % de perda de massa , enquanto PU sem tratamento incubado com CG97 por 60 dias teve 0,47 % de perda, mostrando a menor porcentagem de perda de massa. Quando analisados por FTIR -ATR, todos os polímeros tiveram um comportamento semelhante, onde as bandas com maiores mudanças foram 3600-3100 e 1736 cm⁻¹ com uma indicação de hidrólise pelo aparecimento da banda de 1640 cm⁻¹. Outra banda que também mostrou mudanças foi na região de 1525 cm⁻¹. Esta banda refere-se a compostos nitrogenados, indicando possíveis subprodutos da degradação. A estrutura molecular do PHB foi avaliada por Tof-Sims e várias alterações foram observadas nos espectros de fragmentação, particularmente no pico de 69 m / z, que é típico para o PHB e a sua intensidade foi fortemente reduzida. Durante a análise de proteínas secretadas por *M. anisopliae* foi possível identificar duas proteínas, uma peroxidase/catalase e aldeído desidrogenase, que eventualmente estão envolvidas no processo de degradação. Em geral, foi possível confirmar que *M. anisopliae* é capaz de degradar polímeros.

Abstract

Polymers have been a problem worldwide, because they accumulate in the environment and become a source of contamination. Among the possible solutions suggested, the biodegradation combined with surface treatment by UV radiation is assumed to be an important strategy. This treatment consists in the insertion of functional groups on the polymer surface. It is an alternative that maintains the physical and mechanical properties of these materials and at the same time, increases the hydrophilicity, which would facilitate the biodegradation process. This study evaluates the influence of the treatments for three different polymers. The films were irradiated with UV in the presence of O₂ atmosphere alternating treatment times. The objective of this study was to evaluate the degradation of polymers (untreated and treated) by the action of two strains of filamentous fungus *Metarhizium anisopliae* (E6 and CG9). The polymers used were polysulfone (PSU), polyurethane (PU) and polyhydroxybutyrate (PHB). PSU and PU were incubated in the presence of two strains of *M. anisopliae* for 30 and 60 days, while PHB (biodegradable polymer) was incubated for 10 to 20 days. *M. anisopliae* was able to grow in PSU and PHB but not germinated PU. The gravimetric analysis indicates that PHB treated for 180 min. incubated with E6 for 20 days showed weight loss of 28.76%. PSU treated for 120 min. and incubated with E6 for 60 days presented 6.29% mass loss, while untreated PU incubated with CG97 for 60 days presented 0.47% loss, showing the lowest percentage of weight loss. When analyzed by ATR-FTIR, all polymers had a similar pattern, where the largest changes were in the bands 3600-3100 cm⁻¹ and 1736 with an indication of the onset of hydrolysis, 1640 cm⁻¹ band. Another band that also showed changes in the region was 1525 cm⁻¹. This band refers to nitrogenous compounds, indicating possible degradation by-products. The molecular structure of PHB was measured by TOF-Sims and various changes were observed in the fragmentation spectra, particularly in the peak 69 m/z which is typical for PHB and its intensity was strongly reduced. For the analysis of proteins secreted by *M. anisopliae* was possible to identify two proteins, a peroxidase / catalase and aldehyde dehydrogenase, which are possibly involved in the degradation process. In general, it was possible to confirm that *M. anisopliae* is capable of degrading the polymers.

Introdução

Com o exacerbado aumento na produção de plásticos aumenta também o acúmulo destes no ambiente, e isto se torna um problema uma vez que a maioria dos plásticos não é biodegradável e o sistema de reciclagem ainda é pouco eficiente. No ambiente entopem bueiros, sobrecarregam aterros sanitários e contaminam o solo, se acumulam no fundo de rios fazendo com que seja necessária a dragagem periódica, contaminam oceanos e acabam matando animais marinhos que ingerem ou que ficam presos em emaranhados destes materiais. As alternativas para este problema são: a descoberta de polímeros biodegradáveis com as características físicas e mecânicas exigidas pelas indústrias ou a modificação superficial de polímeros na tentativa de acelerar os processos de biodegradação.

Atualmente, também estão disponíveis no mercado polímeros com mistura de outros materiais. Algumas indústrias têm extrudado polímeros juntamente com poliésteres para aumentar a biodegradabilidade, porém este processo muitas vezes eleva o custo na produção destes materiais (Lucas *et al.*, 2008).

Neste trabalho foi abordada a modificação superficial como uma alternativa para acelerar o processo de biodegradação. Para realizar os testes de biodegradação foi utilizado o fungo filamentoso *Metarhizium anisopliae*, pois se trata de um fungo ambiental e está presente em diversos nichos, e, além disso, existem relatos na literatura de que fungos degradadores de plásticos são na maior parte ascomycetos dentre os quais está *M. anisopliae*. Este fungo também secreta uma ampla gama de enzimas, produz metabólitos secundários e desenvolve uma estrutura denominada apressório, que realiza uma pressão mecânica sobre as superfícies para facilitar a penetração das hifas (Geweely & Ouf 2011). Pela primeira vez *M. anisopliae* é testado como micro-organismo degradador de polímeros, já que até hoje, sua maior utilização é como pesticida ou acaricida.

2. Revisão bibliográfica

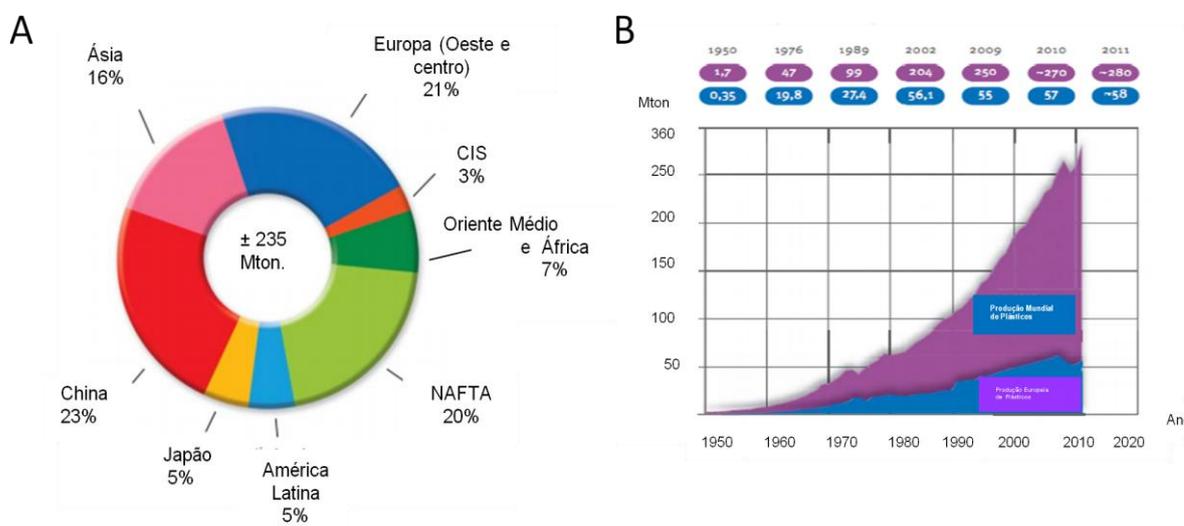
2.1 História dos polímeros industriais

Os primeiros polímeros surgiram por volta de 1835, quando Regnault relatou a produção de cloreto de vinila, monômero do PVC e em 1839 Charles Goodyear (EUA) descobriu a vulcanização, processo que consiste na adição de enxofre à borracha natural, tornando-a mais forte e resiliente. Neste mesmo ano foi descoberto o poliestireno, porém sem condições plenas para fabricação nesta época. Já em 1909 surge o primeiro polímero sintético o Baquelite, descoberto por Leo Baekeland, nos EUA. Este polímero veio para substituir materiais tradicionais como madeira, marfim e ebonite (Rosato, 1993; Rodriguez, 1996).

Nos primeiros 50 anos do Século XX houve uma grande expansão na produção e descoberta de polímeros, aproximadamente 15 novos polímeros surgiram neste período (Andrady & Neal 2009).

2.2 Produção e reciclagem de polímeros

A produção mundial de plásticos aumentou de 10 milhões de toneladas em 1950 para cerca de 280 milhões de toneladas em 2011, acompanhando o padrão de crescimento observado a partir daquele ano que segue a média anual de 9% (Fig. 1 A e B) (Manufacturers 2012).



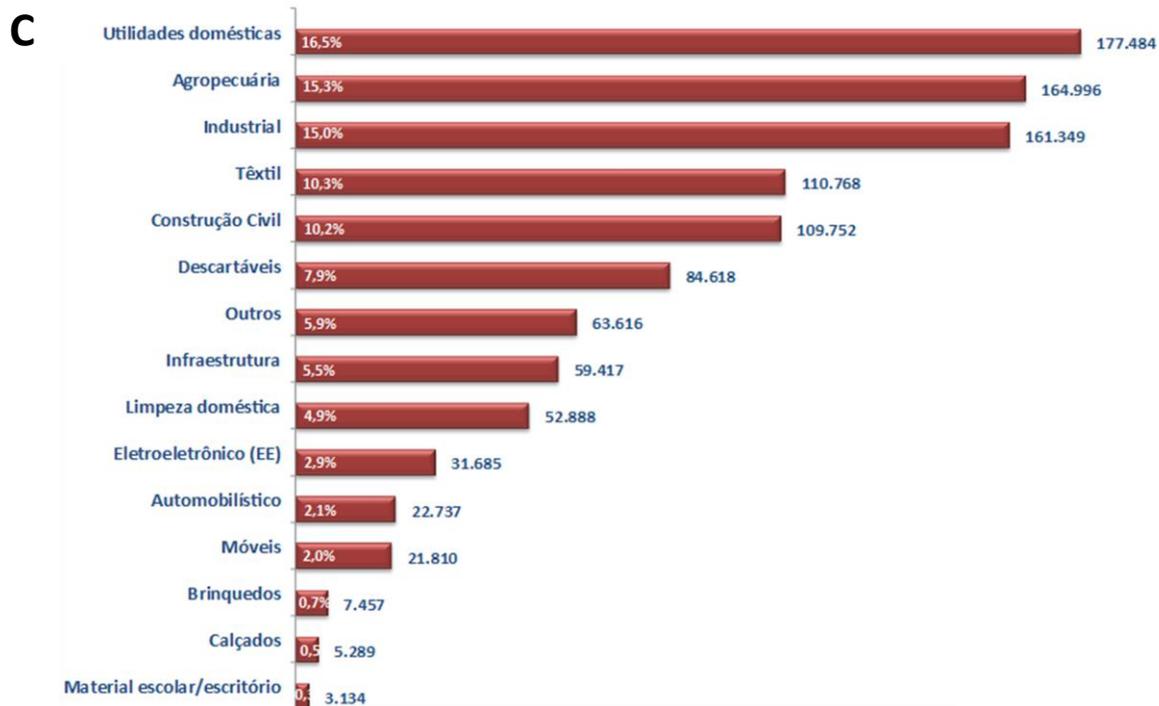


Figura 1: Produção e utilização de plásticos. A) Distribuição da produção mundial. B) Produção mundial de plásticos no período entre 1950 e 2011. C) Utilização de plásticos em toneladas no ano de 2011. Adaptado de (Manufacturers 2012 e Plásticos. 2012).

Paralelamente a este avanço na produção de plásticos surge o problema de destinação deste material, uma vez que as mesmas propriedades de durabilidade que fazem do plástico ideal para muitas aplicações (Fig. 1 C), como em embalagens, materiais e produtos de construção, bem como em produtos de higiene, pode levar a problemas de eliminação de resíduos, pois estes materiais não são facilmente biodegradáveis e devido à sua resistência à degradação microbiana, acumulam-se no meio ambiente (Vroman & Tighzert 2009).

Quando fala-se de polímeros biodegradáveis, suas propriedades de durabilidade são muito menores do que de polímeros de fontes não renováveis, porém se faz necessária uma infra-estrutura com ambiente bioativo para eliminação destes materiais, o que exige um grande investimento de capital. Sem esta estrutura que consiste de compostagem eficiente, instalação de bioconversão e produção de produtos intermediários que possam ser aproveitados, estes materiais acabarão

soterrados em aterros o que retardará o processo de biodegradação (Gross & Kalra 2002).

O sistema de descarte mais comum em países em desenvolvimento, como o Brasil, são os lixões ou aterros sanitários, onde estes dejetos ficam acumulados por anos. Em outras situações, estes plásticos podem cair em redes de esgoto podendo ocasionar inundações e grandes prejuízos à população (Unnikrishnan *et al.*, 2012).

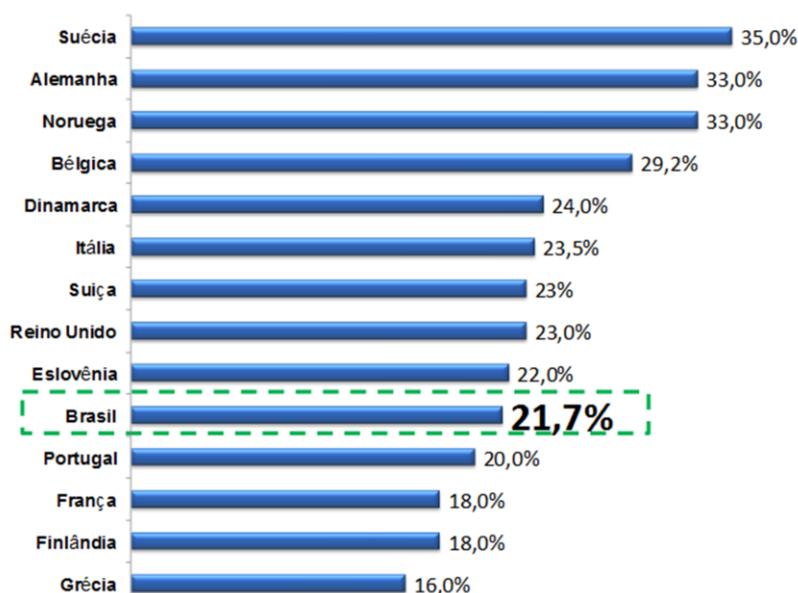


Figura 2: O Brasil no contexto mundial da reciclagem de plásticos em 2011. Adaptado de (Plásticos. 2012).

Ao longo dos anos vem se tentando criar um sistema eficiente de reciclagem destes materiais, porém ainda sem sucesso. Dados do Instituto Sócio-Ambiental de Plásticos mostram os valores de reciclagem em diversos países, e no Brasil em 2011 apenas 21,7% de todo o plástico produzido foi reciclado (Fig. 2), embora esse valor esteja aumentando ao longo dos anos (Fig. 3).

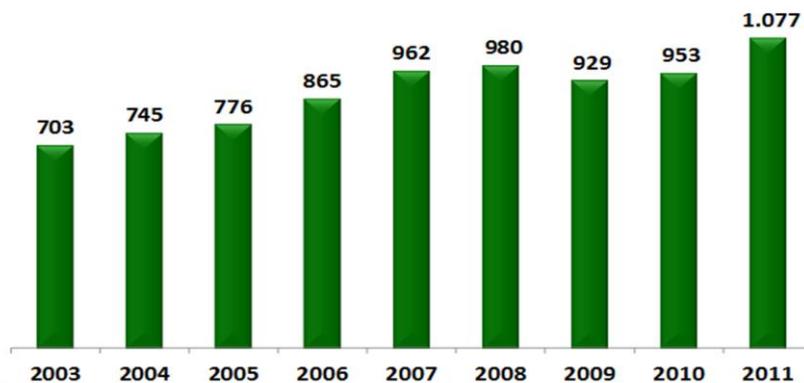


Figura 3: Quantidade de plástico reciclado (Mton) no Brasil. Adaptado de (Plásticos. 2012).

Para que haja um melhor funcionamento do sistema de coleta e reciclagem é necessária a participação dos cidadãos no momento da separação do lixo, dos governos locais no momento da coleta seletiva e de empresas privadas que investam na criação de cooperativas e sistemas de reciclagem (Unnikrishnan *et al.*, 2012).

2.3 Polímeros

Com a expansão na descoberta e produção de polímeros ocorrida na primeira metade do Século XX, temos hoje uma ampla gama de polímeros tais como: policarbonato (PC), poliuretana (PU), policloreto de vinila (PVC), poliestireno (PS), polipropileno (PP), polissulfona (PSU), polihidroxialconoatos (PHA), polihidroxibutiratos (PHB), quitosana, poli (ácido láctico) (PLA) entre outros. Os polímeros acima citados podem ser utilizados na área biomédica, na fabricação de cosméticos, garrafas, recipientes para filtros, componentes internos de aviões, esquadrias, chapas, revestimentos, molduras, filmes, estofamento de automóveis, portas sanfonadas, divisórias, persianas, tubos e conexões para água/esgoto, brinquedos, carcaças para eletrodomésticos, lanternas, espumas e embalagens em geral (Kumar, 2000; Bonartsev, 2007; Jamshidian *et al.*, 2010; Unnikrishnan *et al.*, 2012; Song & Kim 2013).

2.3.1 Polihidroxibutirato (PHB)

O PHB é um polímero natural do tipo poliéster (Fig. 4) pertencente a família dos polihidroxicanoatos (PHAs) oriundo da superalimentação de bactérias por glicose ou outra fonte qualquer de carbono (Bonartsev 2007).

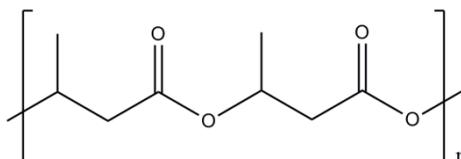


Figura 4: Estrutura molecular de PHB.

Devido ao excedente alimentar, e em algumas vezes condições de privação de nitrogênio, fósforo ou oxigênio, estes micro-organismos armazenam energia na forma de poliéster (Fig. 5) (Jacquel *et al.*, 2008). Como esse polímero é armazenado na célula é possível concluir que nem oligômeros, nem monômeros de PHB são tóxicos para células (Chen & Wu 2005).

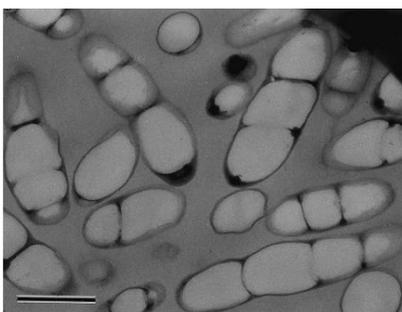


Figura 5: Armazenamento de PHB em bactérias. Micrografia Eletrônica de Transmissão de *R. eutropha* recombinante (PHB24). Células contém grandes quantidades (90% do peso celular seco) de P (3HB-CO-3HHx 5 mol%). Barra representa 0,5 μ m. Adaptado de (Sudesh *et al.*, 2000).

O PHB é um dos polímeros biodegradáveis mais importantes pois possui propriedades mecânicas satisfatórias sendo semelhantes as do polipropileno (PP) (Parra *et al.*, 2011).

A biodegradabilidade e biocompatibilidade são as principais características deste polímero (Bonartsev 2007).

Este polímero apresenta boa resistência a vapores de água, e pode ser armazenado por até quatro anos sob condições normais de armazenamento, porém quando depositado em ambientes ricos em micro-organismos sofre biodegradação transformando-se em dióxido de carbono (CO₂) e água. Nesta situação a degradação é comparativamente lenta em relação a outros polímeros biodegradáveis, provavelmente devido a baixa hidrofiliabilidade, por isso uma forma de acelerar esse processo seria aumentando a hidrofiliabilidade através da modificação de superfície pela inserção de grupos oxigenados (Kessler 2010 e Parra *et al.*, 2011).

2.3.2 Polissulfona (PSU)

PSU é um poliéter (Fig. 6) semitransparente, completamente amorfo, com excelentes propriedades elétricas, ópticas, térmicas e mecânicas. É resistente a agentes oxidantes e a amplas faixas de temperatura, por isso muito utilizado em aplicações médicas que exigem autoclave e esterilização a vapor. Também é utilizado como um componente na fabricação de membranas de ultrafiltração e membranas de separação de gás. Frequentemente é utilizado como material de substituição a materiais superiores como policarbonatos por seu menor custo (Kessler 2010; Unnikrishnan *et al.*, 2012; Gaur *et al.* 2013; Song & Kim 2013).

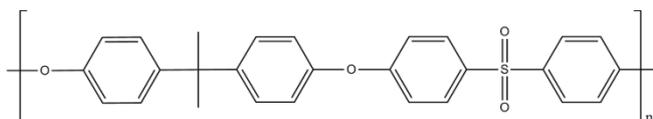


Figura 6: Estrutura molecular de PSU.

2.3.3 Poliuretana (PU)

PU foi descoberto por Otto Bayer, em 1937, derivado de uma reação de condensação de poli-isocianatos e polióis, contendo uma ligação uretana intramolecular (Fig. 7) (Howard 2002).

Dependendo da estrutura química dos poli-isocianatos e polióis utilizados na sua síntese, o PU pode se apresentar com diferentes propriedades físicas e químicas, podendo ser descrito como poliéster ou poliéter.

Poliuretanas do tipo poliéster são facilmente degradados enquanto poliéteres são relativamente resistentes a ataques microbianos (Nakajima-Kambe *et al.*, 1999).

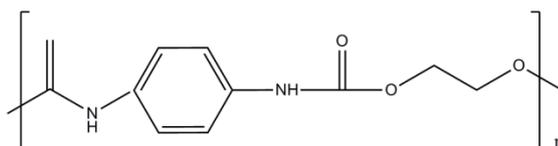


Figura 7: Estrutura molecular de PU.

PU tem sido utilizado desde a década de 1940 e hoje é amplamente usado como um material de base em várias indústrias (Nakajima-Kambe *et al.*, 1999). Desempenha um papel importante em vários campos de aplicações, tais como optoeletrônica, biotecnologia, medicina, automobilística, industrial e muitos outros. PUs são encontrados em produtos como: móveis, revestimentos, adesivos, materiais de construção, fibras, tintas, preenchimentos e couros sintéticos, mas entre esses o de maior destaque são as espumas que correspondem a 3% do total de plástico produzido. Estas espumas são utilizadas principalmente em isolamentos térmicos e estruturais (Nakajima-Kambe *et al.*, 1999; Howard 2002; Blagojević *et al.*, 2013).

As vantagens do PU são maior resistência à tração e alto ponto de fusão, resistência à degradação por água, óleos e solventes, o que os torna excelentes para substituição de outros plásticos. Exibem excelente aderência a muitas substâncias, resistência a abrasão e às intempéries para fins industriais (Howard 2002).

2.4 Modificação superficial

Por volta de 1980 começou-se a falar sobre polímeros biodegradáveis, o que seria uma alternativa para diminuir a poluição ocasionada por estes materiais (Vroman & Tighzert 2009). Entretanto esses novos polímeros precisam oferecer as mesmas propriedades físicas e mecânicas para que possam substituir os plásticos já disponíveis no mercado. Outro fator que limita a utilização de polímeros

biodegradáveis é o custo de produção (Gross & Kalra 2002). Assim, existe uma urgência na descoberta de novos polímeros biodegradáveis ou de biopolímeros.

Enquanto estas descobertas não acontecem, uma alternativa seria a modificação superficial de polímeros que não altera a matriz, permitindo que este polímero permaneça com suas propriedades originais e facilite o processo de degradação por micro-organismos (Weibel *et al.*, 2009; Rajajeyaganthan *et al.*, 2011; Kessler *et al.*, 2013). Esta modificação consiste na inserção de grupos oxigenados (Fig. 8) sobre esta superfície para facilitar o crescimento de micro-organismos. A inserção destes grupos oxigenados também aumenta a hidrofiliicidade das superfícies dos polímeros, outro fator que auxilia no processo de desenvolvimento de micro-organismos (Janorkar *et al.*, 2006).

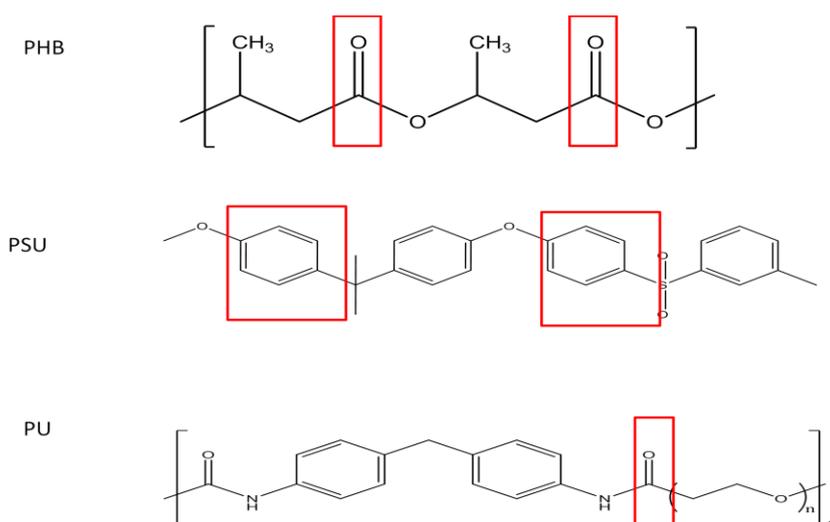


Figura 8: Sítios de inserção dos grupos oxigenados nas cadeias poliméricas.

2.5 Biodegradação

A biodegradação é uma alternativa para tentar reduzir a quantidade de plásticos que poluem o meio ambiente uma vez que alguns estudos mostram que poluentes atmosféricos são fontes de nutrientes para alguns micro-organismos (Lucas *et al.*, 2008). Esta pode acontecer em duas etapas: fragmentação do

polímero por meio de reações abióticas de oxidação (fotodegradação ou hidrólise) ou bióticas pela ação de micro-organismos, seguida pela bioassimilação dos fragmentos dos polímeros por micro-organismos (Vroman & Tighzert 2009 e Parra *et al.*, 2011).

A biodegradação de polímeros pode ocorrer de forma anaeróbia ou aeróbia. As vias de degradação e os grupos dominantes de micro-organismos que irão atuar neste processo muitas vezes são determinados pelas condições ambientais. Quando O_2 está disponível ocorre o processo aeróbio tendo como produto final biomassa, CO_2 e H_2O . Na ausência de O_2 ocorre o processo anaeróbio e tem-se como produto final biomassa, CO_2 , CH_4 e H_2O (Gu, 2003).

Processos aeróbios geram muito mais energia e suportam uma população muito maior de micro-organismos do que os processos anaeróbios, uma vez que O_2 é um acceptor de elétrons muito mais eficiente do que CO_2 (Gu, 2003). A biodegradação de plásticos acontece em 2 passos: depolimerização e mineralização. (Fig.9) (Grima *et al.*, 2000).

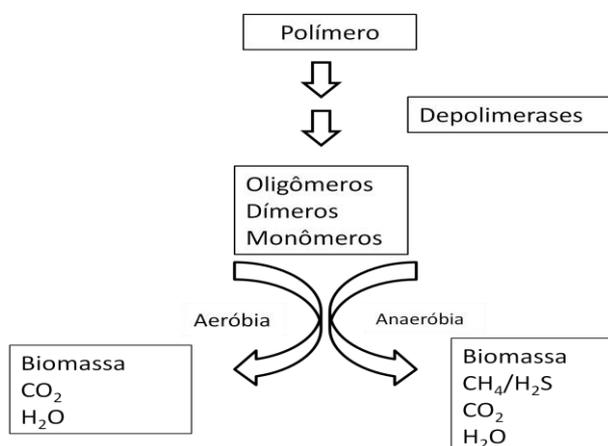


Figura 9: Diagrama esquemático da degradação de polímeros sob condições aeróbias e anaeróbias. Adaptado de (Gu, 2003).

O primeiro passo é a clivagem ou fragmentação da cadeia. Durante esta etapa o contato entre micro-organismos e polímero aumenta e ocorre a decomposição da macromolécula em cadeias menores. Este processo acontece fora do organismo devido ao tamanho da cadeia polimérica e da insolubilidade da maioria dos polímeros. Enzimas extracelulares, endo-enzimas (clivam a cadeia internamente) ou

exo-enzimas (clivam as extremidades da cadeia) são responsáveis por essa clivagem. Existe uma grande diversidade de enzimas que podem atuar clivando estas ligações, mas de forma geral são chamadas depolimerases. A atividade enzimática está intimamente relacionada com a estrutura conformacional que cria um sítio ativo específico para determinado substrato ou para uma série de substratos (Grima *et al.*, 2000).

O segundo passo corresponde a mineralização. Suficientemente fragmentados, os oligômeros já são suficientemente pequenos para serem transportados para dentro da célula e serem bioassimilados e mineralizados. A parte final da mineralização é a liberação de gases como CO₂, N₂, CH₄, H₂, além de água, sais, minerais e biomassa (Grima *et al.*, 2000).

A biodegradabilidade não depende apenas da origem do polímero mas também da sua estrutura química, massa molar, condições ambientais e cristalinidade, pois a degradação ocorre preferencialmente em regiões amorfas da superfície (Grima *et al.*, 2000; Vroman & Tighzert 2009; Parra *et al.*, 2011).

A biodegradação pode ser realizada por fungos, bactérias, algas e actinomicetos (Sutherland *et al.*, 1997; Gu, 2003; Stoica-Guzun *et al.*, 2011; Geweely & Ouf 2011; Russell *et al.*, 2011; Parra *et al.*, 2011). Entretanto, micro-organismos filamentosos apresentam vantagens em relação aos demais pois conseguem desenvolver micélio dentro dos materiais poliméricos. A ação deste penetrando na matriz aumenta o tamanho dos poros e provoca fissuras diminuindo a resistência e durabilidade do material (Lucas *et al.*, 2008).

2.6 *Metarhizium anisopliae*

Metarhizium anisopliae é um fungo filamentosos, pertencente ao filo *Ascomyceto* tendo sido identificado pela primeira vez em 1879 por Metschnikoff, na Rússia, como *Entomophora anisopliae*, isolado a partir de larvas de besouro-do-grão-do-trigo (Revankar *et al.*, 1999). O gênero *Metarhizium* é composto por fungos entomopatogênicos que infectam uma ampla gama de espécies. *M. anisopliae* geralmente exibe conidiação esverdeada (Fig. 10) sobre os cadáveres de seus hospedeiros, é frequentemente isolado de solos e encontrado nos trópicos e nas

regiões temperadas uma vez que a faixa ideal de temperatura para seu desenvolvimento é entre 15 e 32°C, porém a faixa ótima se restringe entre 24 e 30°C. Este micro-organismo também é tolerante a variações de pH. A faixa de tolerância está entre 2,0 e 8,5 (Leger *et. al.*, 1999; Driver *et al.*, 2000; Bischoff *et al.*, 2009).

M. anisopliae pode ser um micro-organismo potencial degradador de polímeros por possuir diversas características que podem auxiliar no processo degradativo como por exemplo: secretar uma diversa gama de enzimas lipolíticas e hidrolíticas (proteases, lipases, esterases e chitinases), também por produzir metabólitos secundários como ácido cítrico e oxálico e desenvolver uma estrutura denominada apressório (Leger *et.al.*, 1999).

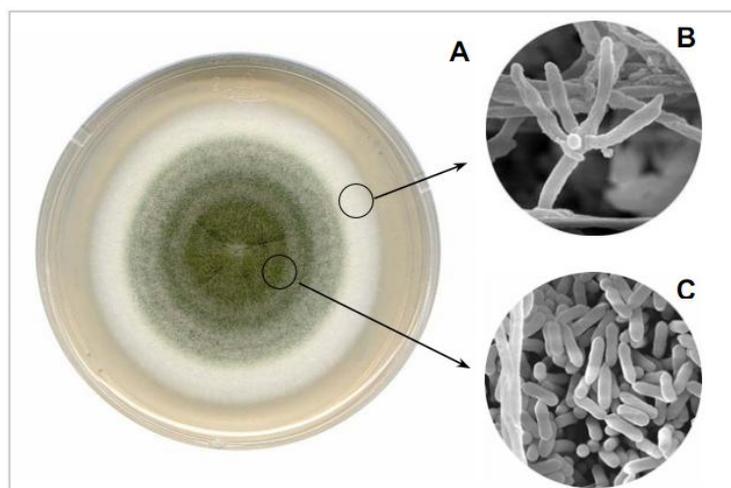


Figura 10: Detalhes morfológicos de *Metarhizium anisopliae*. A) Aspecto da colônia do isolado E6. B) Conidióforo. C) Conídio. Fonte: (Arruda *et al.*, 2005).

Este micro-organismo também possui uma grande plasticidade podendo infectar mais de 300 espécies de insetos (Lubeck *et al.*, 2008) sendo muito utilizado em estratégias de controle biológico, e estudos de interação patógeno-hospedeiro. Este fungo infecta seus hospedeiros por penetração direta nos exoesqueletos ou cutículas. O reconhecimento deste hospedeiro acontece quimicamente ou pela topografia do exoesqueleto (Santi *et al.*, 2010).

Após o reconhecimento do hospedeiro inicia-se a infecção (Fig. 11) :

- por adesão à cutícula por interações hidrofóbicas e de material mucilaginoso;
- germinação dos conídios e desenvolvimento;
- diferenciação do tubo germinativo em apressório;
- penetração da cutícula do hospedeiro;
- diferenciação das hifas em blastosporos;
- colonização do hospedeiro;
- extrusão para a superfície do cadáver do hospedeiro;
- formação de conidióforos e produção de conídios.

Esses passos podem ser simplificados resumidos como: adesão, germinação, diferenciação, penetração, colonização, extrusão, reprodução e dispersão (Schrank & Vainstein 2010).

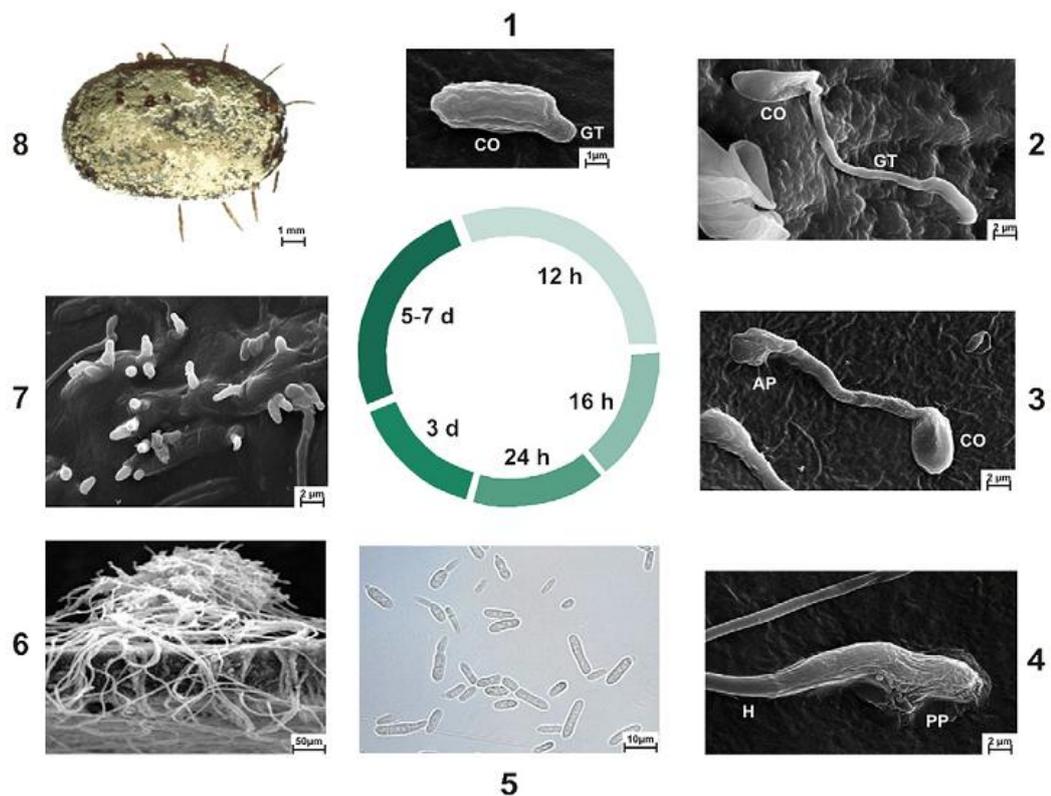


Figura 11: Estágios de infecção do hospedeiro por *M. anisopliae*. Os eventos do processo de infecção são retratados usando um carrapato como hospedeiro. (1) MEV de conídios: aderência à cutícula do hospedeiro, (2) MEV de germinação de esporos, (3) MEV da diferenciação do tubo germinativo em apressório, (4) MEV da penetração da cutícula, (5) microscopia ótica da diferenciação das hifas em blastosporos e corpos hifais; (6) MEV da colonização do hospedeiro; (7) MEV da extrusão para a superfície do cadáver do hospedeiro e (8) fotografia de conidióforos e

produção de conídios sobre o carrapato. CO: conídios; GT: tubo germinativo; AP: apressório, H: hifas, h: horas, d: dias, MEV: microscopia eletrônica de varredura. Adaptado (Schrank & Vainstein 2010).

Durante a infecção do hospedeiro existem diversas atividades enzimáticas relacionadas ao processo de penetração e são também descritos efeitos tóxicos e de patogenicidade. *M. anisopliae* secreta uma grande variedade de enzimas, tais como: proteases, chitinases, lipases, superóxido dismutase, trealase, entre outras (Santi *et al.*, 2010; Schrank & Vainstein 2010). Segundo Clarkson & Charnley (1996), estas enzimas devem ter uma ação sinérgica para conseguir atravessar a complexa cutícula dos insetos. Muitas dessas enzimas são secretadas pelo apressório, uma diferenciação na extremidade das hifas que ocorre por crescimento polarizado, dilatação do ápice da hifa e reforço da parede celular. Esta estrutura favorece a penetração pois logo após sua formação surge um grampo de penetração que via pressão mecânica e secreção enzimática ultrapassa a barreira física da cutícula (Arruda *et al.*, 2005).

M. anisopliae foi isolado em diversas partes do mundo, tais como: Ilhas do Sul do Pacífico, Carolina do Sul/EUA, Samoa Ocidental, Austrália, México, Brasil, entre outros (Schrank & Vainstein 2010). Cada isolado possui características próprias como temperatura para desenvolvimento e esporulação, tolerância a pH, desenvolvimento ou não de apressório e virulência.

Para este trabalho foram selecionadas duas linhagens E6 e CG97, ambas as linhagens são hipervirulentas em relação ao hospedeiro específico, secretam uma grande quantidade de enzimas possuindo características similares entre si (Fig. 12 e Tabela 1).

Tabela 1: Características das linhagens E6 e CG97 de *M. anisopliae*.

	E6	CG97
Hospedeiro	<i>Deois flavopicta</i>	Coleóptera
Região de isolamento	Espírito Santo	Brasília
Taxa de mortalidade em <i>B. microplus</i>	94%	90,4%
Temperatura de esporulação	24 °C a 28°C	24 °C a 28°C
pH	2 a 8,5	2 a 8,5

Adaptado de (Lubeck, 2008).

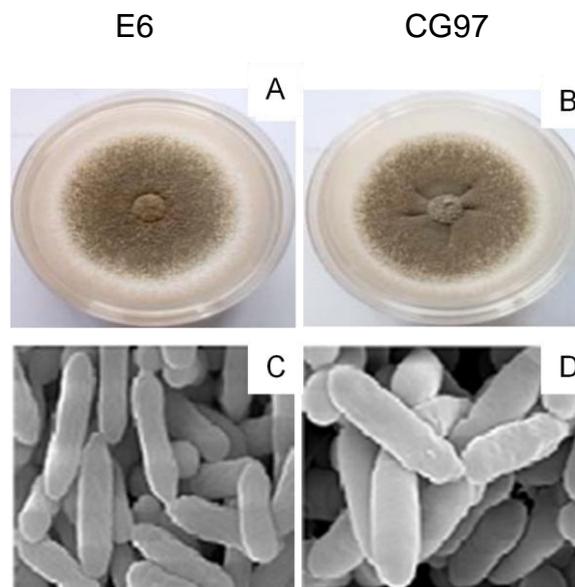


Figura 12: Morfologia das linhagens E6 e CG97 de *M. anisopliae*. A e B) Morfologia das colônias. C e D) Eletromicrografia de varredura dos conídios das linhagens. Adaptado de (Schrank & Vainstein, 2010).

Neste trabalho utilizaram-se análises físico-químicas de superfície e identificação de proteínas por espectrometria de massas para avaliar a capacidade de *M. anisopliae* de degradar polímeros.

3. Objetivos

3.1 Objetivo geral

Avaliar a atividade de duas diferentes linhagens de *Metarhizium anisopliae* na degradação de diferentes tipos de polímeros.

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar a atividade das linhagens (E6 e CG97) de *M. anisopliae* na degradação dos polímeros PHB, PSU e PU com ou sem inserção de grupos oxigenados.

- Realizar estudo diferencial por espectrometria de massas para identificação das proteínas expressas pelas linhagens de *M. anisopliae* durante a degradação dos polímeros em comparação ao controle.

4. Materiais e métodos

4.1 Linhagens utilizadas e manutenção

Nos experimentos foram utilizadas as linhagens CG97 e E6 do fungo filamentosso *Metarhizium anisopliae*. A linhagem E6 foi isolada de *Deios flavopicta* (Homoptera:Cercopídea), oriunda do Espírito Santo e a linhagem CG97 foi isolada de Coleópteros, oriunda de Brasília.

Para manutenção destas linhagens foi utilizado Meio Cove completo (MCc) (glicose 1%; nitrato de sódio 0,6%; peptona 0,2%; extrato de levedura 0,05%; triptona 0,15% e ágar 1,5%). Após autoclavagem foram adicionados 2% de solução de sais (KCl 2,6%; MgSO₄.7H₂O 2,6%; KH₂PO₄ 7,6% (m/v)) e 0,04% de solução de elementos traços (Na₂B₄O₇ 0,004%; CuSO₄ 0,04%; FeSO₄ 0,001%; MgSO₄ 0,08% e ZnSO₄ 0,08% (m/v)), previamente preparadas e autoclavadas separadamente. As culturas foram incubadas em estufa a 28°C por até sete dias e armazenadas a 4°C.

4.2 Suspensão de esporos de *M. anisopliae*

Para preparação da suspensão de esporos as duas linhagens foram repicadas a partir de colônias estoque do fungo e cultivadas em placas de Petri contendo MCc, por aproximadamente sete dias à 28°C.

Após incubação por sete dias, os esporos foram ressuspensos em solução estéril de Tween 80 0,01%, com auxílio de uma alça de Drigalski. A suspensão foi centrifugada por 5 min a 7000 x g, o sedimento de esporos foi lavado com água destilada estéril e novamente centrifugada nas mesmas condições. Após

centrifugação os esporos foram ressuspensos em 5mL de água estéril e contados em câmara de Neubauer.

4.3 Preparação dos polímeros

Foram utilizados três polímeros neste trabalho: poliuretano Ellastolan® (BASF®, PU 1185A10), polihidroxibutirato (Sigma Aldrich, UK) e polissulfona (Sigma Aldrich, USA), todos utilizados como recebidos.

Filmes poliméricos foram preparados por duas técnicas distintas: *spin-coating* e evaporação.

Pela técnica de *spin-coating* foram preparados filmes com aproximadamente 1µm de espessura. Estes foram utilizados para análise de crescimento do fungo e da degradação dos polímeros. Conforme cada tipo de material polimérico, quantidades variadas de gotas (0,1mL cada) (Tabela 2) foram depositadas sobre lamínulas de vidro de 1,5cm de diâmetro.

Os filmes preparados pela técnica de evaporação possuíam 50µm de espessura. Nesta técnica 50mL de solução específica para cada polímero foram depositados sobre placas de Petri (10cm de diâmetro) e deixadas evaporar a temperatura ambiente (20°C). Os filmes obtidos por essa técnica foram utilizados para análise de perda de massa (gravimetria) e determinação da concentração de proteínas secretadas.

Tabela 2: Preparação dos polímeros.

Polímero	Solvente (1 mol)	Concentração	Gotas (0,1mL)
PHB	Clorofórmio	$3 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$	10
PSU	Clorofórmio	$5 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$	5
PU	Tetraidrofurano (THF)	$1 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$	5

A modificação da superfície dos filmes foi realizada seguindo o procedimento descrito previamente (Kessler *et al.*, 2013). Resumidamente, um sistema fotoquímico composto por uma fonte de radiação UV de média pressão (400 W), com linhas majoritárias de radiação em 254 nm; um disco de amostra giratório com controle de atmosfera, com capacidade de 32 amostras e entrada de gás com fluxo regulável foi

empregado. Antes e após a irradiação UV, uma purga foi realizada (15 min) com O₂. Um fluxo constante de 5 cm³s⁻¹ de O₂ foi utilizado durante a irradiação que era tempo/dependente do tipo de polímero a ser tratado. Finalmente, após a fotólise, as amostras foram lavadas com 500 mL de água deionizada.

4.4 Condições de cultivo para testes de degradação de polímeros

Os testes foram realizados em placas de Petri de vidro, previamente fornadas a 180°C, contendo 35mL de Meio Cove mínimo (MCM) (glicose 1% (m/v); nitrato de sódio 0,6% (m/v) e ágar 1,5% (m/v)), ou água-ágar (ágar 1,5% (m/v)). Após esterilização dos meios em autoclave foram adicionadas solução de sais e solução de elementos traços conforme descrito no item 4.1.

Os polímeros a serem testados foram previamente lavados com etanol 70%. Após a secagem, estes polímeros foram depositados sobre o meio de cultura, sem adição de esporos para a situação controle e adição de 10⁷ esporos para teste de degradação. Estas placas foram incubadas em estufa a 28°C por 10 a 20 dias para PHB e por 30 e 60 dias para PSU e PU. Para os testes de gravimetria os polímeros foram previamente pesados. Após os períodos de incubação os polímeros foram retirados dos cultivos e lavados com etanol 70%, seguido por lavagens em água com auxílio de ultrassom.

4.5 Condições de cultivo para extração de proteínas

M. anisopliae foi cultivado em MCM líquido (500mL), preparado como descrito no item 4.1, sendo um cultivo com e outro sem a presença do polímero. O cultivo sem o polímero foi utilizado como controle. O inóculo foi de 10⁷ esporos no volume total de meio e a incubação foi de 10 dias com agitação de 150 rpm à temperatura de 28°C.

Após a incubação os cultivos foram filtrados em papel *Whatman* n^o 1 para obtenção dos micélios, que foram congelados (-80°C) e então liofilizados. As proteínas foram extraídas por maceração com auxílio de nitrogênio líquido.

Após a extração as amostras foram pesadas e em seguida adicionou-se o mesmo valor em μL de tampão de solubilização contendo inibidores de protease (50mM Tris-HCl (2-amino-2-hidroximetil propano- 1,3 diol – ácido clorídrico) pH 7,5; 1mM EDTA (Sal dissódico do ácido etilenodiaminotetraacético); 50mM TPCK (Tosil fenilalanil clorometil cetona); 1mM PMSF (Fenilmetilsulfonilflúor) e 5mM iodoacetamida). As amostras foram homogeneizadas em vórtex e centrifugadas a $15.557 \times g$ para a remoção do sobrenadante.

Metade do volume de tampão utilizado na primeira etapa foi adicionado ao *pellet* e o procedimento de centrifugação foi repetido, os sobrenadantes obtidos foram armazenados a -20°C .

A concentração de proteínas foi determinada pelo método de Bradford (Bradford 1976).

4.6 Eletroforese Unidimensional

Nas amostras proteicas adicionou-se tampão de amostra 1x (Tris-HCl 0,05M pH 6,8, β -mercaptoetanol 4%, SDS (Dodecilsulfato de sódio) 2%, glicerol 10% e traços de azul de bromofenol). Para a eletroforese foi utilizado o sistema "Mini-Protean II Electrophoresis Cell" (BioRad), seguindo as instruções do fabricante. O gel desnaturante seguiu a metodologia descrita por Laemmli (1970).

A solução de gel separador 12% continha: água destilada 10%/ Tris-HCl 0,375M pH 8,8/ SDS 0,1%/ acrilamida-bisacrilamida 30:1 (m/v) 12%/ persulfato de amônia 0,05% (m/v)/ TEMED (Tetramethylethylenediamine) 0,05% (v/v). A solução de gel concentrador 4% continha: água destilada 10%/ Tris-HCl 0,125M Ph 6,8/ SDS 0,1%/ acrilamida-bisacrilamida 30:1 (m/v) 4%/ persulfato de amônia 0,05% (m/v)/ TEMED 0,05%(v/v).

Após a polimerização, o sistema foi montado e a cuba foi preenchida com tampão de corrida 1x (Tris 0,3% (m/v)/ glicina 1,44% (m/v)/ SDS 0,1% (m/v)). As amostras preparadas de proteína como descrito no item 4.5 e contendo 300 μg foram fervidas durante 3 minutos e aplicadas no gel.

Após eletroforese a 100V, as proteínas foram coradas com azul de Coomassie coloidal (sulfato de amônia 10%/ metanol 20%/ azul de coomassie G250 0,05%/

ácido fosfórico 2%) (24h). Os padrões de massa molar utilizados foram: LMW *calibration* kit – GE (baixo peso molecular) e HMW *calibration* kit – GE (alto peso molecular).

As proteínas de interesse foram excisadas dos géis e armazenadas em microtubos à -20°C para posterior análise por espectrometria de massas.

4.7 Preparação de amostras para espectrometria de massas

Para a retirada do corante das bandas excisadas dos géis que foram armazenadas em microtubos e continham as proteínas de interesse adicionou-se 500µL de solução descorante (metanol 50% e ácido acético 5%). Após a incubação por 18h à temperatura ambiente a solução foi descartada, um novo volume (200µL) foi adicionado e a incubação procedeu por mais 2h. Em seguida a solução foi removida e 200µL de acetonitrila foram adicionados e deixados por 5 min. para desidratar os géis.

As proteínas foram reduzidas com 50µL de DTT (Ditiotreitol) 10mM por 30 min. e alquiladas com 50µL de iodoacetamida 50mM também por 30 minutos à temperatura ambiente e lavados com 100µL de bicarbonato de amônio 100mM por 10 min. Após esses tratamentos procedeu-se uma nova desidratação com 200µL de acetonitrila e reidratação com 100µL de bicarbonato de amônio 100mM por 10 min. Os procedimentos de desidratação e reidratação foram repetidos por duas vezes e as proteínas foram secas em SpeedVac por 3 min.

Após a secagem 30µL de solução de tripsina (20ng/ µL) foram adicionados e incubados por 10 min. em banho de gelo. O excesso de tripsina foi removido e adicionado 20µL de solução de bicarbonato de amônio 50mM procedida de uma incubação por 18h à 37°C.

No dia seguinte foram adicionados 30µL de solução de bicarbonato de amônio 100mM, agitados no Vortex e incubados por 10 min. O sobrenadante obtido após a centrifugação foi removido para um microtubo limpo. Esse procedimento foi repetido por 2 vezes e o sobrenadante total obtido foi seco em SpeedVac por aproximadamente 1h e armazenado a -80°C.

4.8 Análise por Espectrometria de Massas (MS)

Os *pellets* foram ressuspensos em 10µL de ácido fórmico 0,1% e submetidos a análise por espectrometria de massas utilizando a Unidade de Química de Proteínas e Espectrometria de Massas do Cbiot (www.uniprote-ms.ufrgs.br), utilizando o espectrômetro de massas Micro-Q-TOF (Micromassas), com sistema de *nanoAcquity* acoplado, ionização por *electrospray* (ESI), tempo-de-voo quadrupolo (Q-TOF), modo MS/MS.

4.9 Análise dos resultados

A avaliação do desenvolvimento do fungo sobre a matriz polimérica foi realizada por microscopia óptica (MO) em microscópio óptico Zeiss (modelo Axioskop 40) com magnificação de 40X, e por microscopia eletrônica de varredura (MEV) em microscópio eletrônico de varredura JEOL (JSM 6060) a 10 kV com magnificação de 5000X. Para esta análise as amostras foram previamente metalizadas com ouro.

4.9.1 Proteínas

Os espectros de MS foram processados e os arquivos gerados foram utilizados para realizar buscas em bancos de dados através do *software* MASCOT (*Matrix Science*: <http://www.matrixscience.com>). Os parâmetros utilizados para as análises foram: enzima tripsina (cliva nos aminoácidos Lisina ou Arginina); máximo uma clivagem perdida; carbamidometilação na cisteína como modificação fixa e como modificação variável oxidação da metionina. O número de tolerância de peptídeos $\pm 0,5$ Da e número da tolerância MS/MS $\pm 0,5$ Da.

Para identificação das proteínas foram utilizados dois bancos de dados: (1) o banco de dados local de proteínas de *M. anisopliae* (linhagem E6), gerado a partir da plataforma do SABIA (*System for Automated Bacterial Integrated Annotation*); e

(2) o banco de dados não-redundante do NCBI (*National Center for Biotechnology Information*; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/NCBI/>).

Após identificação os dados foram analisados através do *software* Venny (<http://bioinfoqpc.cnb.csic.es/tools/venny/venny.php>).

Para avaliar a degradação dos materiais poliméricos foram utilizadas as seguintes técnicas:

4.9.2 Gravimetria

A gravimetria consiste na análise da perda da massa ocasionada, nesta situação, pela ação do micro-organismo sobre o polímero. As amostras foram pesadas em Balança FQ112 (RADWAG220/C/2 - massa mínima 10mg com erro de 1mg) antes e após a incubação com fungo. Após a incubação as amostras foram lavadas, secas em dessecador e pesadas até que houvesse estabilidade na massa na terceira casa decimal da balança.

4.9.3 FTIR-ATR (Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier com método de refletância total atenuada)

FTIR-ATR é uma técnica espectroscópica de análise de superfície utilizada para identificar os grupos orgânicos de um composto ou amostra. Baseia-se na identificação do espectro de absorção da radiação infravermelha. As análises foram realizadas usando um instrumento modelo Alpha-P de Bruker com prisma de diamante, a 45 graus, e uma resolução espectral de 4 cm⁻¹. Para cada espectro foram realizadas 24 varreduras no intervalo de número de onda 4000 a 400 cm⁻¹.

4.9.4 ToF-SIMS (Espectrometria de massas por íons secundários por tempo de voo)

Espectrometria de massas por íons secundários por tempo-de-voo (*Time-of-Flight Secondary Ions Mass Spectrometry*) é uma técnica de espectrometria de

massas que utiliza um feixe de íons primários para gerar fragmentos ionizados na superfície de uma amostra sólida, para então analisar estes fragmentos pela sua relação massa carga (m/z). Todas as análises foram feitas utilizando um sistema descrito como "BIOTOF" (Braun *et al.*, 1998). Este sistema é equipado com um canhão de íons primários de C60+. Todas as amostras foram adquiridas tanto no modo positivo quanto no modo negativo, utilizando como energia de feixe primário 20 keV. Para evitar o carregamento da superfície das amostras, foi utilizado um canhão de elétrons de 15eV de energia no modo pulsado. Em todos os casos o número de íons primários foi mantido abaixo de 1×10^{12} íons /cm² e a dose de elétrons foi em um nível abaixo de qualquer dano significativo.

5. Resultados e Discussão

5.1 Desenvolvimento do fungo na presença de polímeros

Para avaliar a capacidade de *M. anisopliae* de se desenvolver na presença de polímeros, dois meios de cultura foram testados: MCM (descrito no item 4.1) (Fig.13 A) e Água-ágar (Fig.13 B). Os esporos foram depositados sobre o polímero (indicado pela flecha) e os cultivos foram incubados em estufa a 28°C por tempos que variavam de acordo com o polímero a ser degradado. O teste foi realizado utilizando o polímero PSU, sendo possível observar a capacidade do fungo em se desenvolver na presença deste material (Fig. 13). Resultados similares foram observados para os demais polímeros testados.

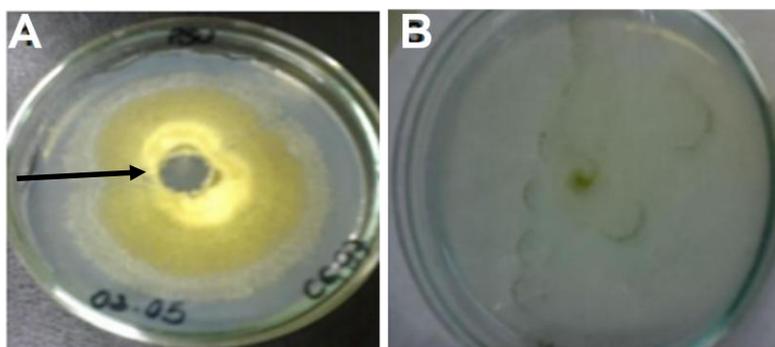


Figura 13: Desenvolvimento de *M. anisopliae*. A) MCM B) Água-ágar. PSU X CG97.

5.2 Semelhanças de desenvolvimento entre as linhagens

Neste trabalho foram utilizadas duas linhagens de *M. anisopliae*. Ambas com características similares quanto à tolerância a pH, variação de temperatura e virulência (Lubeck *et al.*, 2008). Seu desenvolvimento sobre a matriz polimérica em diferentes meios foi avaliada (Fig.14).

Ambas as linhagens mostraram desenvolvimento similar nos diferentes meios e tempos de cultivo.

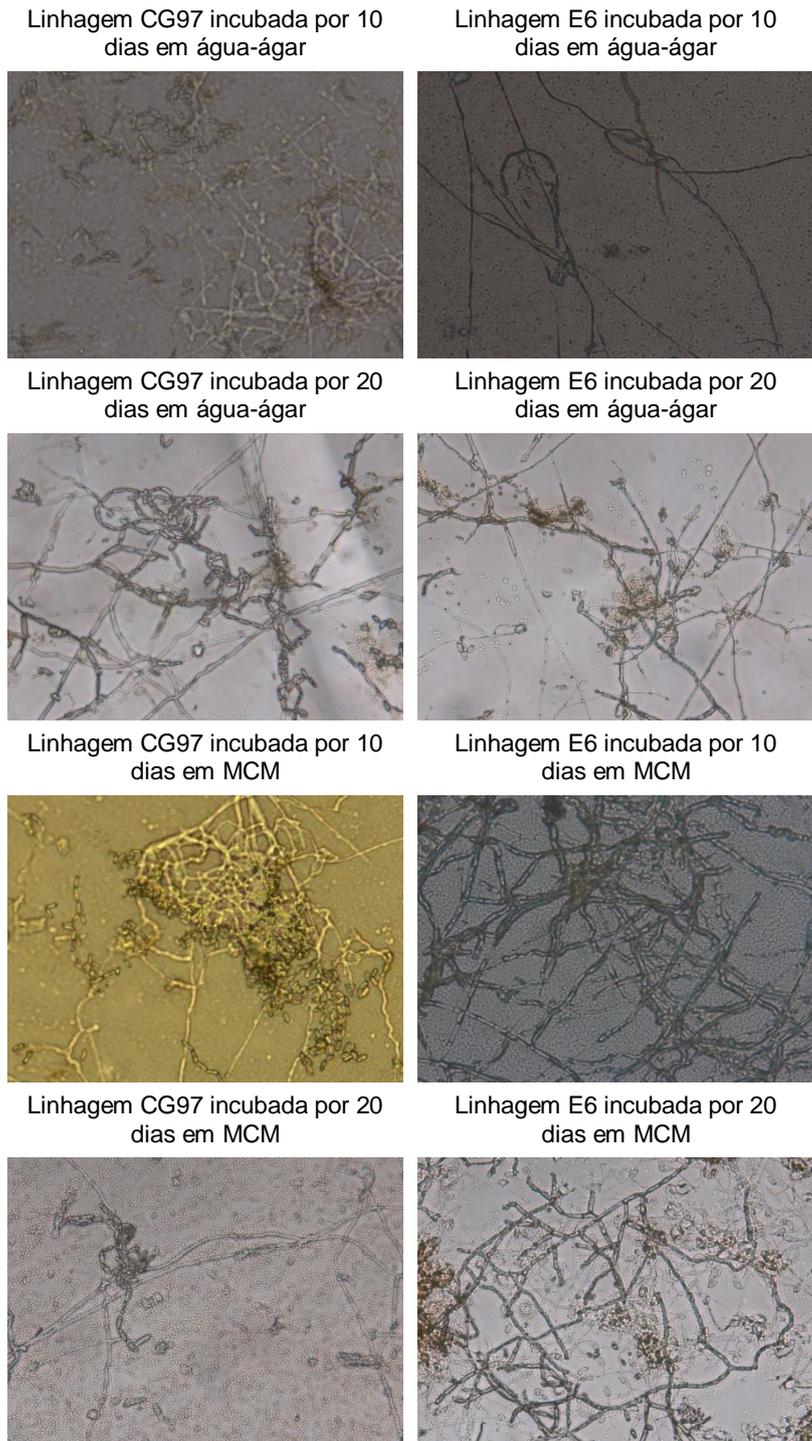


Figura 14: Microscopia ótica mostrando desenvolvimento similar nas duas linhagens (E6 e CG97) de *M. anisopliae*. MO 40X.

5.3 Lavagem dos polímeros

Para realizar as análises físico-químicas da superfície foi necessária a remoção do material biológico da superfície do polímero. Os polímeros foram removidos das placas de cultivos, lavados com etanol 70%, seguido por lavagens em água com auxílio de ultrassom por 20 minutos. O resultado pode ser observado na Fig. 15.

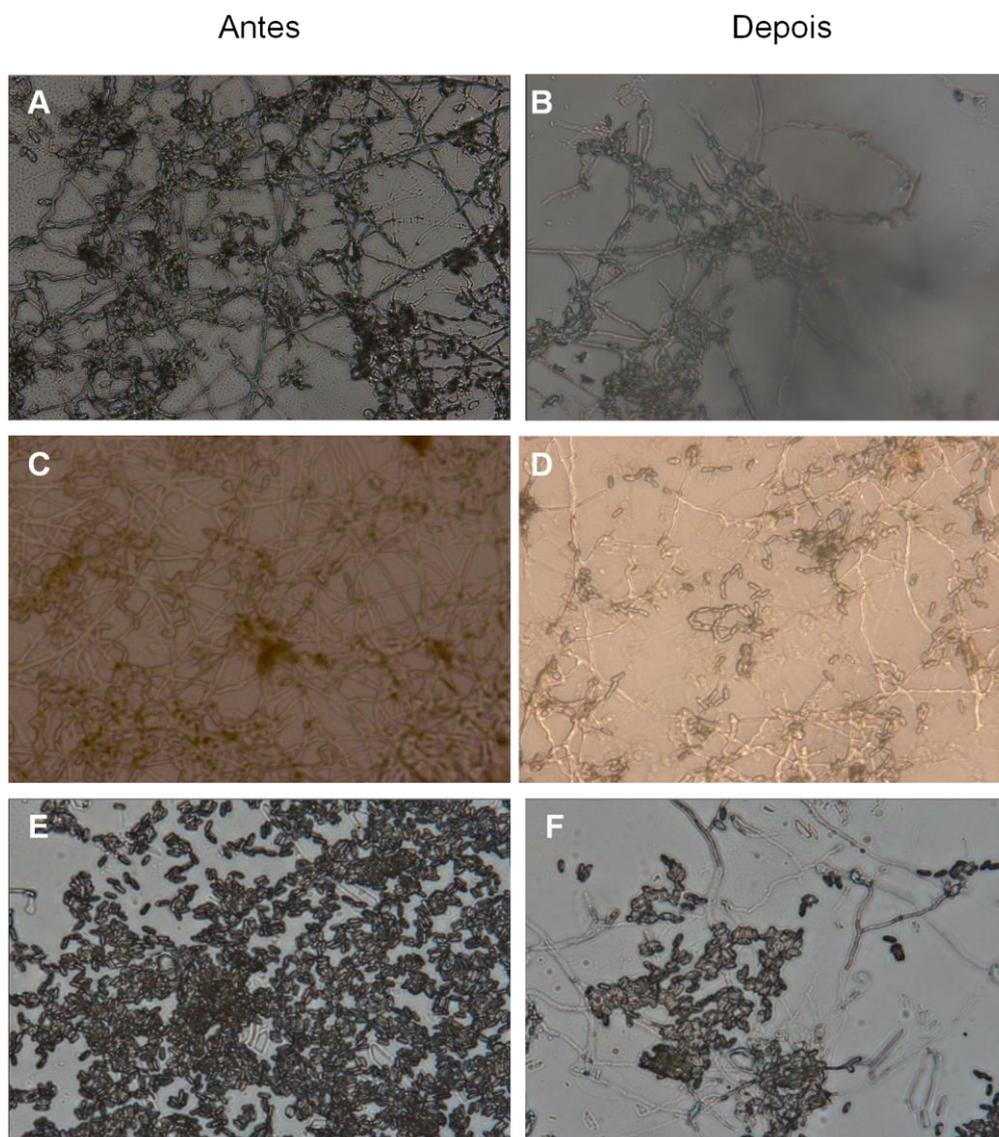


Figura 15: Lavagem dos polímeros com auxílio de ultrassom. A e B) PSU. C e D) PHB. E e F) PU. Coluna da direita mostra polímeros antes da lavagem. Coluna da esquerda após a lavagem. MO 40X.

Observa-se que mesmo após os 20 min. de lavagem o fungo não foi totalmente removido da superfície dos polímeros, restando esporos inteiros e fragmentos de hifas. O tempo de lavagem não pode ser excedido, pois os polímeros mostravam danos na superfície que comprometeriam sua análise.

Vários trabalhos tem demonstrado que fungos filamentosos são capazes de degradar polímeros, entre os gêneros descritos estão *Phanerochaete*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium* e *Pestalotiopsis*. Nestes trabalhos os fungos foram utilizados ou como único fungo degradador ou em consórcio, havendo também variações nas condições de temperatura, umidade e meio onde esta degradação foi testada (Sutherland *et al.*, 1997; Geweely & Ouf 2011; Russell *et al.*, 2011; Stoica-Guzun *et al.*, 2011).

Para avaliar a capacidade de *M. anisopliae* de degradar polímeros, cultivos em meio sólido foram mantidos em incubação por tempos variados (dependentes do polímero), à temperatura de 28°C. Após a incubação, o desenvolvimento deste micro-organismo foi avaliado por Microscopia ótica (MO) e Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV). Os polímeros controle também foram visualizados.

Neste trabalho os polímeros utilizados possuíam ou não tratamento. Os polímeros tratados tiveram sua superfície modificada pela inserção de grupos oxigenados, o que torna sua superfície mais hidrofílica, podendo assim facilitar o crescimento fúngico e aumentar a degradação. Esses tratamentos foram realizados em dois tempos, os quais são indicados em minutos, no numeral após o nome do polímero. Sendo assim têm-se os seguintes polímeros: Polihidroxibutirato - PHB ST (sem tratamento), PHB 60', PHB 180', Polissulfona - PSU ST, PSU 30', PSU 120', Poliuretana - PU ST, PU 30' e PU 120'. Para o polímero PHB o tempo de tratamento necessita ser maior devido à tendência de crosslinking característica destas moléculas. Com este aumento no tempo de tratamento acontece o enxerto dos átomos de oxigênio e não o crosslinking.

5.4 PHB

PHB é um polímero biodegradável, que não exibe propriedades fungicidas, nem resistência a danos por fungos e serve como um substrato para crescimento de micro-organismo (Bonartsev, 2007). Devido aos fatores citados anteriormente o tempo necessário para sua degradação é menor do que polímeros advindos do petróleo. Polímeros controle são mostrados na Figura 16.

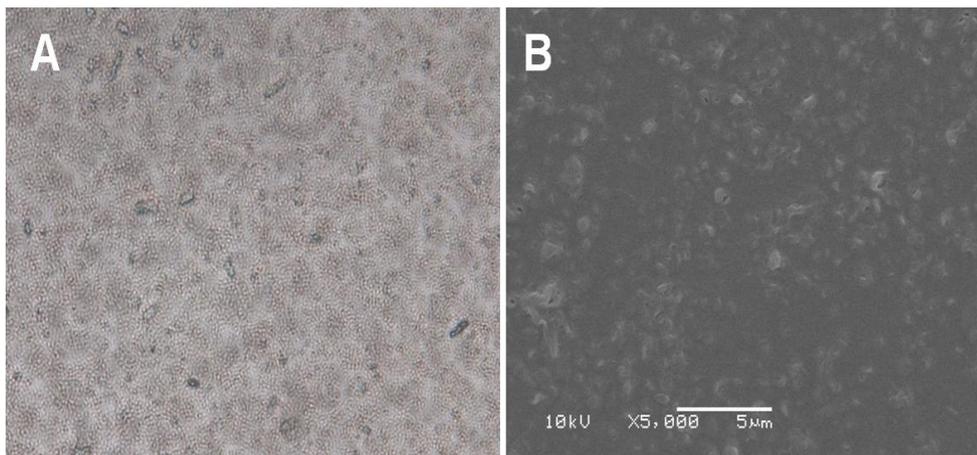


Figura 16: Microscopia de PHB ST controle. A) Microscopia ótica (MO) – 40X. B) Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) – 5.000X. Incubação de 10 dias.

Em diferentes tempos de cultivo no mesmo meio de cultura (água-ágar) pode-se observar que não houve aumento significativo no desenvolvimento fúngico para a linhagem CG97 (Fig.17).

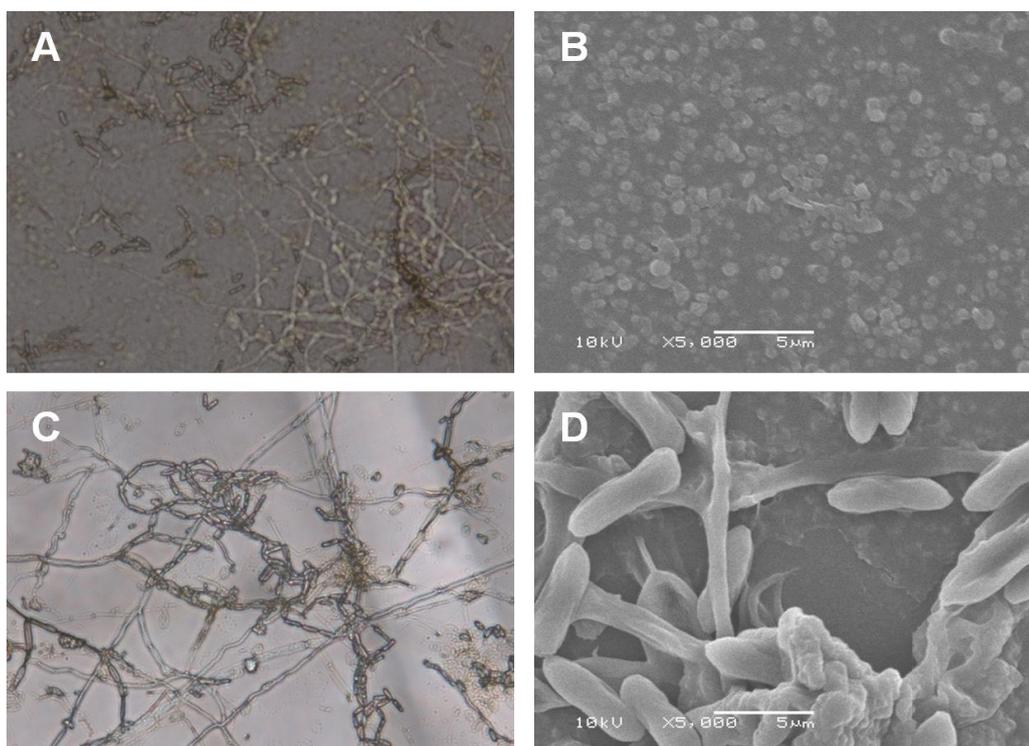


Figura 17: Microscopia do crescimento da linhagem CG97 sobre PHB ST. A e B) PHB incubado por 10 dias em água. C e D) PHB incubado por 20 dias em água. A e C) MO – 40X. B e D) MEV – 5.000X.

Quando se observa o polímero mostrado no quadro B da Figura 16, houve um aparente aumento na granulação da superfície se comparado ao controle (Fig. 15 B), o que pode ter sido ocasionado pela presença do fungo. O experimento descrito acima também foi realizado em MCM (Fig.18).

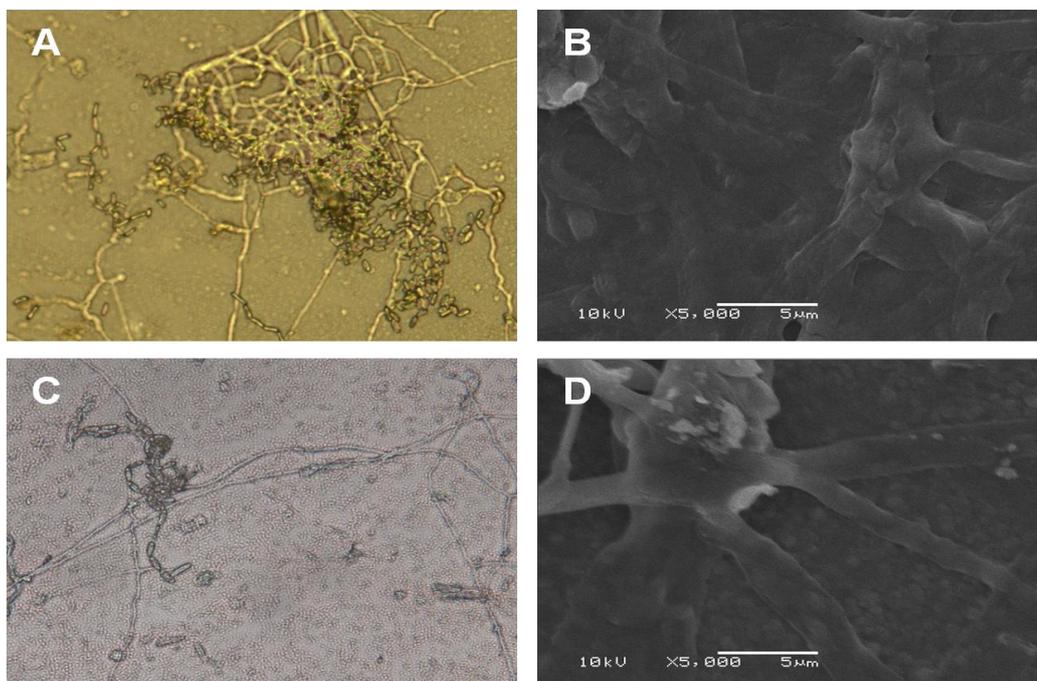


Figura 18: Microscopia do crescimento da linhagem CG97 sobre PHB ST. A e B) PHB incubado por 10 dias em MCM. C e D) PHB incubado por 20 dias em MCM. A e C) MO – 40X. B e D) MEV – 5.000X.

Os testes realizados em MCM mostram que houve uma maior germinação dos esporos (B e D) quando comparado com o teste realizado em água (Fig.17 D). Este aumento na germinação deve ter sido ocasionado pela presença de glicose no meio, uma fonte mais simples de carbono e de mais fácil assimilação. Com a presença da glicose, o fungo germina e depois, então, se adapta às fontes de carbono mais complexas contidas no polímero.

5.5 PSU

PSU trata-se de um polímero produzido através de fontes não renováveis, por isso o período de incubação é maior do que PHB. Porém, é preciso ressaltar que

PSU possui característica de polímero amorfo, o que pode facilitar a degradação. A linhagem E6 foi testada na tentativa de degradar este polímero (Fig.19). Controles também foram avaliados (Fig.19).

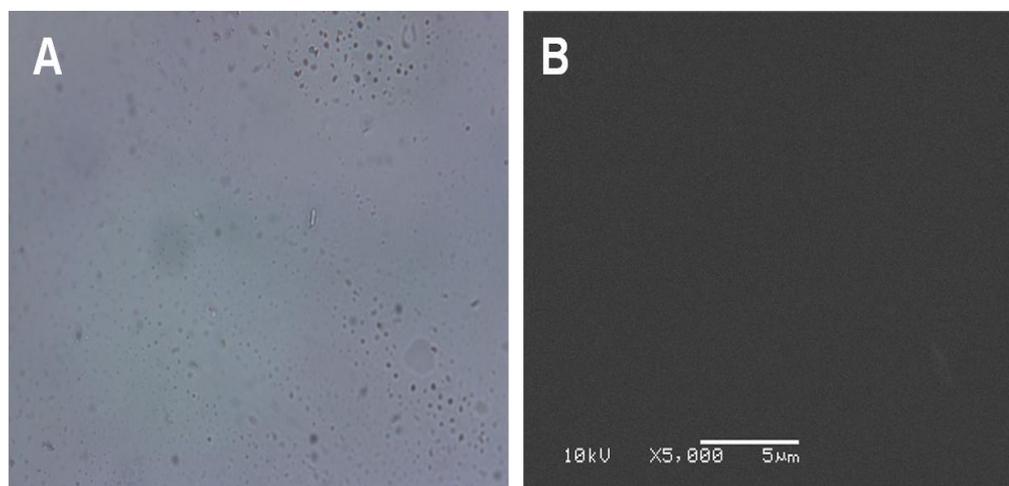


Figura 19: Microscopia de PSU ST controle. A) MO – 40X. B) MEV – 5.000X. Incubação de 30 dias.

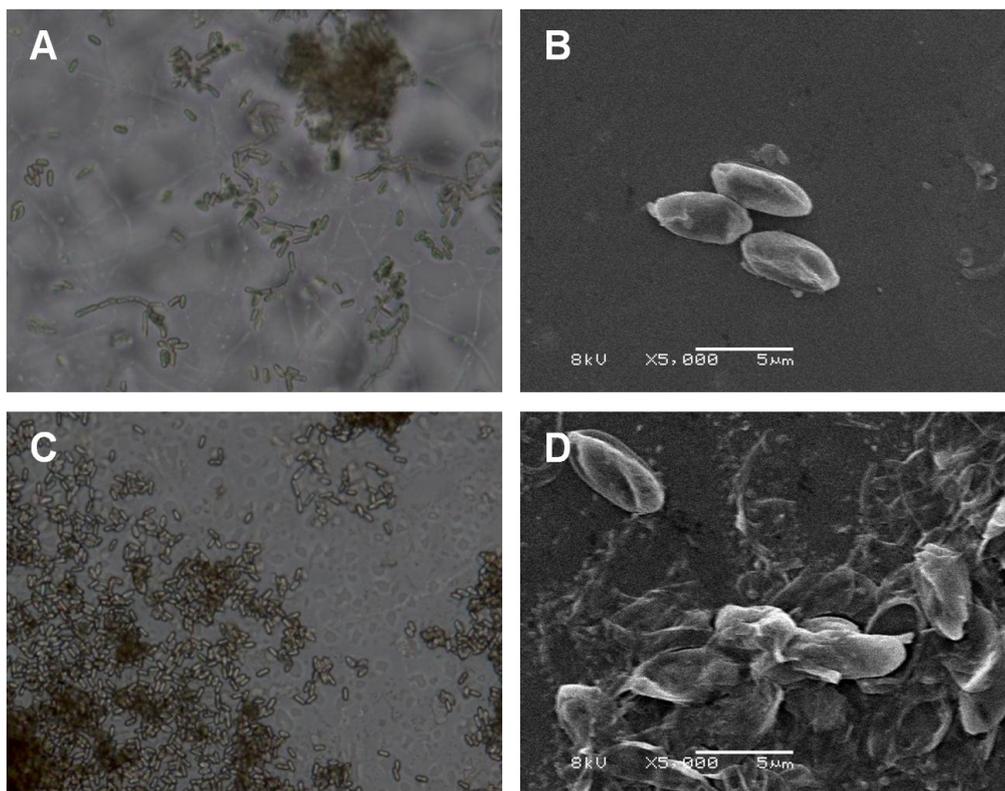


Figura 20: Microscopia de PSU ST X E6. A e B) PSU ST incubada em água por 30 dias. C e D) PSU ST incubada em MCM por 30 dias. A e C) MO – 40X. B e D) MEV – 5.000X.

Na Fig.20A pode-se observar a presença de pouquíssimas hifas que não foram visualizadas por MEV (Fig. 20B), já em C, experimento realizado em MCM, não se observa a formação de hifas. Entretanto, quando visualizada por MEV esta superfície apresenta uma massa densa, o que pode demonstrar a presença de mucilagem (Fig. 20D).

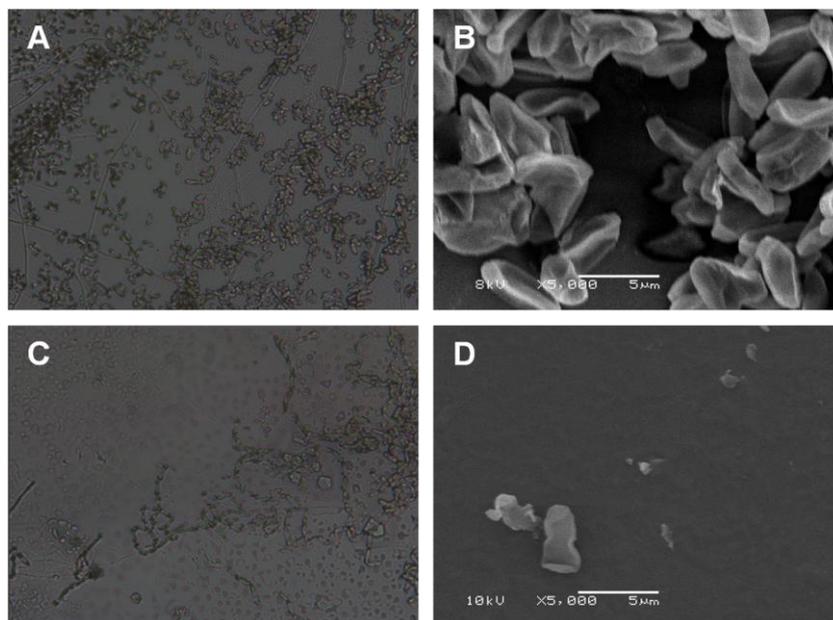


Figura 21: Microscopia de PSU 30' X E6. A e B) PSU 30' incubada em água por 30 dias. C e D) PSU 30' incubada em MCM por 30 dias. A e C) MO – 40X. B e D) MEV – 5.000X.

Quando a superfície do polímero é tratada, ou seja, grupos oxigenados são inseridos se observa um leve aumento na formação das hifas nas condições de 30 min. de tratamento (Fig. 21A e C), porém novamente estas hifas não são observadas por MEV, provavelmente devem ter sido removidas durante a lavagem. Já na condição de 120 min. de tratamento pode se ver uma formação um pouco maior de hifas (Fig. 22).

Com um tempo maior de tratamento da superfície e o aumento na formação das hifas já é possível visualizá-las por MEV (Fig. 22D), provavelmente porque não foi possível removê-las durante a lavagem como na condição anterior (Fig. 21D).

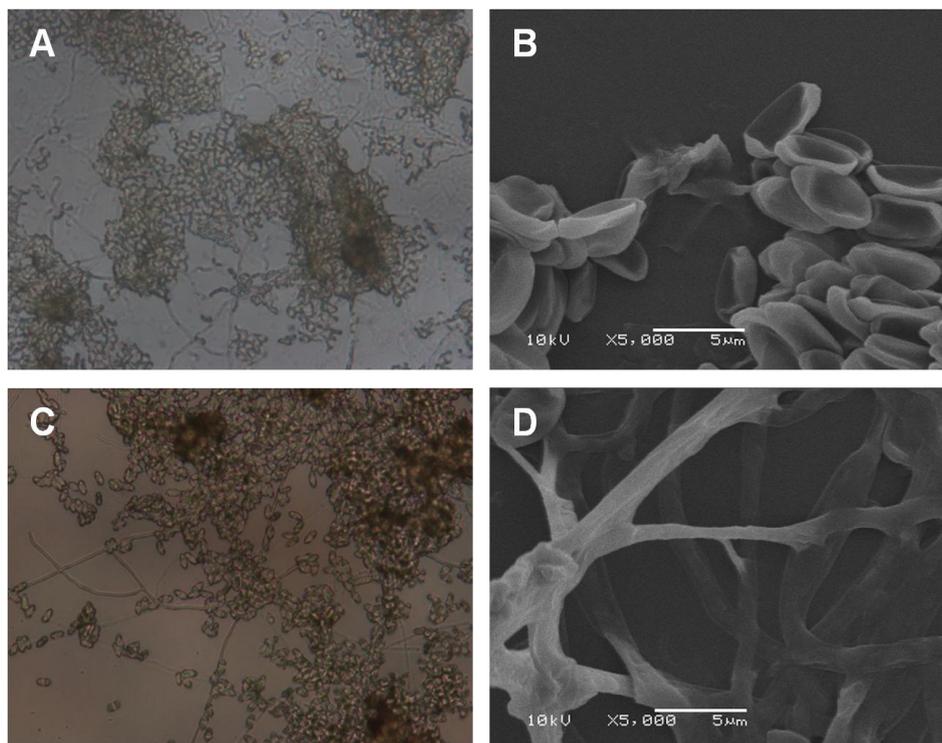


Figura 22: Microscopia de PSU 120' X E6. A e B) PSU 120' incubada em água por 30 dias. C e D) PSU120' incubada em MCM por 30 dias. A e C) MO – 40X. B e D) MEV – 5.000X.

5.6 PU

Assim como PSU, PU também é um polímero produzido a partir de fontes não renováveis, mas ao contrário de PSU se trata de um poliéster cristalino, não suscetível à degradação. Com a modificação superficial este polímero se torna mais hidrofílico, assumindo características de um poliéster, ou seja, suscetível à degradação (Nakajima-Kambe *et al.*, 1999). Para avaliar se esta modificação é suficiente para permitir que fungos consigam se desenvolver sobre esta superfície, os testes realizados previamente nos demais polímeros também foram conduzidos para PU. Nestes testes utilizou-se a linhagem CG97 (Fig. 24, 25 e 26). Do mesmo modo que nos testes anteriores polímeros controle também foram avaliados (Fig. 23).

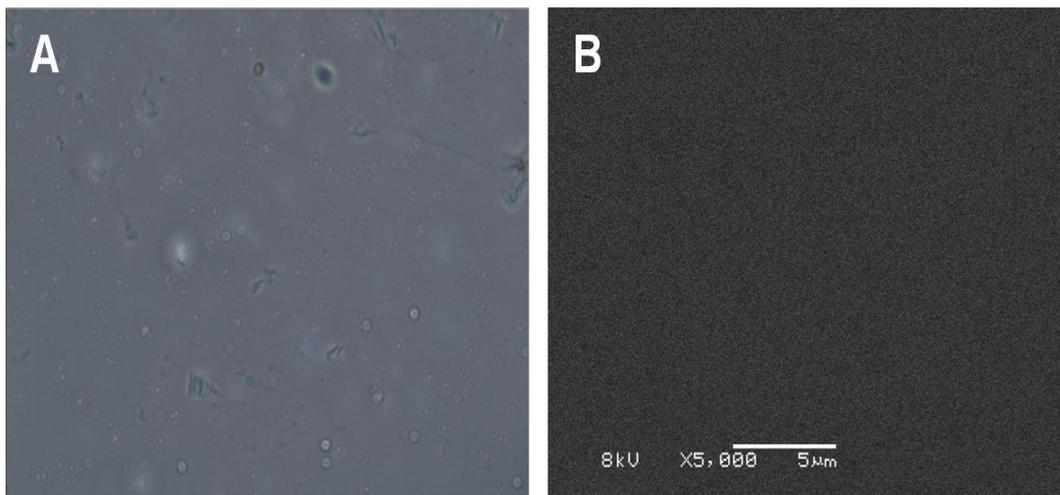


Figura 23: Microscopia PU sem tratamento. A) MO – 40X. B) MEV – 5.000X. Incubação de 30 dias.

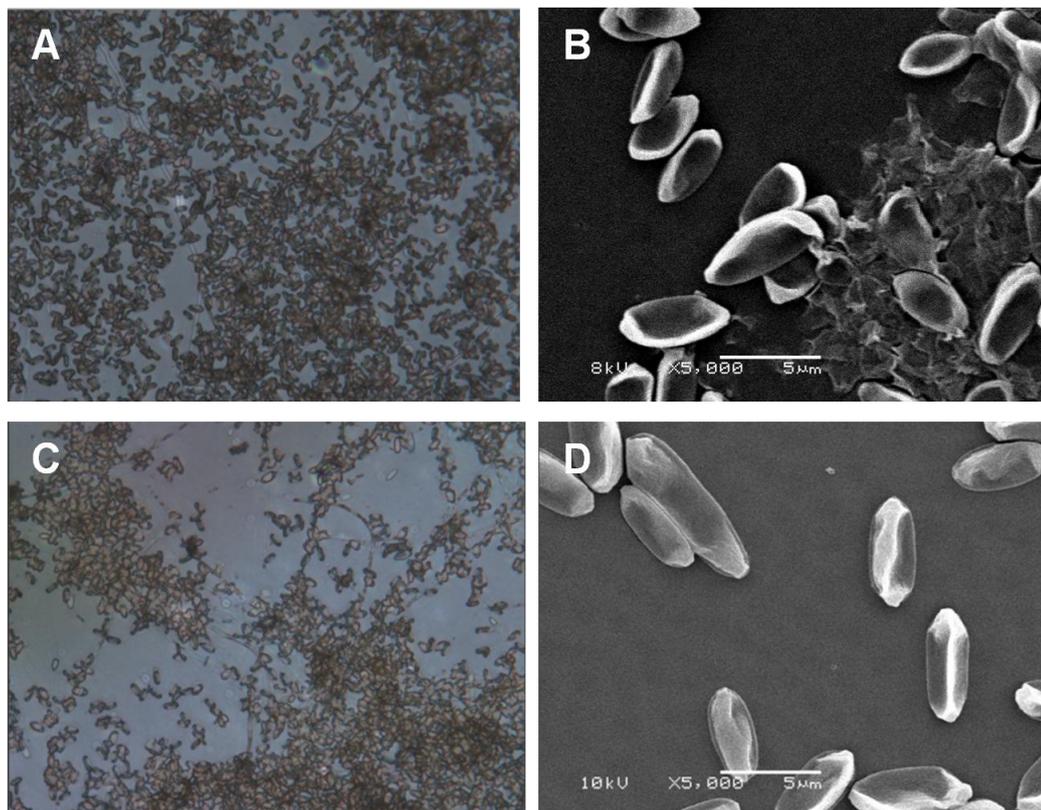


Figura 24: Microscopia de PU ST X CG97. A e B) PU ST incubada em água por 30 dias. C e D) PU ST incubada em MCM por 30 dias. A e C) MO – 40X. B e D) MEV – 5.000X.

Por ser um polímero cristalino, não suscetível à degradação já era esperado que não houvesse uma resposta positiva quanto à germinação dos esporos sobre o polímero sem tratamento superficial (Fig. 24A), porém, mesmo nesta condição, é

possível observar uma pequena formação de hifas quando incubado em meio MCM (Fig. 24C). Em MEV não se observa formação de hifa.

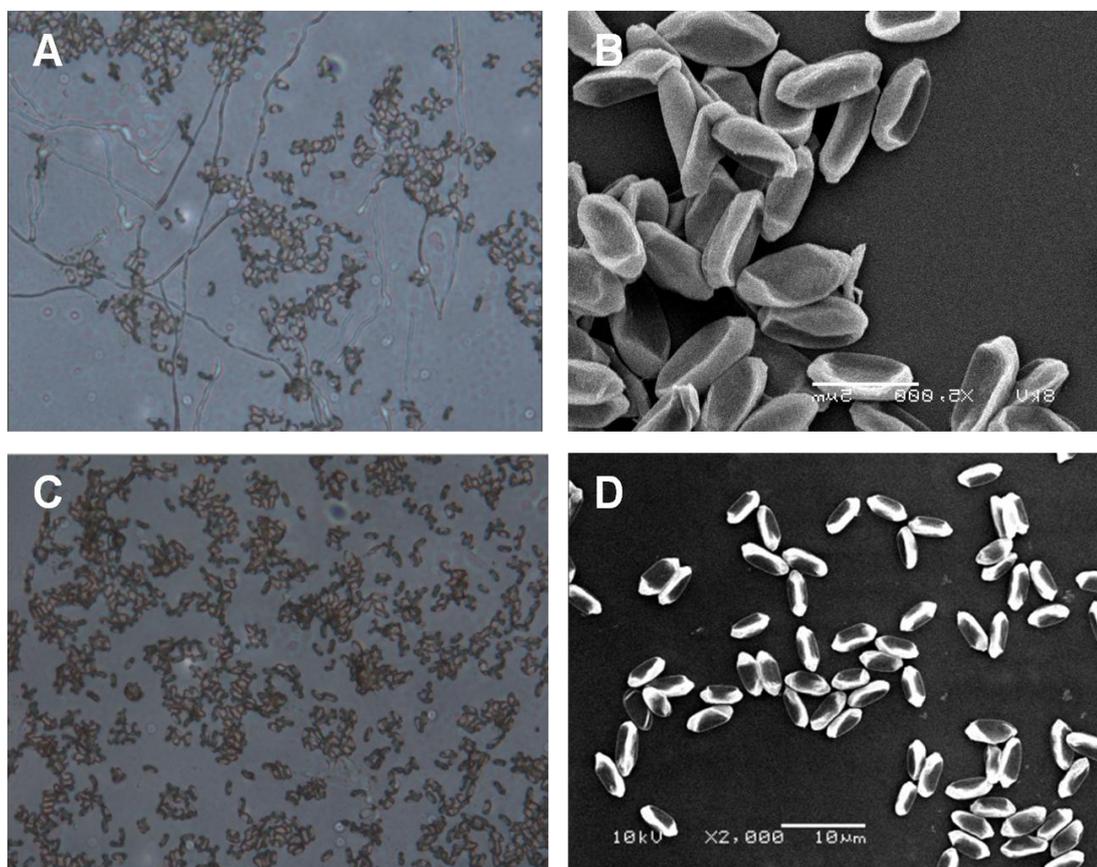


Figura 25: Microscopia de PU 30' X CG97. A e B) PU 30' incubada em água por 30 dias. C e D) PU 30' incubada em MCM por 30 dias. A e C) MO – 40X. B e D) MEV – 5.000X.

Quando os testes foram realizados com os polímeros tratados por 30 e 120 min. esperava-se a formação de hifas, pois Howard (2002) relata que PUs que tem mais grupamentos hidrofílicos serão propensos a serem menos cristalinos, sendo assim mais acessíveis para a biodegradação. Porém isto não foi observado (Fig. 24 e 25), exceto no cultivo PU 30' incubado em água (Fig. 25A), que existem pequenas formações de hifas, as quais também não puderam ser observadas por MEV, porque provavelmente foram removidas na lavagem.

Esta ausência de germinação pode ser explicada pela presença do grupamento amina na molécula de PU, uma vez que moléculas inibidoras de quitinase tem em sua composição este tipo de grupamento (Hartl *et al.*, 2012).

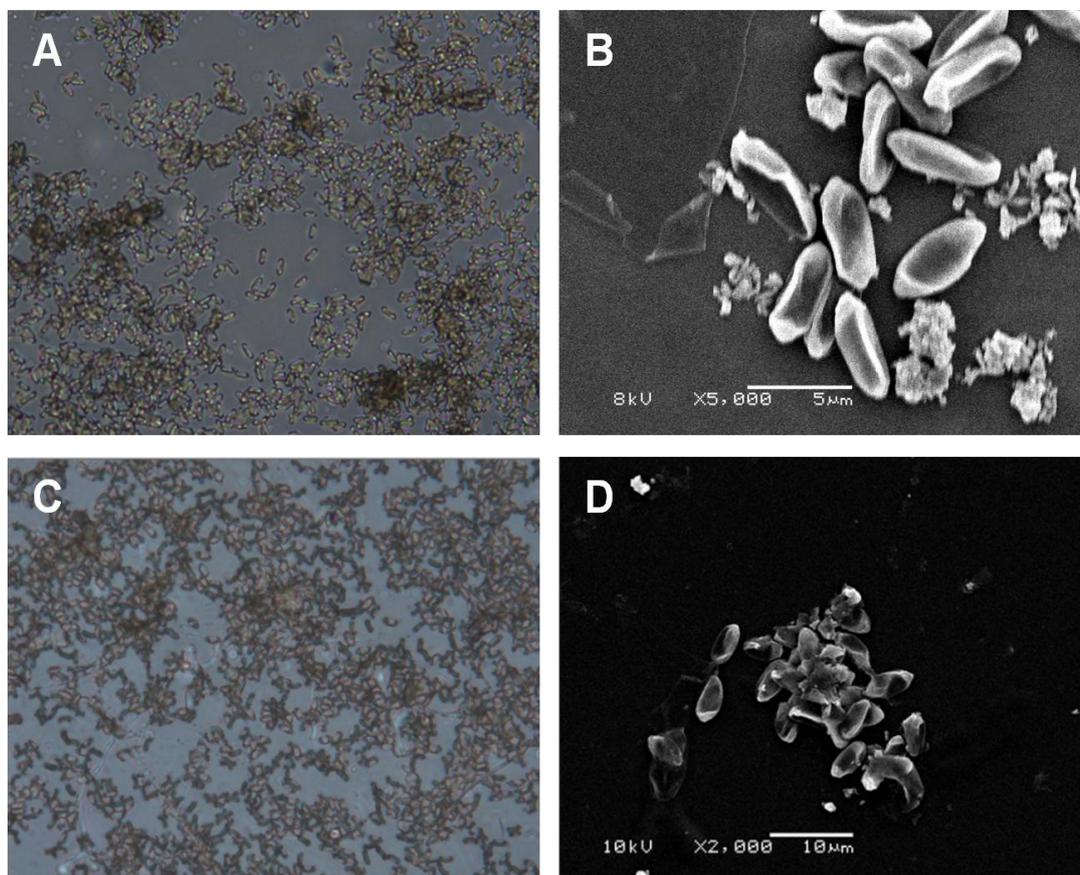


Figura 26: Microscopia de PU 120' X CG97. A e B) PU 120' incubada em água por 30 dias. C e D) PU 120' incubada em MCM por 30 dias. A e C) MO – 40X. B e D) MEV – 5.000X.

Apesar de não terem sido observadas formações de micélio sobre a superfície de PU, mesmo quando tratado, foi possível observar a formação de “buracos” (Fig. 27), os quais possuem estrutura semelhante a dos esporos (Fig. 27B). Isto poderia ser efeito apenas da presença deste micro-organismo nesta superfície, uma vez que materiais metálicos ou não metálicos em ambientes aquosos, sob condições de umidade são suscetíveis à incrustação biológica ou biodeterioração (Gu, 2003).

Este comportamento não foi observado nos demais polímeros (PHB e PSU), embora Sang *et al.* (2002) tenham relatado vários traços, cavidades e sulcos na superfície de filmes plásticos a base de amido, que demonstram que a degradação foi efeito combinado de uma colonização microbiana, incluindo fungos, na superfície do filme.

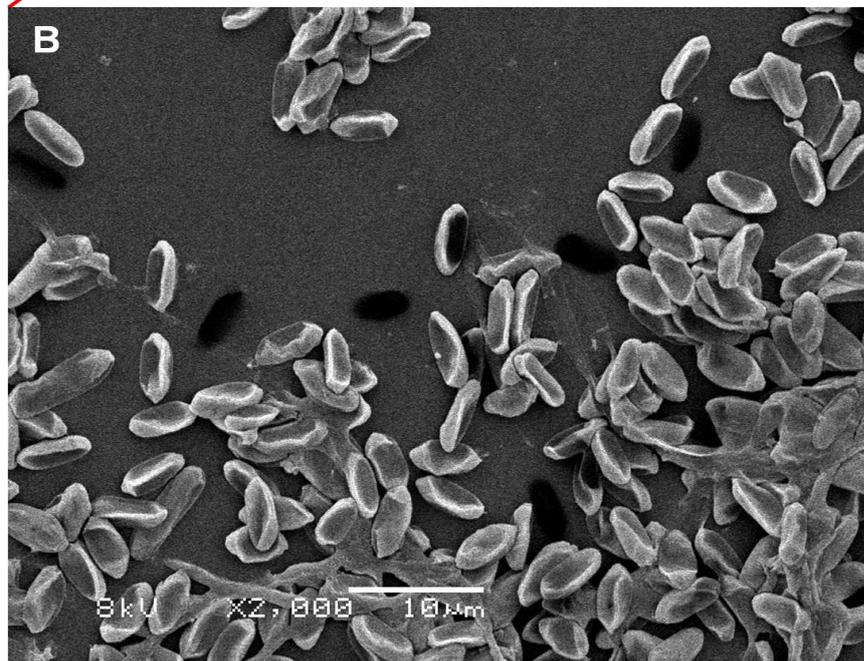
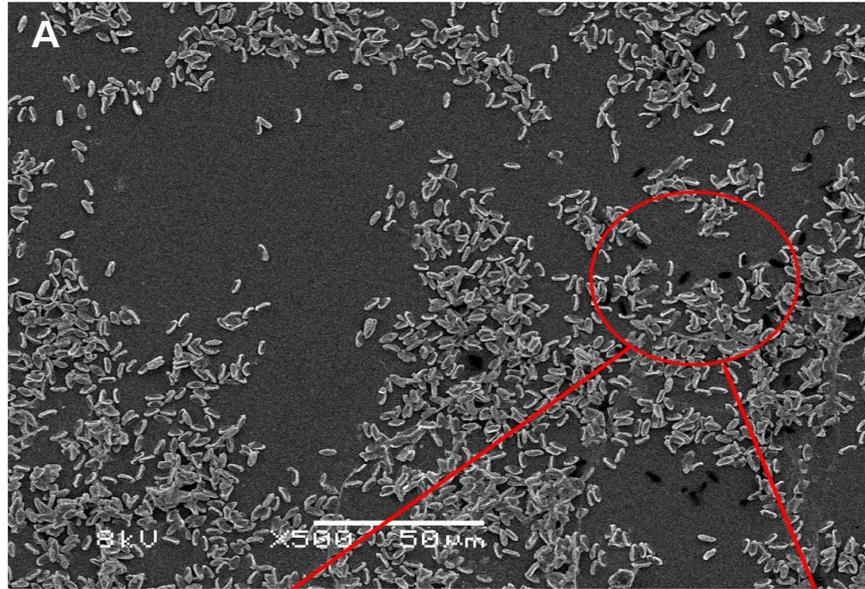


Figura 27: Microscopia Eletrônica de Varredura de PU X CG97. A) MEV – 500X. B) Região ampliada de A. MEV – 2.000X.

5.7 Gravimetria

A primeira análise realizada foi gravimetria a fim de detectar possíveis variações nas massas das amostras (Tabela 3 a 5).

Tabela 3: Gravimetria de PHB.

Polímero	Tratamento	Incubação (dias)	Meio	Perda de massa E6 (%)	Perda de massa CG97 (%)
PHB Controle	ST	10	Água	5,882	5,882
PHB	ST	10	Água	0,473	0,465
PHB Controle	ST	10	MCM	- 70,909	- 70,909
PHB	ST	10	MCM	0,975	1,554
PHB Controle	60'	10	Água	2,777	2,777
PHB	60'	10	Água	1,250	11,470
PHB Controle	60'	10	MCM	1,851	1,851
PHB	60'	10	MCM	0,466	20,000
PHB Controle	180'	10	Água	3,839	3,839
PHB	180'	10	Água	30,639	3,448
PHB Controle	180'	10	MCM	-3,563	-3,563
PHB	180'	10	MCM	12,167	-58,024
PHB Controle	ST	20	Água	1,346	1,346
PHB	ST	20	Água	0,000	39,215
PHB Controle	ST	20	MCM	4,748	4,748
PHB	ST	20	MCM	-46,089	1,052
PHB Controle	60'	20	Água	4,395	4,395
PHB	60'	20	Água	10,526	6,439
PHB Controle	60'	20	MCM	44,000	44,000
PHB	60'	20	MCM	4,000	2,205
PHB Controle	180'	20	Água	3,809	3,809
PHB	180'	20	Água	32,575	2,709
PHB Controle	180'	20	MCM	3,382	3,382
PHB	180'	20	MCM	3,678	-35,967

(-) indica ganho de massa

Tabela 4: Gravimetria de PSU incubado com a linhagem E6.

Polímero X E6	Tratamento	Incubação (dias)	Meio	Perda de massa (%)
PSU Controle	ST	30	Água	3,490
PSU	ST	30	Água	2,012
PSU Controle	ST	30	MCM	1,920
PSU	ST	30	MCM	0,550
PSU Controle	30'	30	Água	*
PSU	30'	30	Água	- 6,970
PSU Controle	30'	30	MCM	*
PSU	30'	30	MCM	- 8,340
PSU Controle	120'	30	Água	4,920
PSU	120'	30	Água	7,102
PSU Controle	120'	30	MCM	19,002
PSU	120'	30	MCM	3,314
PSU Controle	ST	60	Água	*
PSU	ST	60	Água	1,158
PSU Controle	ST	60	MCM	*
PSU	ST	60	MCM	3,478
PSU Controle	30'	60	Água	7,129
PSU	30'	60	Água	5,802
PSU Controle	30'	60	MCM	6,089
PSU	30'	60	MCM	6,903
PSU Controle	120'	60	Água	-9,480
PSU	120'	60	Água	6,298
PSU Controle	120'	60	MCM	8,264
PSU	120'	60	MCM	7,083

(-) indica ganho de massa (*) indica amostra perdida por contaminação

Tabela 5: Gravimetria de PU incubado com a linhagem CG97

Polímero X CG97	Tratamento	Incubação (dias)	Meio	Perda de massa (%)
PU Controle	ST	30	Água	- 0,450
PU	ST	30	Água	0,370
PU Controle	ST	30	MCM	1,460
PU	ST	30	MCM	-0,930
PU Controle	30'	30	Água	0,790
PU	30'	30	Água	0,210
PU Controle	30'	30	MCM	-0,060
PU	30'	30	MCM	0,170
PU Controle	120'	30	Água	3,110
PU	120'	30	Água	1,140
PU Controle	120'	30	MCM	1,070
PU	120'	30	MCM	-5,840
PU Controle	ST	60	Água	- 0,600
PU	ST	60	Água	0,470
PU Controle	ST	60	MCM	1,150
PU	ST	60	MCM	-1,210
PU Controle	30'	60	Água	0,320
PU	30'	60	Água	-0,250
PU Controle	30'	60	MCM	0,380
PU	30'	60	MCM	-0,470
PU Controle	120'	60	Água	2,360
PU	120'	60	Água	0,000
PU Controle	120'	60	MCM	1,800
PU	120'	60	MCM	-4,010

(-) indica ganho de massa (*) indica amostra perdida por contaminação

Através dessa análise é possível detectar a perda de massa e então um processo de degradação, porém nos três polímeros testados algumas amostras e seus controles tiveram ganho de massa. Este ganho de massa pode ser devido a grande adesão deste micro-organismo à superfície destes polímeros sendo

impossível sua remoção sem dano ao material ou ainda por absorção de água pela matriz. Em alguns casos como, por exemplo, PHB 180' x CG97 incubado por 10 e 20 dias observa-se um aumento de massa de 54,46% e 35,96% respectivamente.

Alguns controles tiveram perda de massa, o que não era esperado, porém pode ser atribuída a evaporação de resíduos de solvente que estavam na matriz ou liberação de CO₂ pelo próprio polímero.

De uma maneira geral PHB em seus três tratamentos exibe uma perda de massa que varia entre 0,4% a 5,8% para ambas as linhagens testadas.

PHB 180' X E6 incubado por 10 dias em água-ágar exibe uma perda de massa de 26,8% e quando incubado por 20 dias essa perda aumenta para 28,76%.

Para PHB X CG97, ao contrário de PHB X E6, obteve-se dois polímeros distintos com as maiores perdas de massa, PHB 60' incubado por 10 dias em MCM que teve uma perda de 20% de massa e PHB ST incubado por 20 dias em água-ágar que perdeu 37,86%.

Doi *et al.* (1990) relataram que polímeros de PHB foram submetidos a degradação hidrolítica por 58 dias a 55°C obtendo uma perda de massa entre 1 e 3%. Já Kim *et al.* (2000), realizaram a degradação em diversos tipos de solo, a temperatura de 28°C em 25 dias e as taxas de perda de massa ficaram entre 5,8 e 68,9% dependendo o tipo de solo utilizado. Após o tempo de incubação foram identificados os fungos que atuaram nesta degradação, havendo um total de 6, sendo a maioria do gênero *Penicillium*.

Outros trabalhos foram realizados utilizando polímeros naturais, conforme citados abaixo.

Wu (2009) obteve uma perda de massa de 68% quando utilizou bactérias para degradar um compósito de poli (ácido láctico) (PLA) e fibra de coco verde, após 21 dias de incubação, porém quando utilizou somente o polímero PLA a perda de massa ficou abaixo de 20%.

Geweely & Ouf (2011) utilizaram *A. niger* para degradar polímeros a base de amido e obteve um rendimento de 72%, assim como no exemplo citado anteriormente os polímeros com ótimas taxas de degradação possuem componentes naturais em sua estrutura o que facilita a adesão e degradação de micro-organismos.

Neste trabalho quando se utilizou o polímero natural PHB obteve-se uma perda de massa entre 20 e 30%, concordando com os dados obtidos por Wu (2009), mesmo utilizando diferentes metodologias para degradação.

Aqui, PHB ST X CG97 e PHB 180' X E6 foram os polímeros que tiveram maior perda de massa em todos os testes. O comportamento de perda de massa foi totalmente aleatório, o que dificulta a teorização e a relação entre as amostras nesta análise.

Para os polímeros de fontes não renováveis também não houve um comportamento padrão, e as perdas de massa foram relativamente pequenas comparadas ao PHB.

PSU 120' X E6 incubada em água-ágar por 30 e 60 dias demonstraram as maiores perdas de massa de 2,18% e 6,29% respectivamente.

Não foram encontrados na literatura estudos sobre biodegradação de PSU, este polímero é mais estudado quanto à degradação térmica por ser muito utilizado em materiais hospitalares que são submetidos à autoclave. PSU e PC (policarbonato) possuem estrutura molecular semelhante, e PSU é utilizado como material de substituição de PCs por ter um custo menos elevado.

Artham &Doble (2010) trataram PC com radiação UV por 30 dias, e em seguida submeteram este polímero ao processo de biodegradação por fungos filamentosos, juntamente com o polímero não tratado e outro polímero tratado termicamente a 100°C. Este ensaio foi realizado em meio de sal mineral, durante 12 meses. Ao final deste período a perda de massa detectada foi de 5,5% para o polímero tratado com UV.

Ao contrário do que vinha sendo observado em PHB e em PSU que as amostras tratadas haviam perdido mais massa, em PU o polímero sem tratamento é que teve uma perda maior em relação às amostras de polímeros tratados. PU ST X CG97 incubada em água-ágar por 30 e 60 dias teve uma perda de massa de 0,37% e 0,47% respectivamente.

Segundo Nakajima-Kambe *et al.* (1999), poliéster-poliuretana é facilmente degradado enquanto poliéter-poliuretana é relativamente resistente ao ataque microbiano. Neste trabalho PU ST trata-se um poliéter-poliuretana que mesmo

sendo descrito como resistente demonstrou uma perda de massa, comprovando que houve o ataque microbiano.

O que se pode observar de maneira geral é que polímeros incubados em água-ágar demonstram uma perda de massa maior comparado aos incubados em MCM, exceto para PHB 60' X CG97. Isto deve estar relacionado à falta de nutrientes neste meio fazendo com que o fungo utilize o polímero como uma fonte de carbono para o seu desenvolvimento. Outra observação que pode ser feita é que polímeros com a superfície tratada tendem a perder mais massa do que polímeros sem tratamento.

5.8 FTIR-ATR (Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier com método de reflectância total atenuada).

Análises de FTIR-ATR foram realizadas para comparar entre os diferentes cultivos e polímeros os grupos orgânicos presentes.

Uma vez que a lavagem dos polímeros não foi totalmente eficiente um espectro do fungo foi gerado (Fig. 28) para que fosse possível excluir grupos orgânicos que estiverem presentes na superfície e não fossem produtos de degradação e sim restos do fungo presentes na superfície das amostras.

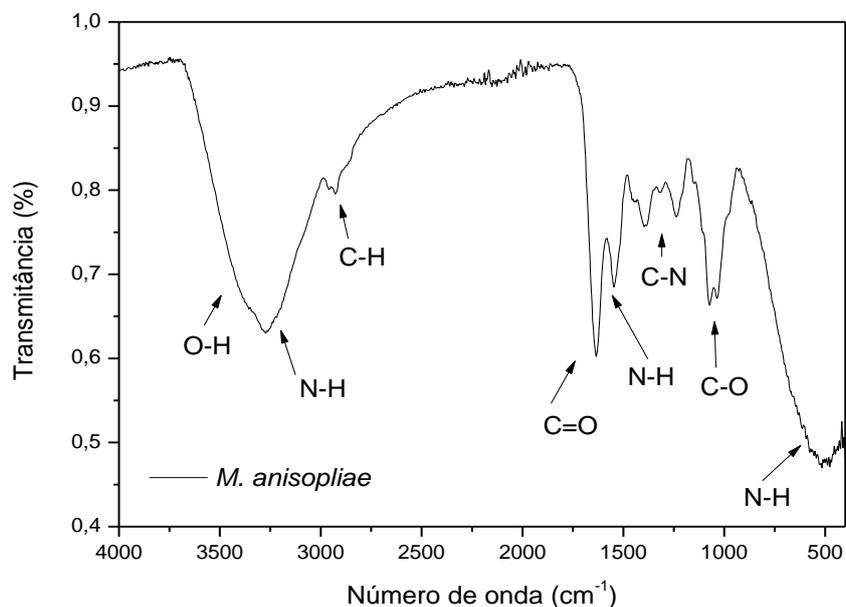


Figura 28: Espectro de infravermelho do fungo *M. anisopliae*

Foram gerados também espectros de infravermelho dos polímeros antes de serem submetidos à degradação ou serem incubados simplesmente como polímeros controle (Tabela 6, 7 e 8).

Tabela 6: Valores de números de onda dos máximos de bandas e picos dos espectros de infravermelho de PHB padrão (cm^{-1})

PHB ST	PHB 60'	PHB 180'
2995	2995	2995 ⁻
2976	2976	2976 ⁻
2933	2933	2933 ⁺
2876	2876	
1718	1718	
1680	1680	1680 ⁺
1450	1450	1450 ⁺
		1420 ⁺
1042	1042	
1378	1378	
1357	1357	

1274	1274	
1261	1261	
1225	1225	1225''
1180	1180	
1130	1130	
1100	1100	
1053	1053	
1041	1041	1041 (alargamento)
977	977	
953	953	
937	937	
928	928	
910	910	
894	894	
		872
859	859	
938	938	
825	825	
656	656	
458	458	
431	431	
422	422	

Tabela 7: Valores de números de onda dos máximos de bandas e picos dos espectros de infravermelho de PSU padrão (cm^{-1})

PSU ST	PSU 30'	PSU 120'
		3650-3100
		3095
		1768
		1720
		1716
		1682
		1670
		1646
		1636
		1408

		1387
		1364
		1077
		1071
	1033	1033
	967	967
	947	947
	920	920
831		
795	795	795
756	756	756
738		
713	713	713
687		
663	663	663
633	633	633
	593	593
554		

Tabela 8: Valores de números de onda dos máximos de bandas e picos dos espectros de infravermelho de PU padrão (cm^{-1})

PU ST	PU 30'	PU 120'
	3600-3100	3600-3100
3226		
2939		
2853		
2795		
		1780
1729	1729	1729
1699	1699	1699
1612		
1596		1596
1527	1527	
1510		
1478	1478	
1447		
1435		
1413		
1367		1367
1309		
1219		1219
1203		
1100	1100	1100

1076			
1017			
981			
961			
915			
848			
815			
771			
656	656	656	656
610	610	610	610

Nos espectros dos valores de números de onda dos máximos de bandas e picos dos polímeros padrões (Tabela 6, 7 e 8) é possível observar bandas que são acrescidas ou diminuídas durante os tratamentos realizados na superfície dos polímeros (Stuart, 2004; Robert, 2005; Weng *et al.*, 2010; Alves *et al.*, 2009; Rosu *et al.*, 2009; Kessler *et al.*, 2013).

Por exemplo, em PHB 180' temos o surgimento da banda 872 cm^{-1} que não estava presente nos demais polímeros não tratados ou tratados por 60'. Ao contrário de PHB em que não se observam muitas alterações com os tratamentos, em PU e PSU existe o surgimento de diversas bandas e algumas que são eliminadas.

5.8.1 PHB

Após o período de incubação que é de 10 e 20 dias para PHB, os valores máximos de picos e bandas dos espectros de infravermelho foram obtidos para os polímeros controle (Fig. 29 e 30).

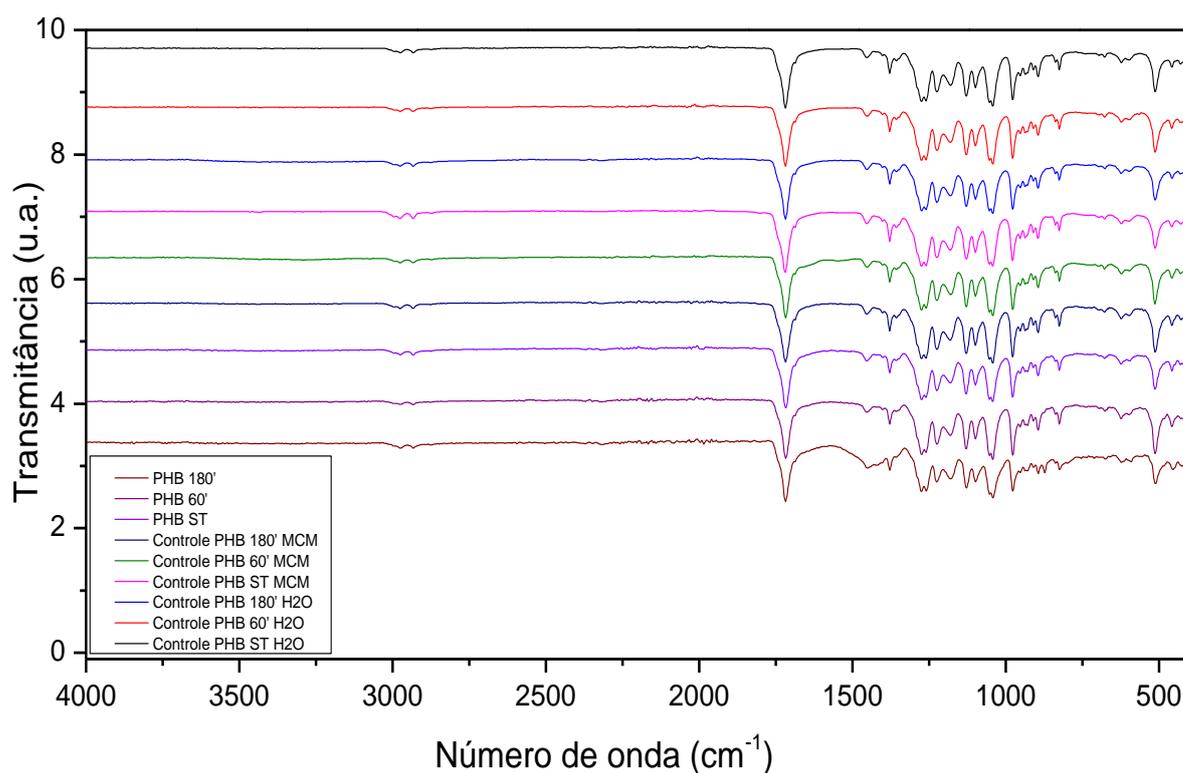


Figura 29: Espectro de infravermelho PHB controles incubados por 10 dias

Através dos gráficos é possível observar que não houve alterações significativas nos polímeros controle tanto para 10 dias (Fig. 29) quanto para 20 dias (Fig. 30). O que parece ser uma alteração no polímero PHB 180' é apenas um rearranjo das cadeias que acaba deslocando o sinal no espectro.

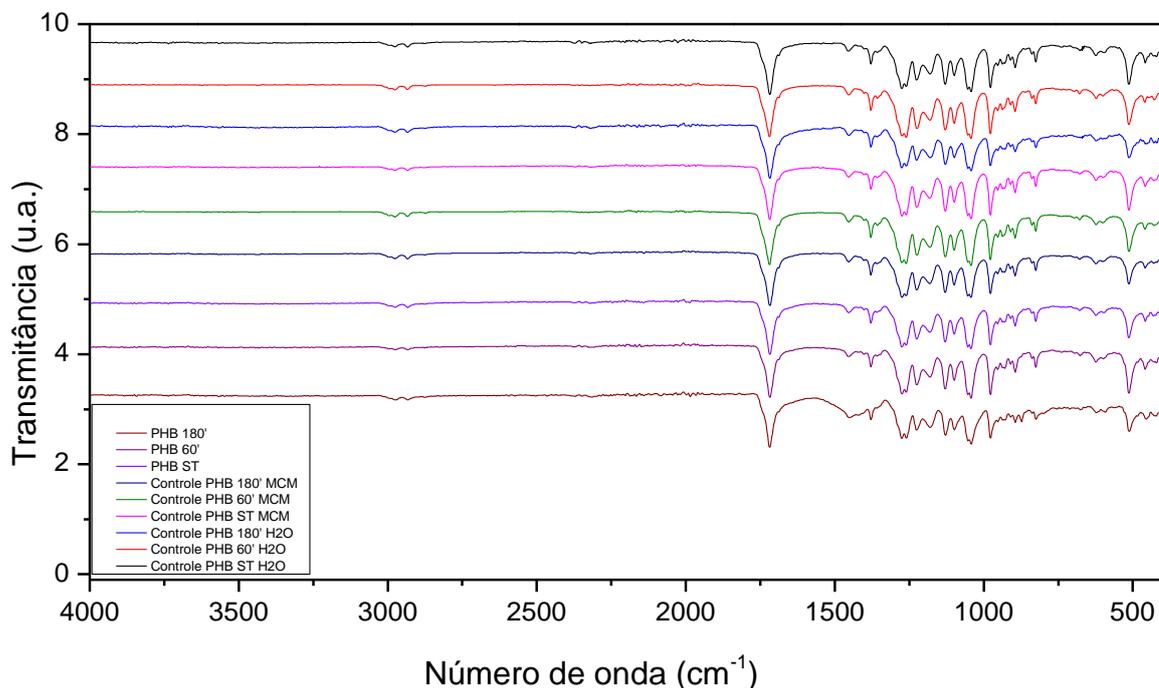


Figura 30: Espectro de infravermelho de PHB controles incubados por 20 dias.

Quando polímeros controle foram avaliados para perda de massa houve uma variação não linear de massas, porém por estes espectros é possível comprovar que não houve alteração na estrutura do polímero, afirmando que as alterações provavelmente ocorreram por absorção de água ou evaporação de solventes e gases.

Como não houve alteração na estrutura dos polímeros controle, estes serviram como base de comparação para os polímeros incubados para degradação.

Tabela 9: Valores de números de onda dos máximos de bandas e picos dos Espectros de infravermelho de PHB ST X E6 (cm^{-1})

Controle	H ₂ O - 10 DIAS	COVE - 10 DIAS	H ₂ O - 20 DIAS	COVE - 20 DIAS
	3600-3100	3600-3100	3600-3100	3600-3100
	3300	3300	3300	3300

2995				
2976				
2933				
2876				
1718	1718	1718 ⁻	1718	1718 ⁻
	1640	1640	1640	1640
1680				
	1525	1525	1525	1525
1450			1450	1450
1378				
1357				
			1309	1309
1274				
1261				
1225				
1180			1180 ⁻	1180 ⁻
1130			1130 ⁻	1130 ⁻
1100				
			1055 ⁻	1055 ⁻
1053				
1042				
1041	1041	1041	1041 ⁺	1041 ⁺
977				
953				
937				
928				
910				
894				
859				
938				
825				
656				

458

431

422

(\downarrow leve redução) (\downarrow redução) (\uparrow aumento)

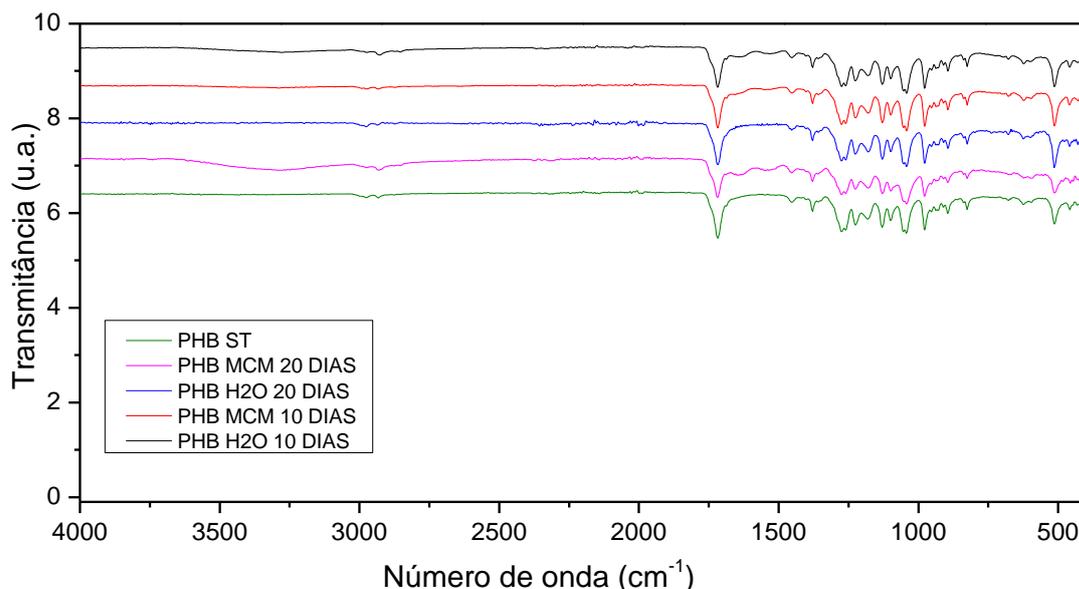


Figura 31: Espectro de Infravermelho de PHB ST X E6

Para PHB ST incubado com a linhagem E6 pode-se observar o surgimento ou alteração em 11 bandas do espectro, são elas: 3600-3100, 3300, 1718, 1640, 1525, 1450, 1309, 1180, 1130, 1055 e 1041 cm^{-1} (Tabela 9). Dentre estas deve-se destacar a banda 3600-3100 cm^{-1} que se refere ao grupamento OH o qual indica hidrólise e também a banda 1640 cm^{-1} (C=C) que surge após a quebra dos grupamentos carbonila (C=O), também por hidrólise (Figura 31).

Surgem duas bandas 3300 e 1525 cm^{-1} , as quais são características de grupamentos NH, que se referem a aminas ou amidas e não a nitratos (presentes no meio de cultura). Segundo Stuart (2004) quanto maior o produto de degradação mais intensa será a banda na região de 3300 cm^{-1} . Embora existam bandas nessa faixa também para fungos, na região 3300 cm^{-1} , o valor exato exibe um deslocamento do número de onda característico dos grupamentos existentes

no fungo, nas regiões 2849, 2917 e 3008 cm^{-1} , que são características de lipídios, que estão presentes no espectro do fungo (Salman *et al.*, 2010 e Salman *et al.*, 2012).

A banda na região 1525 cm^{-1} , também não se refere à banda característica do fungo, sendo produto de degradação. As bandas presentes em fungos nesta região são: 1567 cm^{-1} e 1553 cm^{-1} que refere-se a amidas de proteínas e amidas II respectivamente (Stuart, 2004 e Salman *et al.*, 2012).

Outra banda que demonstra alteração é a banda 1309 cm^{-1} que refere-se ao grupamento C-H. Qualquer dano em qualquer região da molécula do polímero ocasiona alterações nestes grupamentos, pois uma vez que um átomo de oxigênio é extraído da cadeia polimérica a vacância deixada irá desencadear rearranjos moleculares que modificarão a disposição dos grupos moleculares, sendo um deles o C-H.

Tabela 10: Valores de números de onda dos máximos de bandas e picos dos espectros de infravermelho PHB 60' X E6 (cm^{-1})

Controle	H ₂ O - 10 DIAS	COVE - 10 DIAS	H ₂ O - 20 DIAS	COVE - 20 DIAS
	3600-3100	3600-3100	3600-3100	3600-3100
	3300	3300	3300	3300
2995				
2976				
2933				
2876				
			2850	2850
1718	1718 ⁻	1718 ⁻	1718 ⁻	1718 ⁻
1680				
	1640	1640	1640	1640
	1525	1525	1525	1525
1450			1450 ⁻	1450 ⁻
			1309	1309
1042				
1378				
1357 ⁺				
1274				
1261				
1225				
1180			1180 ⁻	1180 ⁻
1130			1130 ⁻	1130 ⁻
1100	1100 ⁺	1100 ⁺	1100 ⁻	1100 ⁻
			1055 ⁻	1055 ⁻
1053				
1041			1041 ⁺	1041 ⁺
977				

953
930 ⁻
937
928
910
894
870 ⁻
870 ⁻
860 ⁻
860 ⁻
860 ⁻
860 ⁻
859
938
825
656
593
593
591
591
458
431
422

(⁻ leve redução) (⁻ redução) (⁺ aumento)

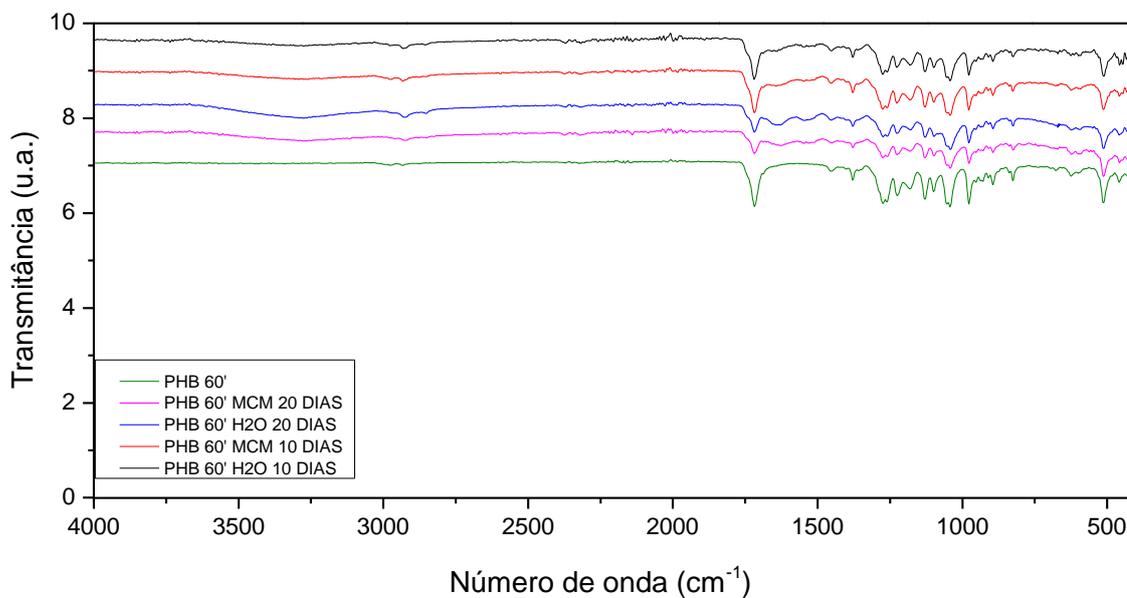


Figura 32: Espectro de Infravermelho de PHB 60' X E6

Tabela 11: Valores de números de onda dos máximos de bandas e picos dos Espectros de Infravermelho PHB 180' X E6 (cm⁻¹).

Controle	H ₂ O - 10 DIAS	COVE - 10 DIAS	H ₂ O - 20 DIAS	COVE - 20 DIAS
3600-3100	3600-3100	3600-3100	3600-3100	3600-3100
	3300	3300	3300	3300
2995				
2976				
2933				
2876				

			2850	2850
1718	1718 ⁻	1718 ⁻	1718 ⁻	1718 ⁻
1680				
	1640	1640	1640	1640
	1525	1525	1525	1525
1470				
1450	1450 ⁻	1450 ⁻	1450 ⁻	1450 ⁻
			1055 ⁻	1055 ⁻
1042				
1378				
1357				
	1275	1275		
1274				
1261				
	1260	1260		
1225				
1180	1180	1180		
1130	1130	1130		
1100				
	1055	1055		
1053				
1041				
977				
953				
930				
937				
928				
910				
894				
	870	870	870	870
859				
938				
825				
656				
458				
431				
422				

(⁻ leve redução) (⁻ redução) (⁺ aumento)

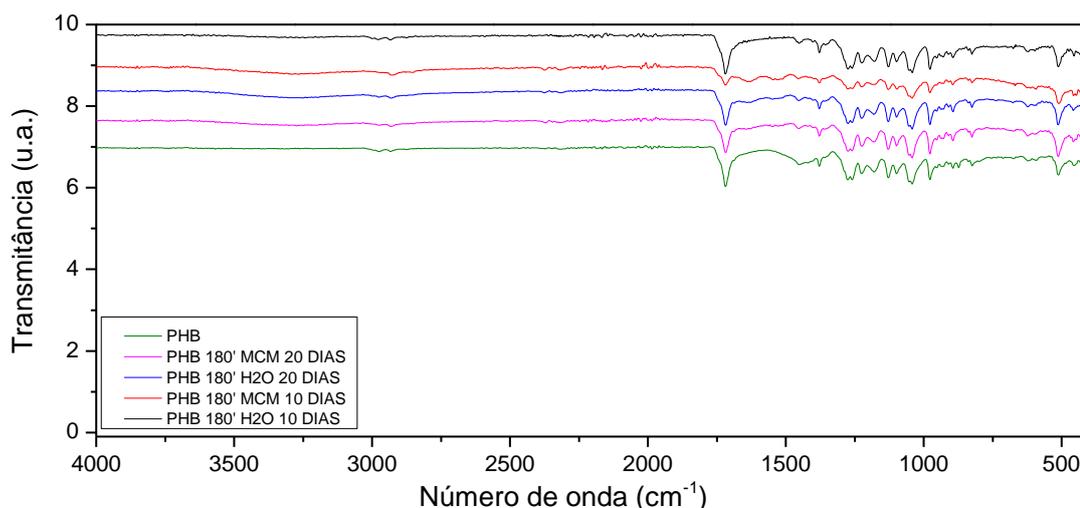


Figura 33: Espectro de Infravermelho de PHB 180' X E6

Para PHB 60' e PHB 180' tem-se o surgimento ou modificação de 17 e 14 bandas, respectivamente (Tabela 10 e 11) (Fig. 32 e 33).

Novamente há o aparecimento do sinal de hidrólise representado pela banda 3600-3100 cm^{-1} , e das bandas 3300 e 1525 cm^{-1} indicando sinais de degradação como descrito anteriormente.

Curiosamente se observa o surgimento da banda 3600-3100 cm^{-1} no polímero controle. Provavelmente isto se deve a algum processo de hidrólise não enzimática, concordando com Lucas *et al.* (2008) que afirma que a intrusão da água no polímero inicia o processo de hidrólise.

A intensidade desta banda é baixa, pois quando observados os gráficos dos polímeros controle (Fig. 29 e 30) não se observa esta alteração. Como houve um aumento dos grupos oxigenados pelo tratamento superficial é possível que tenham acontecido alguns processos hidrolíticos.

Em ambos os polímeros observa-se o aparecimento da banda 2850 cm^{-1} característica de lipídios presentes em fungos (Stuart, 2004; Salman *et al.*, 2010; Salman *et al.*, 2012).

Os dados acima citados referem-se à incubação com a linhagem E6 do fungo *M. anisopliae*, quando incubados com a linhagem CG97, foram obtidos dados extremamente semelhantes (Apêndice), exceto pela alteração na banda 1402 cm^{-1}

que se refere ao grupamento hidroxila o qual também indica processos de hidrólise (Theophanides, 2012).

5.8.2 PSU

Da mesma maneira que foi observado para PHB, em PSU polímeros controles não foram observados sinais de degradação (Fig. 34 e 35).

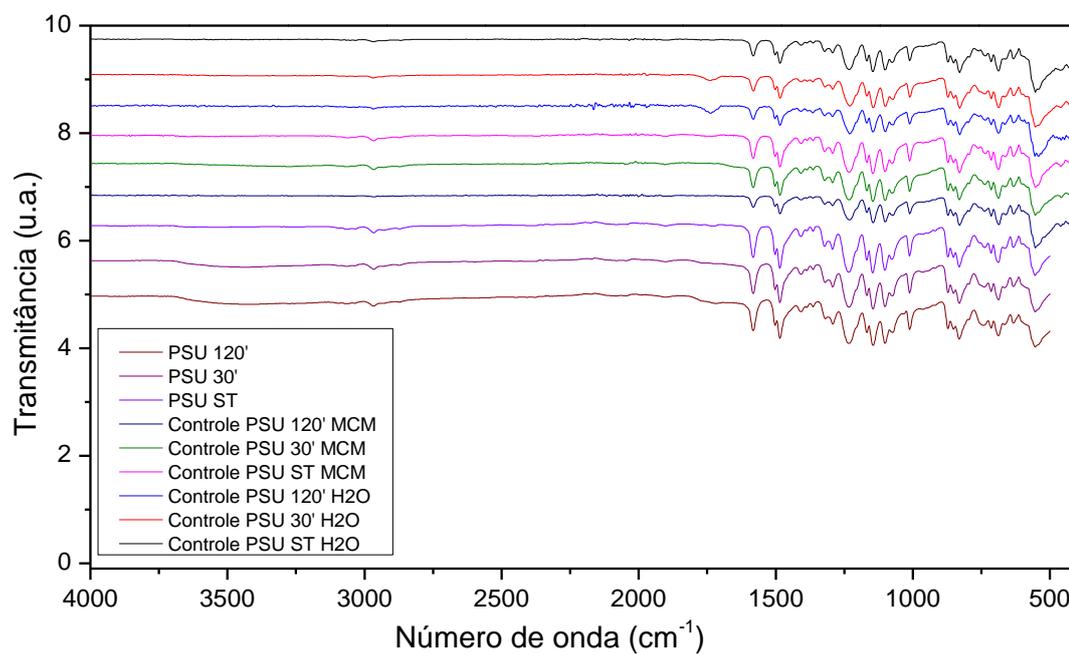


Figura 34: Espectro de infravermelho de PSU controle incubado por 30 dias.

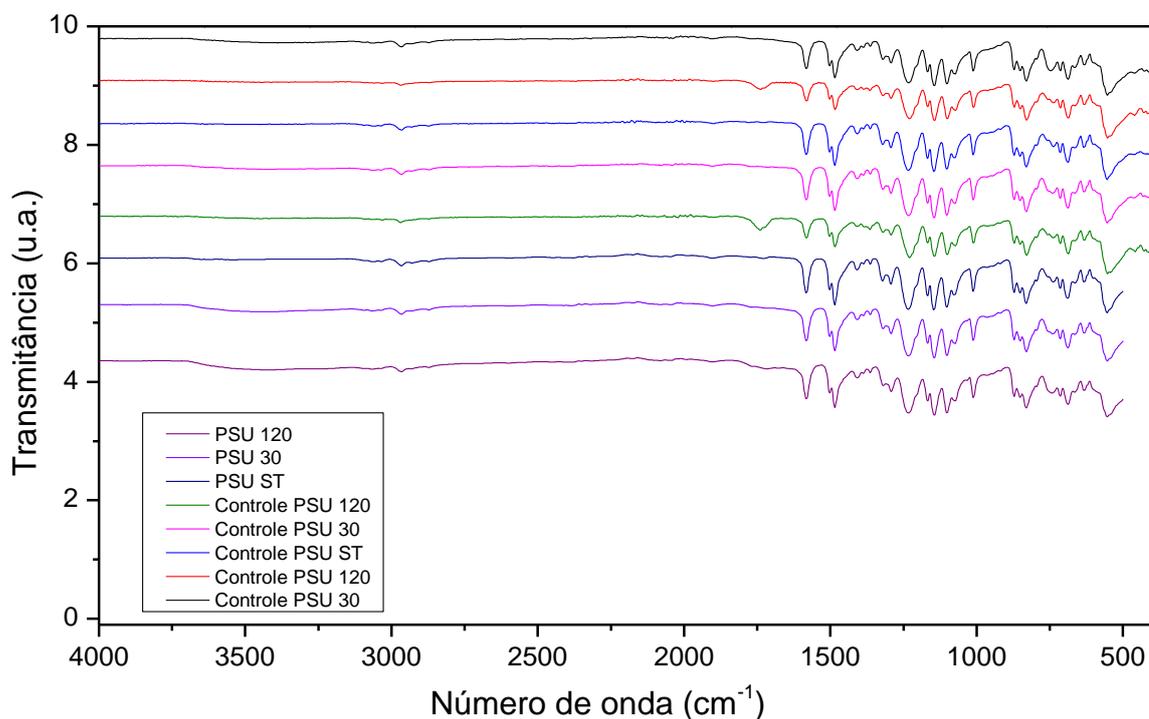


Figura 35: Espectro de infravermelho de PSU controle incubado por 60 dias.

Tabela 12: Valores de números de onda dos máximos de bandas e picos dos espectros de infravermelho de PSU ST x E6 (cm^{-1}).

Controle	H ₂ O - 30 DIAS	COVE - 30 DIAS	H ₂ O - 60 DIAS	COVE - 60 DIAS
		3100-3600		3100-3600
			1736	1736
		1640		
			1408	1408
				1145
		1070		
				1100
		1040		
831	831			
795	795			
756	756			
738	738			
713	713			
687	687			
663	663			
633	633			

554 554

(⁻ leve redução) (⁻ redução) (⁺ aumento)

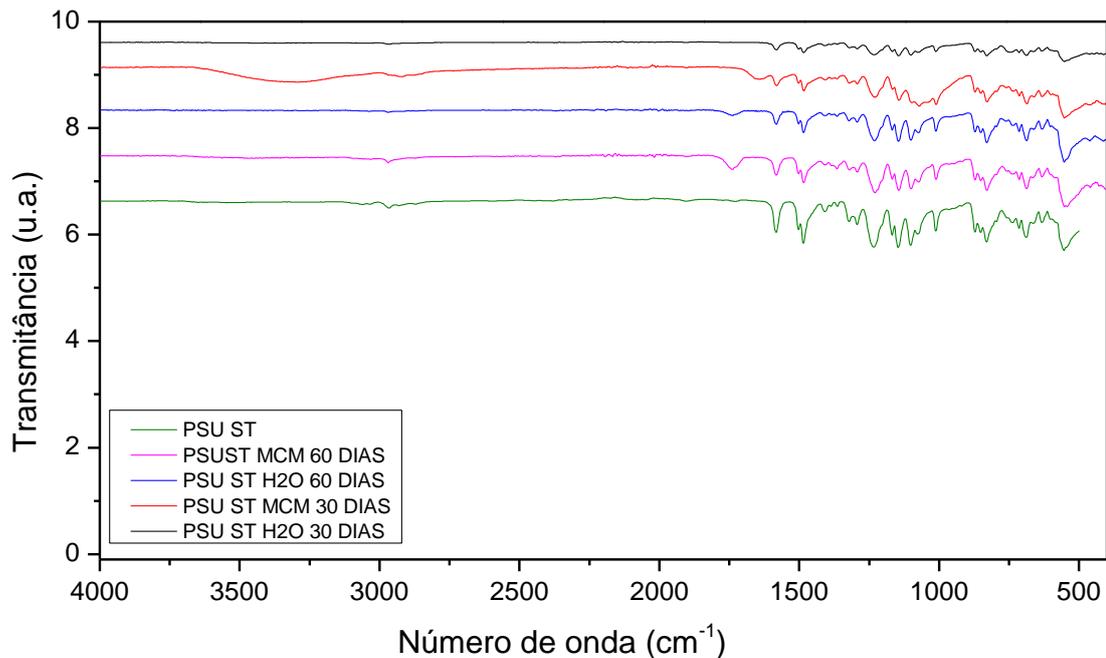


Figura 36: Espectro de Infravermelho de PSU ST X E6.

Como mostrado na Tabela 12, para PSU ST ocorre a alteração de 8 bandas na leitura espectral (Fig. 36). Novamente observa-se o surgimento da banda 3100-3600 cm^{-1} (OH) que juntamente com a banda 1736 cm^{-1} (C=O) indicam hidrólise deste polímero o que acaba ocasionando a aparecimento da banda 1640 cm^{-1} pela alteração estrutural da molécula.

É observada também presença da banda 1145 cm^{-1} que se refere a grupamentos nitrogenados provavelmente resultado de subprodutos de degradação.

Tabela 13: Valores de números de onda dos máximos de bandas e picos dos Espectros de Infravermelho PSU 30' X E6 (cm^{-1}).

Controle	H ₂ O - 30 DIAS	COVE - 30 DIAS	H ₂ O - 60 DIAS	COVE - 60 DIAS
	3100-3600	3100-3600	3100-3600	3100-3600

	1720-1680	1720-1680	1720-1680
		1640	1640
1408		1145	1145
		1100	1100
		1070	
1033			
	963		
967			
947			
920			
795			
		740	740
756			
713			
663			
633			
593			

(⁻ leve redução) (⁻ redução) (⁺ aumento)

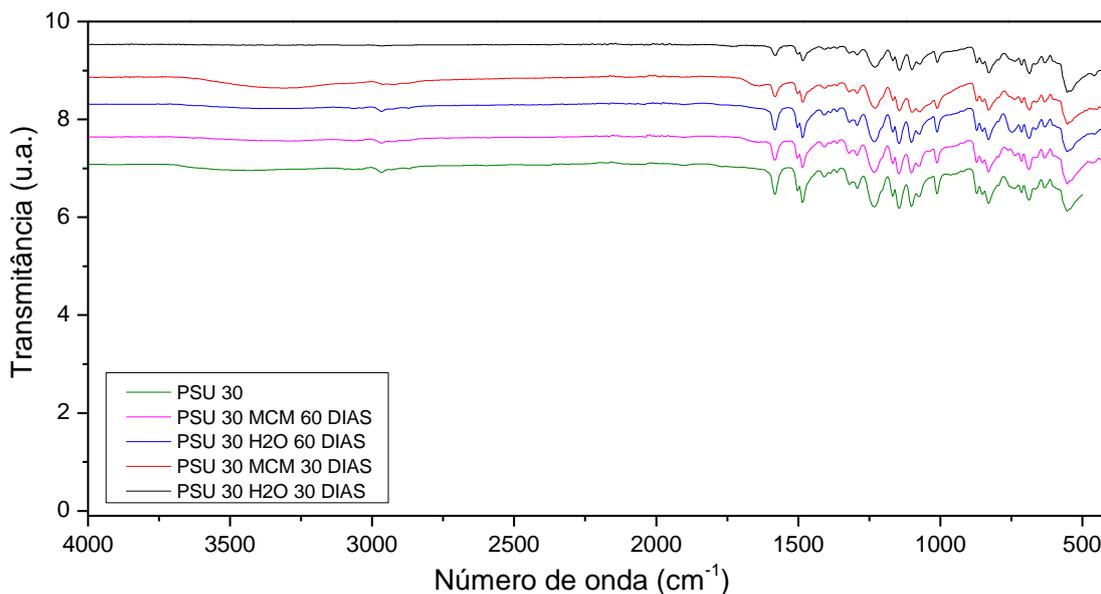
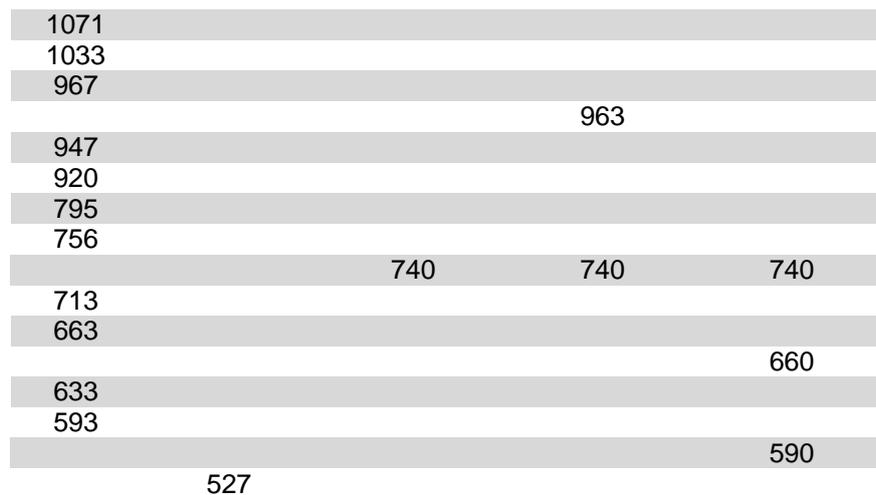


Figura 37: Espectro de Infravermelho de PSU 30' X E6.

Tabela 14: Valores de números de onda dos máximos de bandas e picos dos Espectros de Infravermelho PSU 120' X E6 (cm^{-1}).

Controle	H ₂ O - 30 DIAS	COVE - 30 DIAS	H ₂ O - 60 DIAS	COVE - 60 DIAS
3650-3100	3100-3600	3100-3600	3100-3600	3100-3600
3095				
1768	1738			
	1725			
1720		1720-1680 [~]	1720-1680 [~]	1720-1680 [~]
1716				
1682				
1670				
				1640
1646				
1636				
	1583			
				1580
	1484			
				1480
1408		1408	1408	1408
1387				
	1365			
1364				
	1295			
	1232			
	1228-1216			
		1145		1145
				1100
1077				



(⁻ leve redução) (⁻ redução) (⁺ aumento)

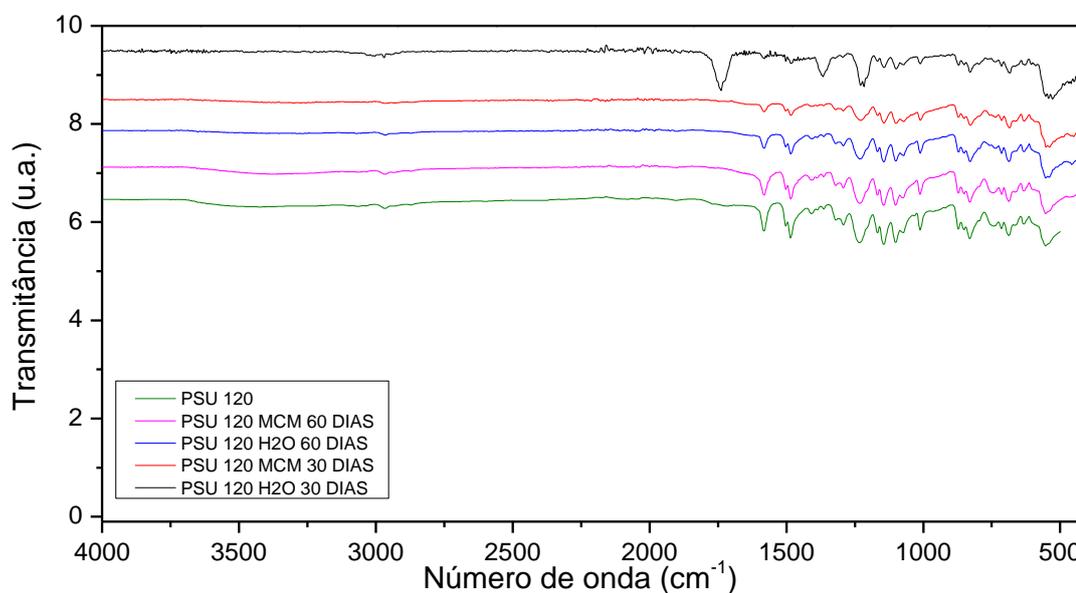


Figura 38: Espectro de Infravermelho de PSU 120' X E6.

O comportamento observado para PSU 30' e 120' (Tabela 13 e 14) segue o padrão observado para PSU ST. Porém nestes dois polímeros se tem uma leitura na região 1720-1680 cm^{-1} (Fig. 37 e 38) que apresenta uma diminuição. Esta mesma região foi descrita com redução também por Zahra *et al.* (2010) durante a degradação de polietileno de baixa densidade. O autor afirma que essa diminuição se deve a utilização do grupamento carbonila como substrato pelo fungo.

5.8.3 PU

PU foi incubada com a linhagem CG97 para degradação e seguiu o mesmo comportamento que PSU (Apêndice), apresentando bandas de hidrólise e grupamentos nitrogenados. Também alterações na molécula que são observadas por regiões específicas nos espectros de infravermelho como, por exemplo, a região 1640 cm^{-1} .

Este comportamento de danos na molécula não era esperado, pois como observado por microscopia ótica e eletrônica (item 5.6) não houve germinação dos esporos e nem crescimento do fungo sobre a superfície. Isto pode ser explicado pelo fato de que mesmo na forma de esporo *Metarhizium* é capaz de secretar proteínas e estas podem estar interagindo com a superfície do polímero e causando danos a estrutura da cadeia.

Duas adesinas MAD1 e MAD2 são secretadas por *M. robertssi* no momento da adesão em inseto e plantas. A secreção destas proteínas é dependente do meio aonde este fungo irá se desenvolver, podendo ser superexpressa ou ter uma redução da sua expressão (Wang & St Leger 2007).

Wang & St Leger (2007) superexpressaram Mad1 em *S. cerevisiae* e após 10h de incubação observaram as células aderidas à superfície plástica. Estas células não puderam ser removidas da superfície. Este experimento concorda com os dados observados por microscopia neste trabalho (Item 5.3).

5.9 Tof-Sims

A biodegradação dos polímeros também foi avaliada por Tof-Sims. Os primeiros espectros positivos e negativos gerados foram dos polímeros padrão.

Todas as amostras avaliadas por Tof-Sims foram incubadas por 10 dias.

5.9.1 PHB ST

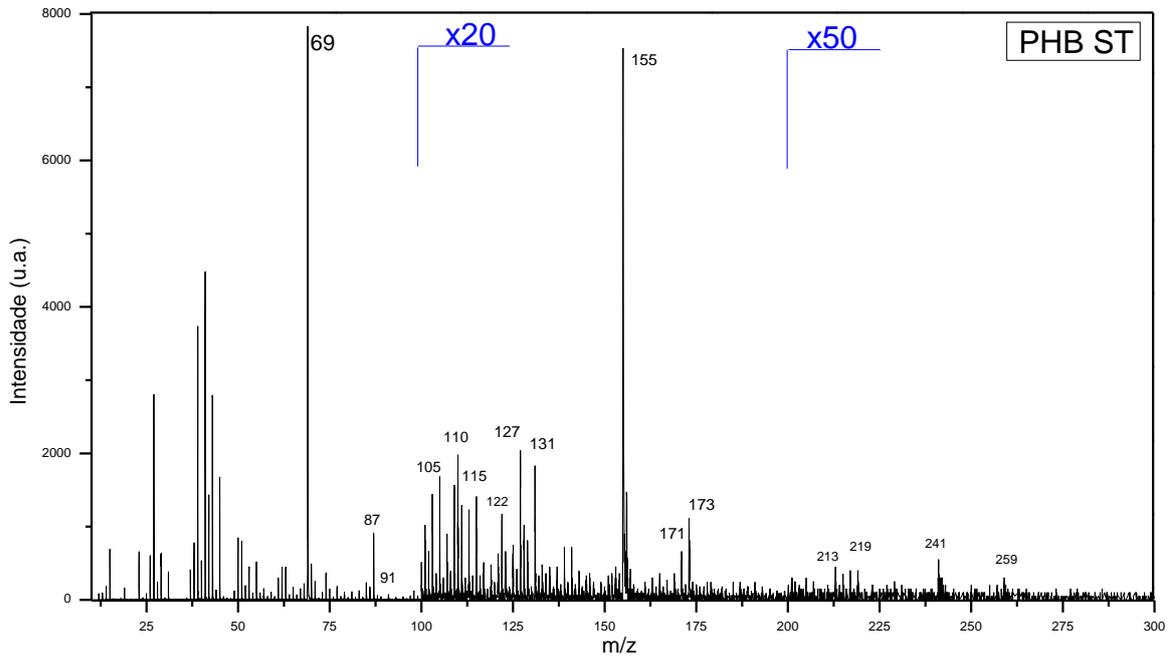


Figura 39: Espectro de íons positivos de PHB ST. Relação m/z de 0-300.

PHB ST mostrou fragmentação típica para este tipo do polímero já visto na literatura em estudos de Davies *et al.* (1989) e Koosha *et al.* (1989) tanto para íons positivos (Fig. 39) quanto para íons negativos (Fig. 40) com os principais valores de m/z mostrados nos espectros.

As fragmentações dos íons positivos e negativos de PHB são mostradas nas Figuras 45 e 46.

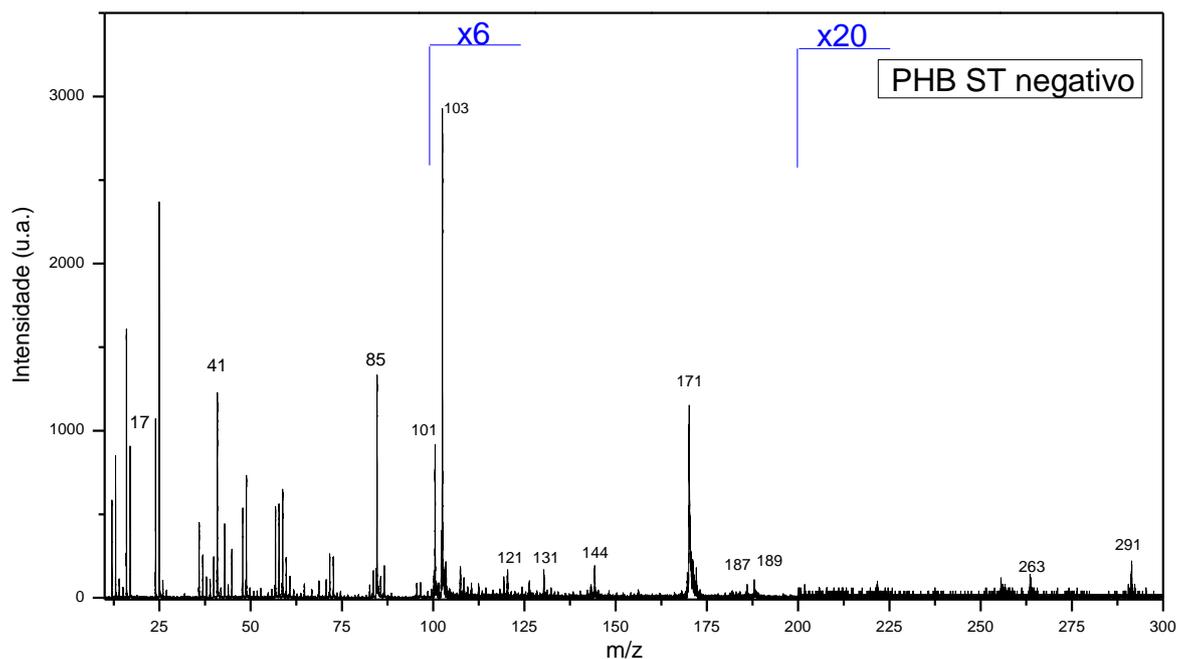


Figura 40: Espectro de íons negativos de PHB ST. Relação m/z de 0-300.

5.9.2 PHB 60' e 180'

Após os tratamentos a fragmentação exibida revela uma discreta diferença, entre os espectros positivos das amostras não tratadas com as amostras tratadas por 60 min e por 180 min (Fig. 41 e 43).

Os valores de m/z 131, 137, 173, 221 e 217 sofrem uma alteração. Estes intervalos de m/z correspondem ao intervalo de fragmentação de duas a três unidades monoméricas mais a adição ou subtração de oxigênio a estas moléculas. Sabe-se pelo mecanismo proposto por Davies *et al.* (1989) que neste polímero o principal sítio de fragmentação é a carbonila. O sítio de funcionalização e interação da radiação UV, como mostrados nas técnicas de análise de superfície anteriores por Kessler *et al.* (2014) é a carbonila, sendo que qualquer modificação neste sítio apresentará mudança na característica de fragmentação da molécula, o que pode ser visto nos espectros apresentados.

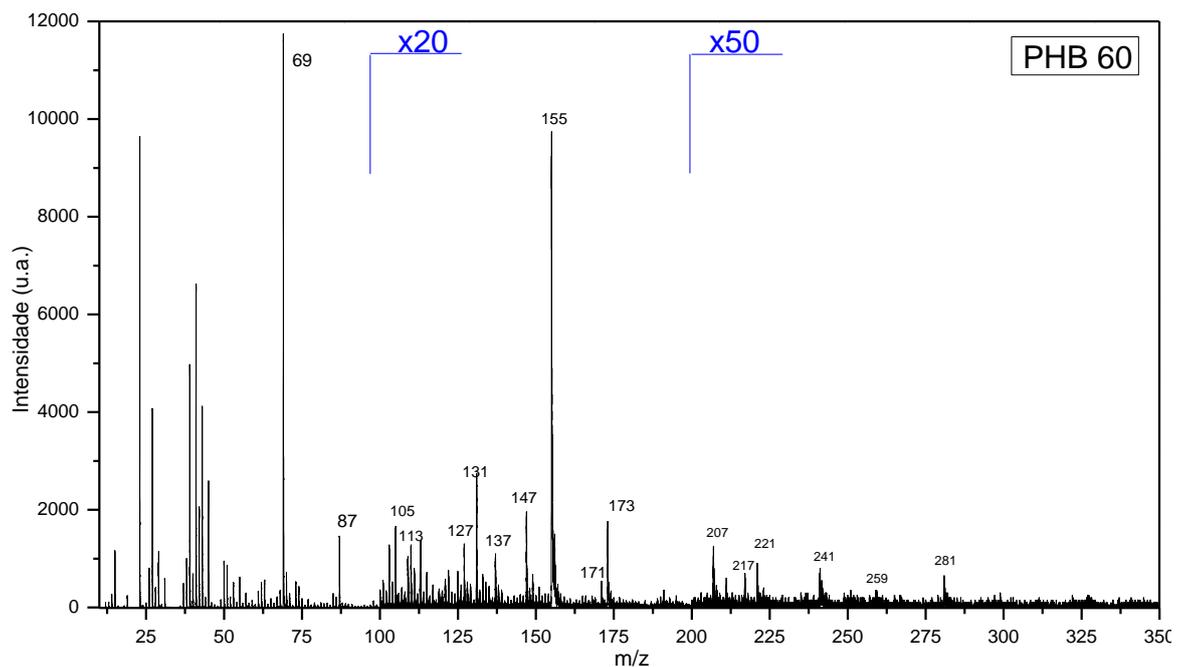


Figura 41: Espectro de íons positivos de PHB 60'. Relação m/z de 0-350.

Como a modificação superficial proposta se baseia na inserção de grupos eletronegativos na superfície, uma maior modificação nos espectros negativos de massa já era prevista. Comparando-se os espectros de massas de íons negativos (Fig. 40, 42 e 44), das amostras sem tratamento com os espectros de massas das amostras tratadas durante 60 e 180 min. pode-se notar grandes diferenças.

Primeiramente, no mecanismo sugerido por Kessler *et. al.* (2014) é assumida uma formação de grupos OH devido aos rearranjos da cadeia polimérica e a inserção de mais oxigênio neutralizando os radicais formados pela excitação da radiação UV. O valor de m/z 17 mostra que a presença de uma concentração de OH na superfície dos filmes tratados é maior que nos filmes não tratados, tanto em 180 min quanto com 60 min de tratamento.

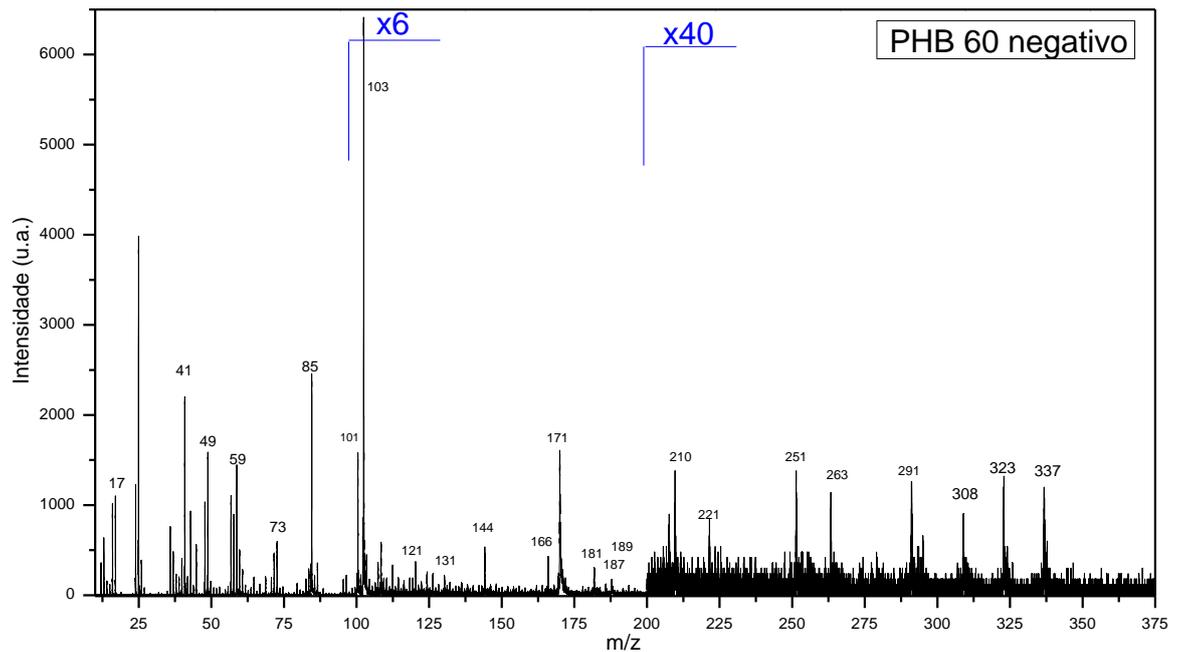


Figura 42: Espectro de íons negativos de PHB 60'. Relação m/z de 0-375.

Os maiores indicadores de mudança de ambiente químico na superfície estão também em intervalos de massas de maiores valores como os picos de m/z: 144, 166, 181. Como salientado anteriormente estes grupos de picos quando presentes ou modificados indicam uma reestruturação molecular na cadeia polimérica, também atribuída à modificação na carbonila ao longo da cadeia.

Ainda sustentando a inserção de grupos oxigenados na superfície dos filmes, há o aparecimento de picos antes ausentes nos polímeros sem tratamento como os picos em valores de m/z de : 251, 221, 210, 308, 322, 336.

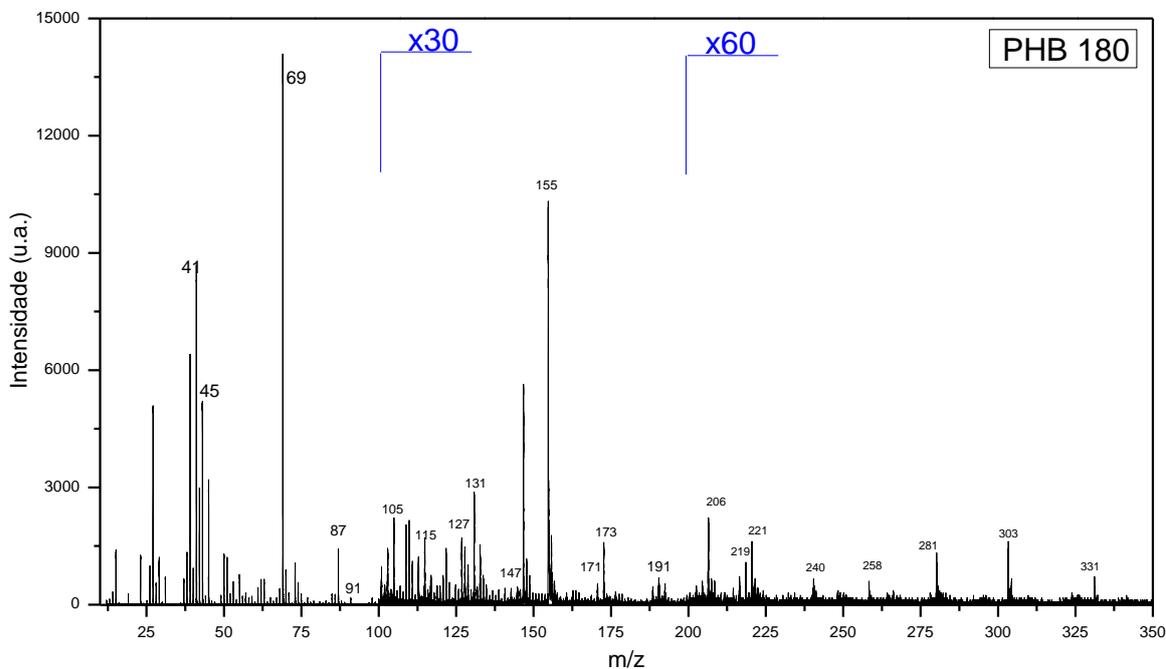


Figura 43: Espectro de íons positivos de PHB 180'. Relação m/z de 0-350.

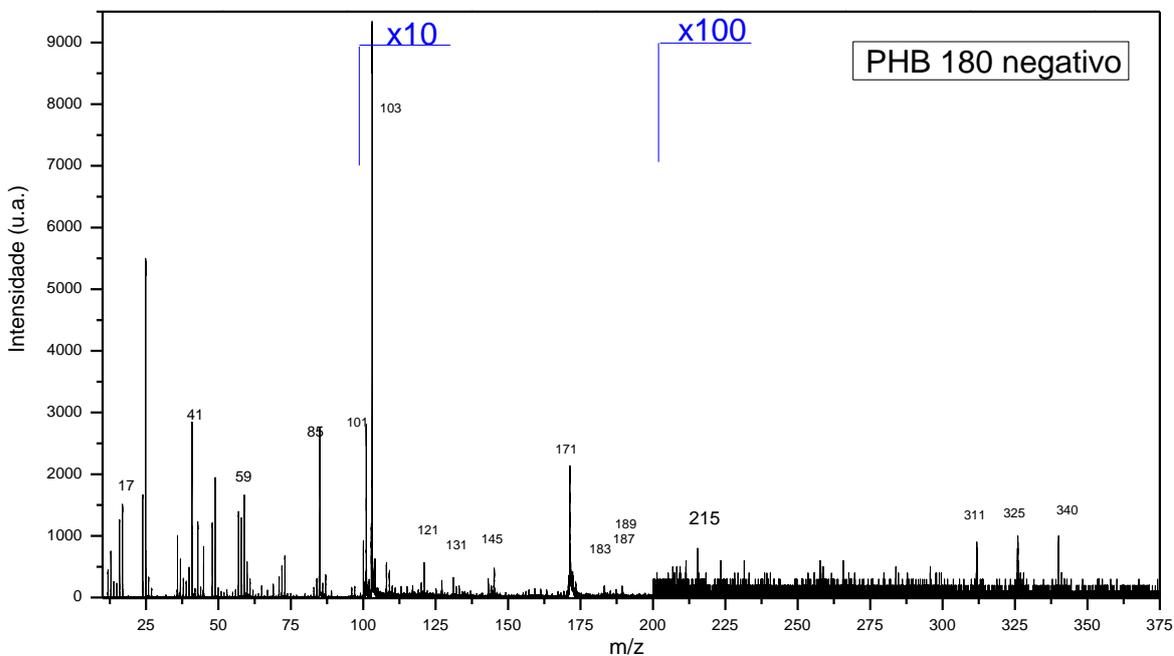


Figura 44: Espectro de íons negativos de PHB 180'. Relação m/z de 0-375.

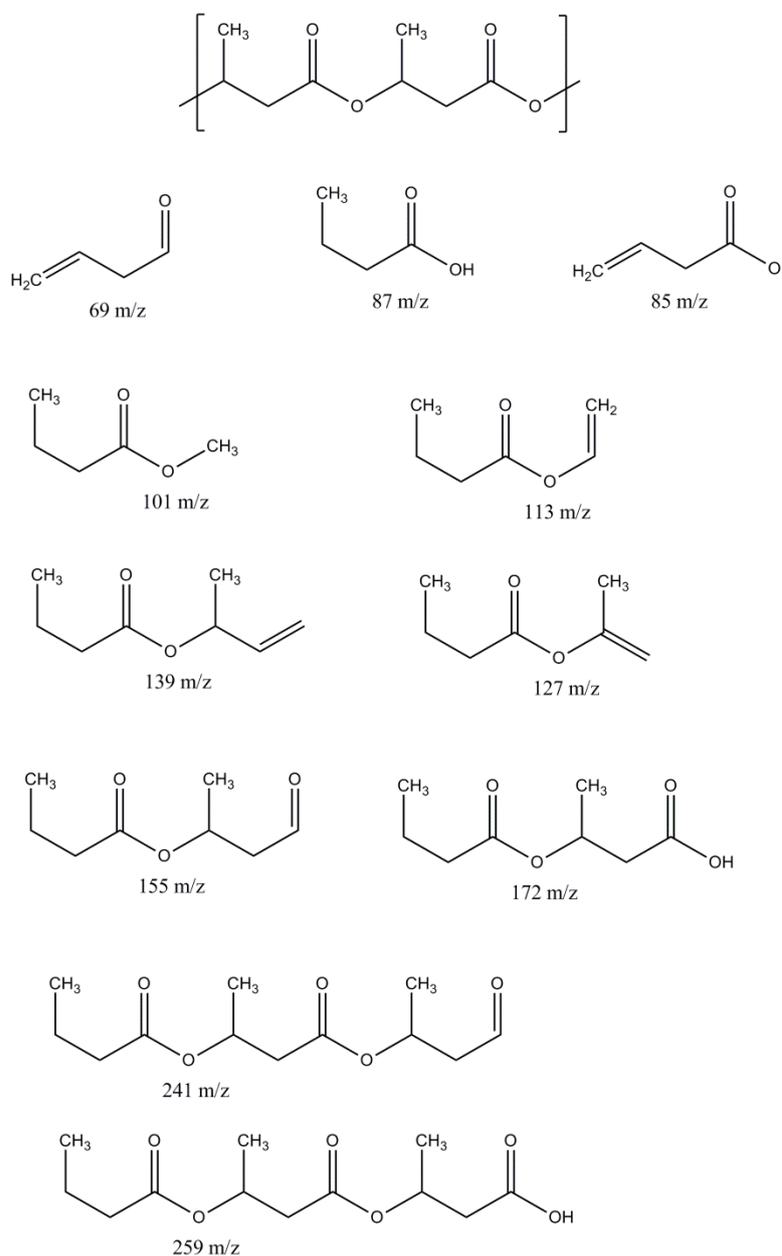


Figura 45: Fragmentos dos íons positivos para PHB.

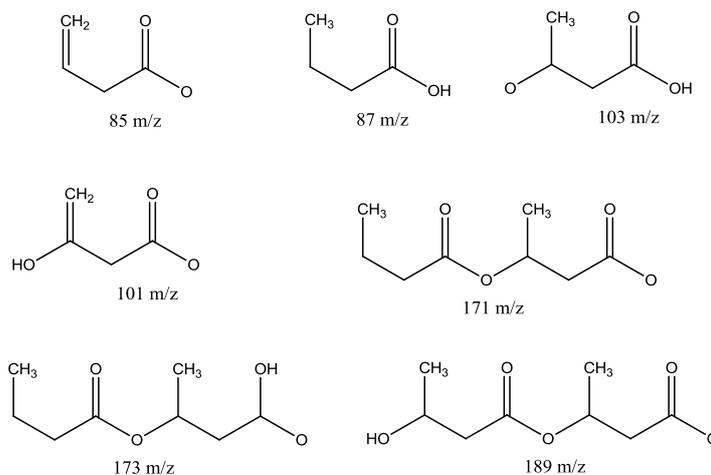


Figura 46: Fragmentos dos íons negativos para PHB.

5.9.3 PHB X CG97

Espectros positivos de PHB ST após a degradação (Fig. 47) mostraram diversas diferenças dos espectros padrões. Pode-se dizer que quando se analisou o espectro antes e após a degradação a fragmentação majoritária foi drasticamente modificada.

Nas amostras antes da degradação, particularmente no intervalo entre 10 e 100 m/z o pico majoritário era de 69 m/z, que corresponde ao monômero de PHB menos um hidrogênio, já nos espectros de mesmo intervalo de m/z após a degradação pode-se citar os picos de 41 m/z, 55 m/z e ainda ver a presença de 70 m/z e 87 m/z. O pico de 55 m/z corresponde a parte não oxigenada do monômero de PHB, ou seja basicamente a parte da molécula que corresponde a estrutura de carbonos e hidrogênios C_4H_7 .

O pico 41 m/z é conhecido como a fragmentação subsequente do íon 55 m/z e corresponde a estrutura C_3H_5 . 70 m/z e 87 m/z são originais dos polímeros, mas aqui aparecem em intensidade bem menor relativa aos picos 55 m/z e 41 m/z. Claramente isto é resultado da degradação pela ação do fungo.

Ao assimilar a parte oxigenada da molécula, os fragmentos remanescentes do polímero irão conter principalmente carbono e hidrogênio, fornecendo o tipo de

fragmentação encontrada. Do mesmo modo, em intervalos de m/z maiores, o consumo de oxigênio da molécula de polímero é evidenciado pela diferença na fragmentação do espectro de massas.

No intervalo de 100 a 200 m/z (Fig. 39), para o polímero sem tratamento antes da degradação, podem-se observar os picos 173 m/z , 155 m/z e 127 m/z , que correspondem a fragmentos de dímeros do polímero que contêm oxigênio na sua estrutura. Após a degradação estes picos não só somem, como dão lugar a uma maior intensidade de picos aos valores de m/z em 111, 113, 125, e 143. Estes picos justamente correlacionam-se com os primeiros citados pela perda de um átomo de oxigênio e um átomo de carbono. Estas alterações observadas não podem ter outra fonte senão a ação metabólica do fungo. Esta mesma tendência pode ser observada nos espectros de íons positivos das amostras pós-degradação de PHB 60' e PHB 180'.

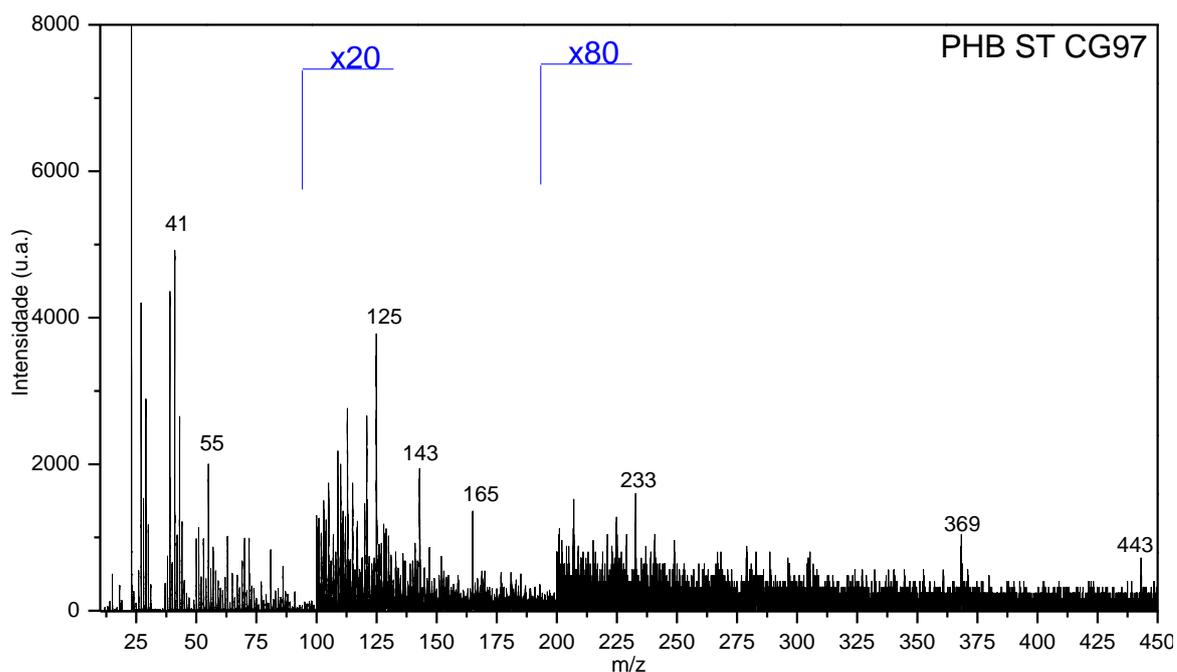


Figura 47: Espectro de íons positivos de PHB ST. Relação m/z de 0-450.

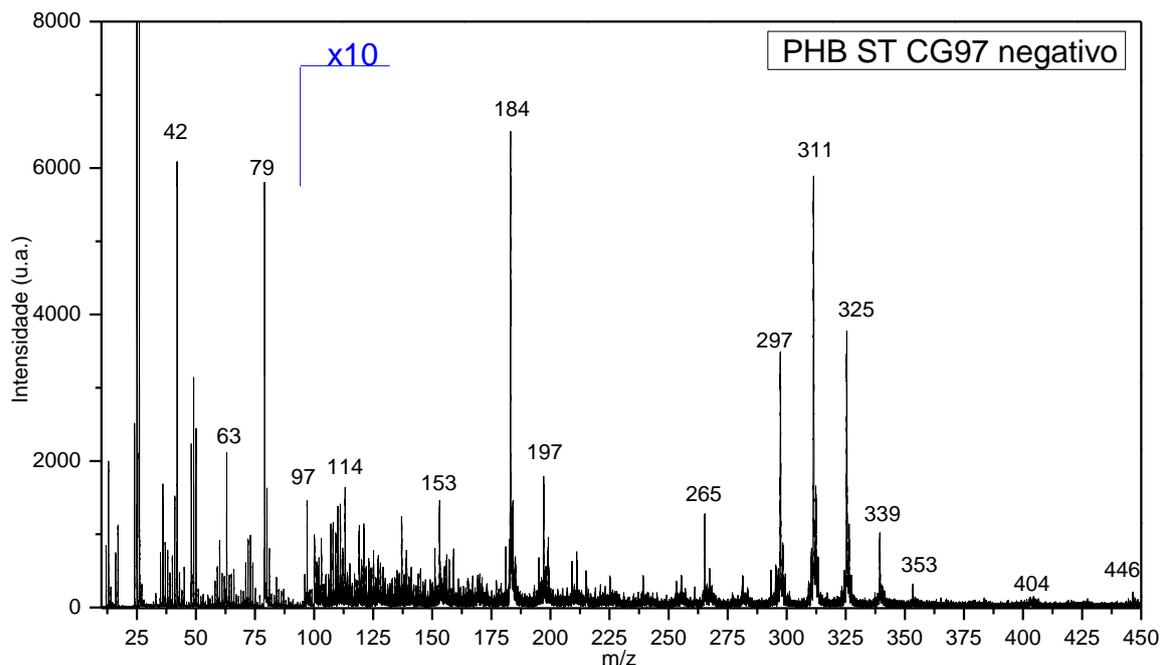


Figura 48: Espectro de íons negativos de PHB ST. Relação m/z de 0-450.

No espectro de massas de íons negativos da amostra PHB ST (Fig.48) pós-degradação, houve uma grande diferenciação do espectro original.

Primeiramente houve uma grande redução do íon 41 e 40 m/z. Estes íons são atribuídos aos grupos C_2O^- e C_2OH^- , respectivamente.

O íon 85 m/z, atribuído ao monômero do PHB, sofreu grande redução e pode-se notar a intensidade de íons 42 m/z, 50 m/z, 79 m/z e 97 m/z. Estes íons não são representativos de nenhum fragmento do PHB, mesmo não tratado e a literatura traz como íons que contém átomos de nitrogênio (42 m/z, 50 m/z, 79 m/z) ou SO_3 (97 m/z). Estes elementos não são originais da estrutura do polímero.

Ainda pode-se destacar a presença dos íons negativos 197 m/z, 184 m/z, 297, 311, 328, 339, 404 e 446, que também não pertencem a qualquer fragmento do polímero.

A presença de compostos nitrogenados, sulfurados e ainda fragmentações de relativa intensidade a valores de m/z maiores, além da baixa intensidade de picos relativos ao polímero, sugerem que os espectros de íons negativos mostram uma superfície totalmente diferente da original, que foi submetida a uma extrema degradação ou então como o recobrimento de compostos de diferentes características químicas do polímero, fornecendo espectros de massas com

características totalmente diferente dos espectros de massas das amostras não submetidas à degradação.

Estas mesmas características no espectro de massas de íons negativos, foram encontradas também no espectro de massas da amostra PHB 180' submetida à degradação do CG97.

O espectro de íons negativos da amostra de PHB 60' (Apêndice) submetida à degradação do CG97 demonstrou similar fragmentação nos intervalos de menor valor de m/z . Porém a valores maiores de m/z há importantes diferenças das demais amostras, como a menor intensidade de íons de valor de m/z acima de 300 e fragmentação similar ao polímero sem tratamento no intervalo de m/z entre 100 e 300. Porém há baixa intensidade do pico em 171 m/z e 103 m/z , que sugerem o mesmo comportamento observado para o polímero sem tratamento e tratado por 180'(Apêndice).

5.9.4 PHB x E6

Para os espectros de íons positivos das amostras sem tratamento degradadas pela linhagem E6 (Fig.49), foi observado o mesmo comportamento de redução dos picos de fragmentação das amostras submetidas à degradação pela linhagem CG97.

Há uma pequena diferença nas intensidades do pico de 69 m/z e 87 m/z , porém ainda assim os picos majoritários no espectro positivo são os picos 41 m/z e 55 m/z .

O mesmo pode-se dizer para intervalos de m/z maiores, onde a fragmentação está presente do mesmo modo que as amostras degradadas por CG97, porém ainda podem-se notar alguns picos de fragmentação originais do polímero em maior intensidade como os ressaltados em 155, 127 e 144. Os picos em 211 m/z 245 m/z e 284 m/z diferem-se das amostras degradadas por CG97 e da amostra padrão.

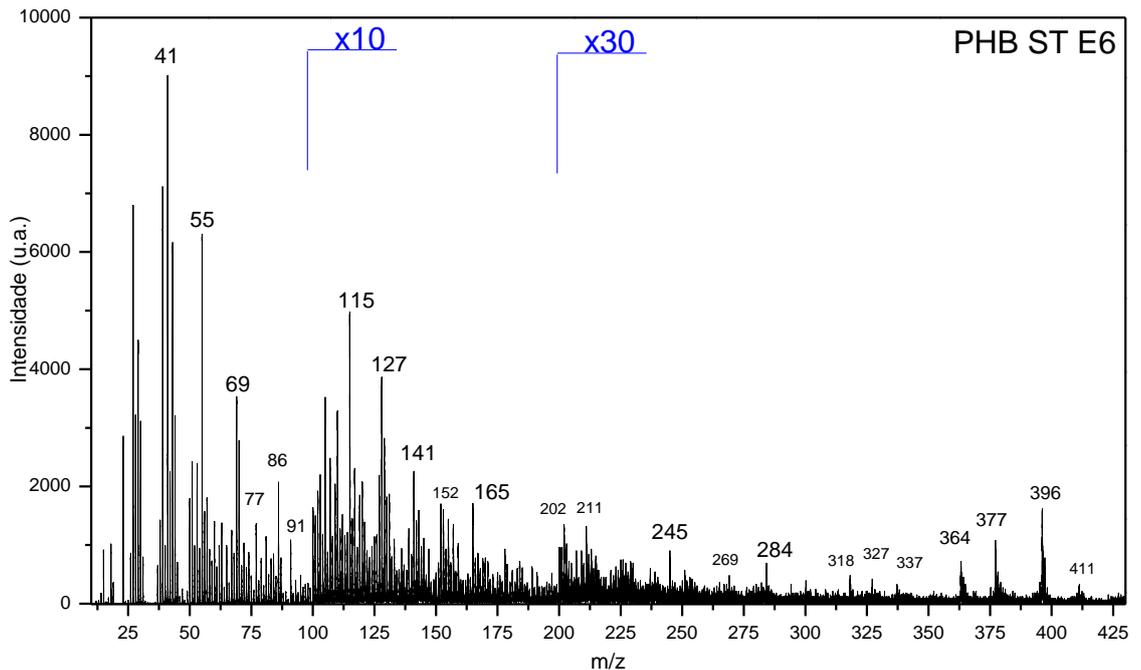


Figura 49: Espectro de íons positivos de PHB ST. Relação m/z de 0-425.

Observa-se também uma significativa intensidade dos picos acima de 300 m/z, como 318 m/z, 364 m/z, 377 m/z e 411 m/z. Novamente aqui picos de valores de massa mais elevados podem indicar a presença de metabólitos deixados pelo fungo durante o processo de biodegradação.

O espectro de íons negativos das amostras de PHB ST degradadas por E6 (Apêndice) seguem a mesma tendência mostrada antes nas amostras degradadas por CG97, mas como visto anteriormente no espectro positivo, alguns picos característicos da fragmentação do polímero permanecem, mesmo que em menor intensidade.

Esta tendência segue para os demais picos, onde vê-se remanescentes de picos do polímero original em menor intensidade, somados a picos observados para o polímero degradado por CG97.

Devido às condições de análise não se pode ir além de uma comparação qualitativa. O que se pode afirmar é que as fragmentações encontradas nas amostras sem tratamentos submetidas à degradação de E6 são uma soma de fragmentações do polímero padrão e os possíveis metabólitos também presentes na degradação do CG97.

Os espectros de íons positivos das amostras PHB 60' degradadas pela linhagem E6 (Apêndice) mostraram a mesma tendência que as amostras sem tratamento degradadas pela mesma linhagem. Há a presença dos mesmos picos encontrados anteriormente, porém neste caso há uma maior contribuição da fragmentação do polímero. Os principais picos da fragmentação do polímero podem ser vistos juntamente com os novos picos encontrados nas amostras que foram degradadas anteriormente, porém em maior intensidade.

Mesmo assim pode-se ressaltar que há um aumento de intensidade do pico 41 m/z em relação ao pico 69 m/z, além da grande redução de intensidade do pico em 87 m/z. Esta tendência também é observada para os espectros de íons negativos para esta série de amostras.

Há a presença forte dos sinais de fragmentação do polímero como em 41 m/z, 49 m/z, 85 m/z, 101 m/z, 103 m/z, 121 m/z, 145 m/z, 171 m/z, 210 m/z, 221 m/z, e 241 m/z. Em menor intensidade, os íons encontrados nos espectros degradados por CG97 aparecem nesta série como: 50 m/z, 63 m/z, 79 m/z, 183 m/z, 297 m/z, 283 m/z, 267 m/z, 255 m/z.

Ainda mais interessante é que os picos em m/z maiores que 300 (Fig. 50), mantêm-se como se na amostra não houvesse degradação significativa. Os picos em 311 m/z, 325 m/z e 339 m/z, são comuns na amostra padrão de PHB 60', porém quando submetido à degradação por CG97 esses picos quase não são mais detectados, ao contrário do que se observa para E6 onde esses picos se mantêm. Isto pode indicar uma baixa degradabilidade do polímero pela linhagem E6.

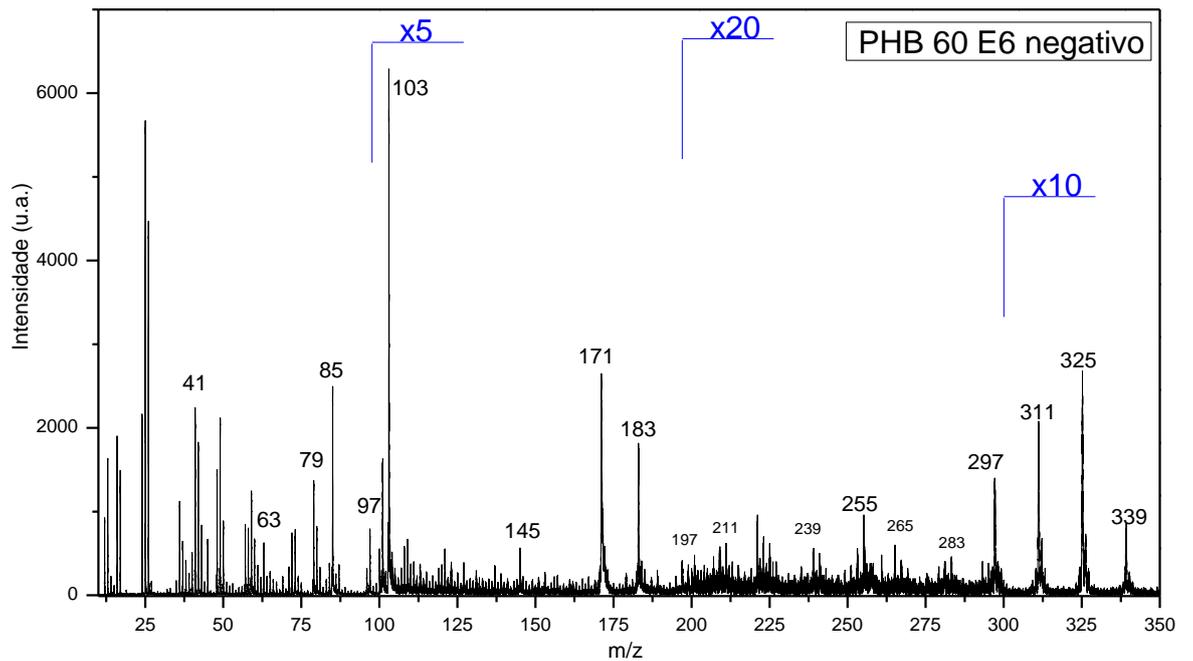


Figura 50: Espectro de íons negativos de PHB 60'. Relação m/z de 0-350.

Seguindo a mesma tendência da degradação com CG97, os espectros de íons positivos (Fig. 51) das amostras de PHB 180' degradadas por E6 mostram um perfil de fragmentação bem diferenciada das amostras de PHB 180' padrão.

O pico em 69 m/z decresce fortemente de intensidade e este comportamento se estende a todos os fragmentos que se atribui presença de oxigênio. Em contrapartida os fragmentos não oxigenados sofrem um acréscimo.

Ainda pode-se observar que para os intervalo de 200-300 m/z onde a maior parte dos fragmentos correspondem a trímeros e tetrâmeros do polímero (com muito oxigênio) praticamente não há detecção, restando apenas sinais de ruído. Ainda pode-se ressaltar o grande decréscimo de sinal em 155 m/z e o aparecimento de 184m/z e 165m/z.

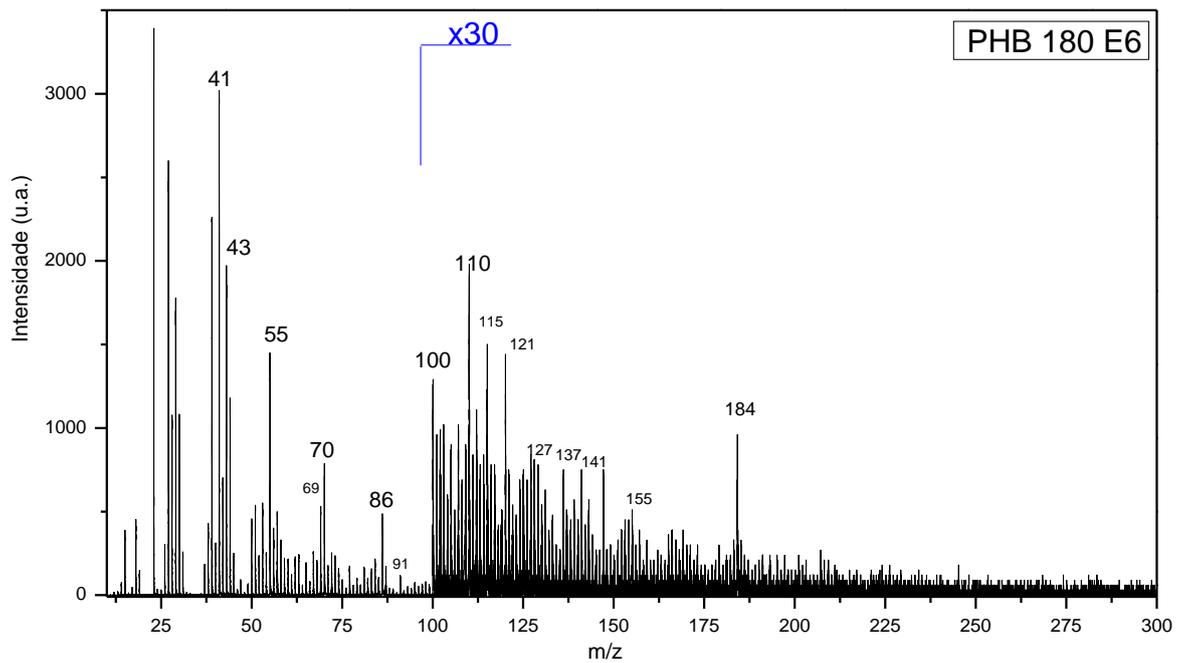


Figura 51: Espectro de íons positivos de PHB 180'. Relação m/z de 0-300.

Os espectros de íons negativos (Fig.52) para esta série de amostras complementam os dados de espectros de íons positivos. Os sinais antes observados que se sugere serem metabólitos ou mesmo resultado da degradação do polímero seguem aparecendo em maior intensidade do que nos espectros das amostras degradadas com CG97, com especial destaque para o intervalo de 200-300 m/z onde nota-se o aparecimento de alguns picos diferenciados como 267 m/z, 261m/z e 255 m/z. Ainda cabe ressaltar que os picos acima de 300 m/z mantêm-se nos mesmos valores que o PHB 180' degradado por CG97, porém em intensidade muito menor.

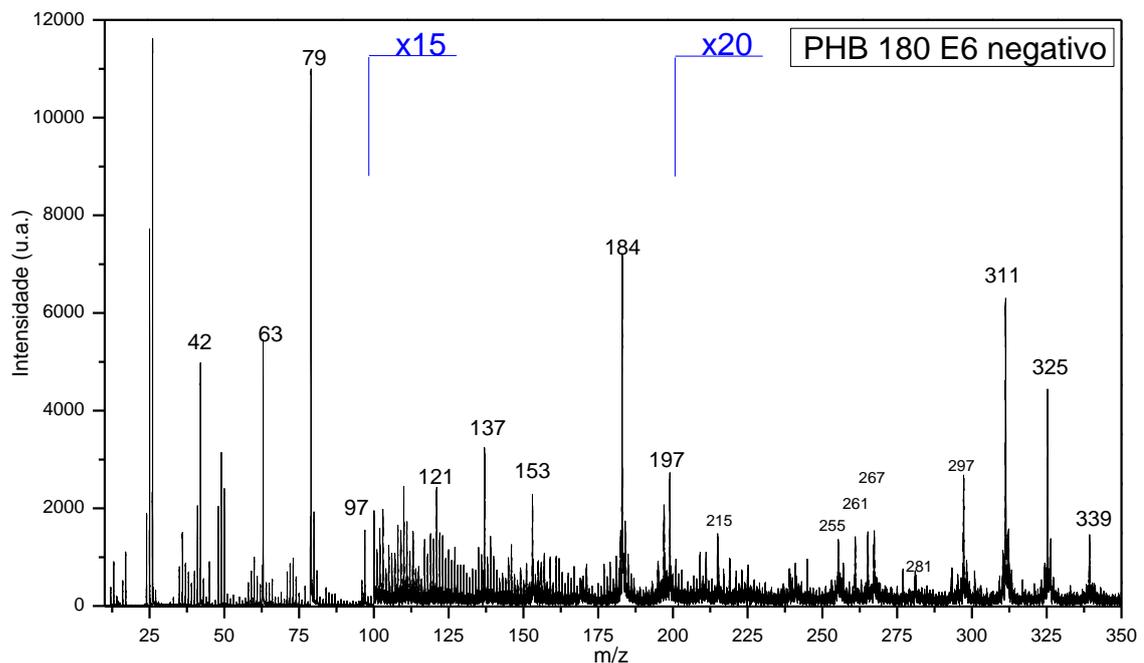


Figura 52: Espectro de íons negativos de PHB 180'. Relação m/z de 0-350.

Como a técnica possui extremo controle e precisão, e o feixe de íons primários aplicado possui um foco muito pequeno, é possível também avaliar os íons presentes na superfície dos polímeros através de imagens, optando por esta configuração nos dados adquiridos (Fig. 53).

Esta imagem é uma composição de intensidade de cores localizada em um ponto no espaço bidimensional. Quando se possui o mesmo conceito, porém ao invés de cores, usa-se íons, quanto mais escuro é o tom da cor, menor é a quantidade do íon presente naquela superfície.

Na imagem abaixo (Fig. 53) se pode descrever em (A) como a imagem de íons totais onde todos os íons que foram detectados estão representados. Pode-se notar marcas no polímero sobre as quais é possível dizer que estas são resultado de uma menor intensidade de íons naquela área. No quadro B, tem-se imagem apenas do íon 69 m/z, que corresponde à fragmentação do monômero menos um átomo de oxigênio. Pode-se reparar que há uma menor intensidade (cores tendendo ao vermelho) de íons localizados próximos a estruturas que lembram hifas. Não há hifas presentes nesta imagem.

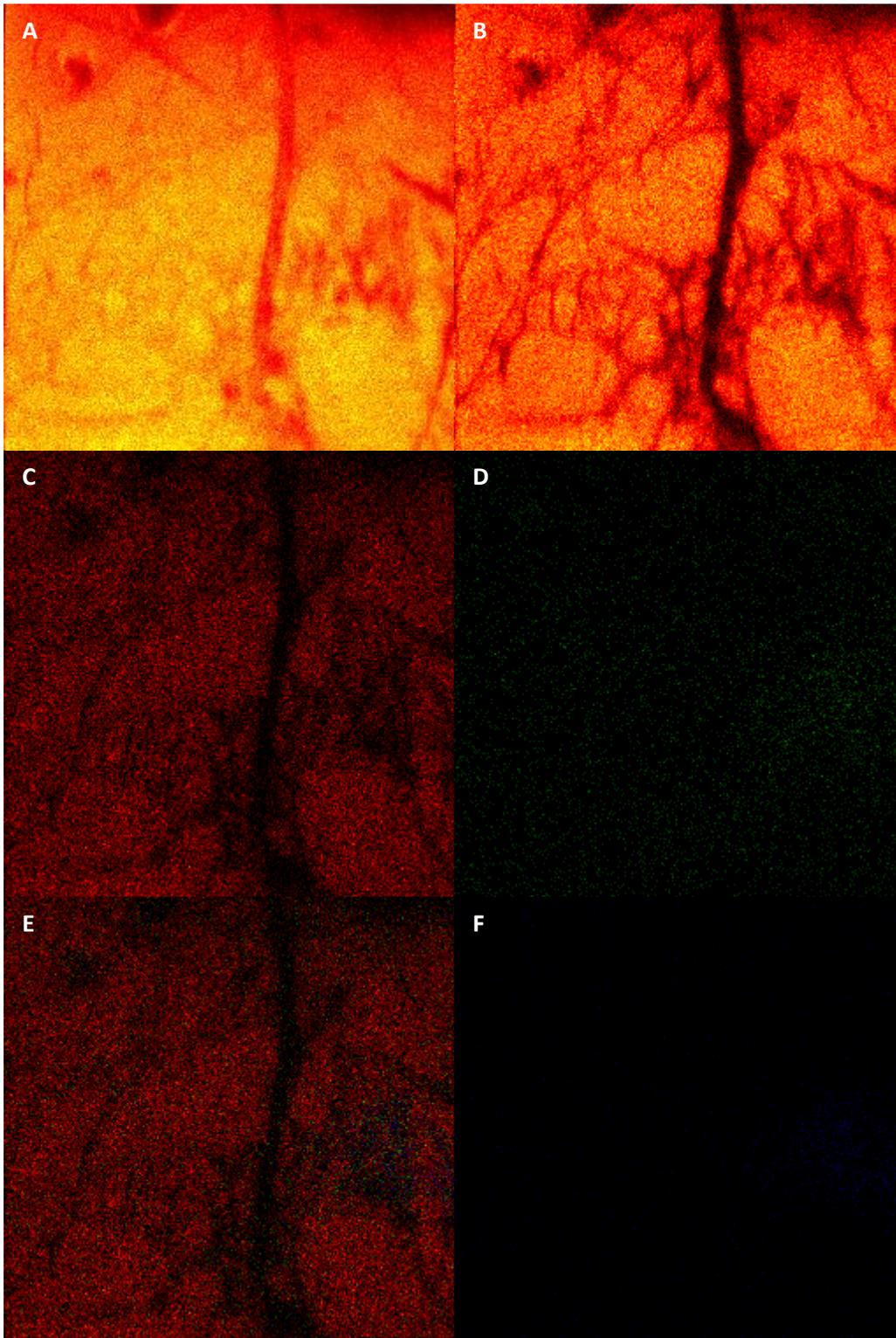


Figura 53: Imagem de ToF-Sims de PHB 60' X E6. A) Ions totais. B) 69 m/z. C) 155 m/z. D) 215 m/z. E) 69+155+297 m/z. F) 297m/z.

A fragmentação da quitina, correspondente a parede celular do fungo, não foi encontrada. Estas estruturas são marcas na superfície polimérica, e pela

menor intensidade de íons gerados, pode-se dizer que há uma menor concentração destas espécies no polímero, ou seja que foram consumidas exatamente onde uma hifa do fungo estava aderida. O mesmo pode ser visto em C, onde o íon 155 m/z corresponde ao dímero do polímero menos um átomo de oxigênio. As imagens D e F correspondem aos íons 215 m/z e 297 m/z que originalmente não são fragmentos do polímero em questão. Além de sua baixa concentração, pode-se observar que na sobreposição das imagens C, D e F, resultando na imagem E, há a clara presença destes possíveis metabólitos nos caminhos de hifa.

Os dados referentes à incubação em água e aos demais polímeros descritos neste trabalho ainda estão sendo processados.

5.10 Proteínas

Sabe-se que a clivagem de cadeias poliméricas durante o processo de biodegradação é realizada por enzimas. As enzimas extracelulares são responsáveis por esta clivagem. Estas enzimas podem ser endo ou exo-enzimas e tem importância vital para fungos filamentosos, porque na natureza eles prosperam em polímeros orgânicos que devem ser degradados de forma extracelular (Wessels, 1993 e Grima *et al.*, 2000). Então, para identificar proteínas relacionadas aos processos de degradação de PHB, PSU e PU, foram realizados cultivos líquidos para obtenção dos micélios.

Os cultivos foram mantidos por 10 dias em agitação (150 rpm) o que permitiu que houvesse adesão do fungo ao polímero PSU (Fig. 54 A), e em seguida os polímeros foram retirados destes cultivos e os micélios removidos (Fig. 54 B) para análises proteômicas.

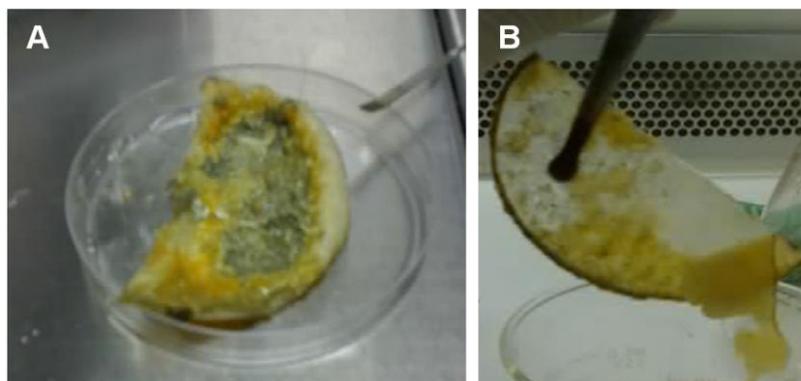


Figura 54: Aparência do polímero após 10 dias de cultivo. A) Micélio aderido ao polímero. B) Remoção do micélio. PSU X CG97.

Após a remoção e liofilização destes micélios, as proteínas foram extraídas, quantificadas e migradas em géis SDS-PAGE. Seguido a migração foi realizada a coloração e excisão das bandas para identificação das proteínas (Fig.55).

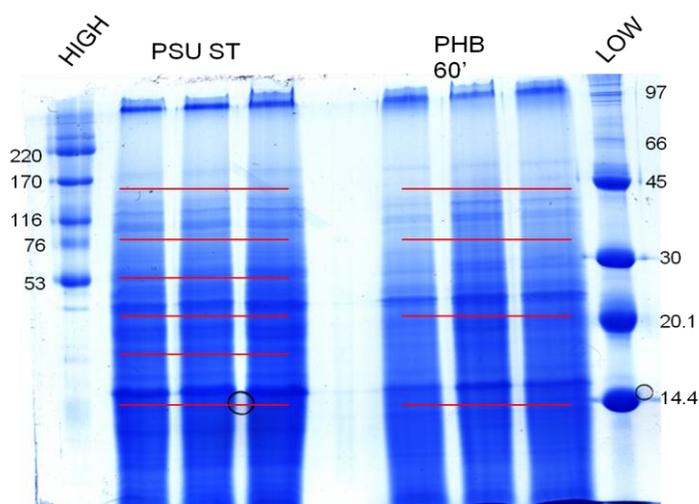


Figura 55: Gel unidimensional mostrando bandas das proteínas de maior concentração nas amostras. Cultivos de 10 dias com a linhagem E6. HIGH- marcador de alto peso molecular e LOW- marcador de baixo peso molecular.

Quando os géis foram migrados se observou um mínimo de três bandas majoritárias, mas em alguns casos, com no da Figura 55 mais bandas foram identificadas.

As Figuras 56 e 57 foram geradas a partir dos códigos das proteínas obtidos através do *software* MASCOT, uma vez que estas não foram identificadas.

A linhagem CG97 foi testada para degradar PHB e PU. (Fig.56)

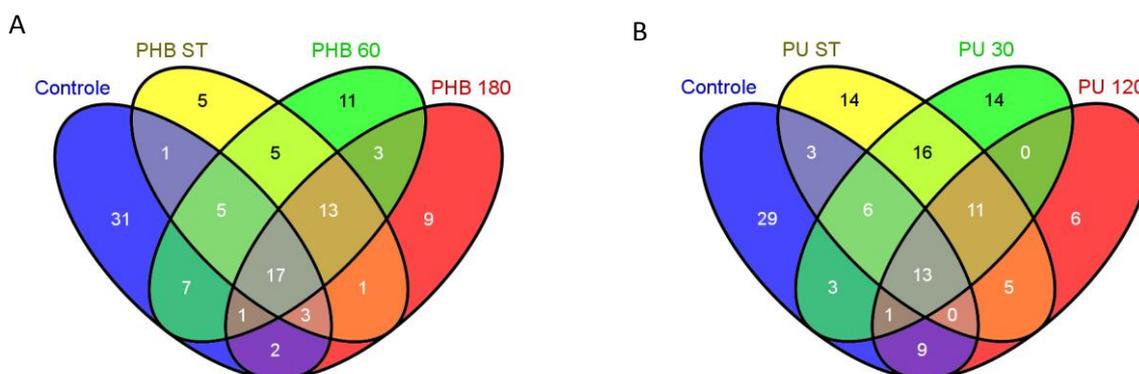


Figura 56: Proteínas secretadas pela linhagem CG97. A) CG97 Controle, CG97 X PHB ST/ PHB 60' / PHB 180'. B) CG97 Controle, CG97 X PU ST/ PU 30' / PU 120'.

Nestas condições de cultivo pode-se observar que 17 proteínas são compartilhadas entre todas as condições de cultivo para PHB, enquanto que para PU tem-se 13 proteínas comuns. Uma quantidade considerável de proteínas é reprimida quando há a inserção de PHB no meio de cultura, o que não é observado em PU onde a diminuição é de menor relevância, isto em comparação a situação controle.

Quando se compara as situações de proteínas em comum entre as condições observa-se um padrão semelhante nos dois polímeros, exceto para PU ST e PU 120 onde não houve nenhuma proteína em comum.

A linhagem E6 foi testada para degradar PHB e PSU e a mesma análise foi realizada (Fig.57).

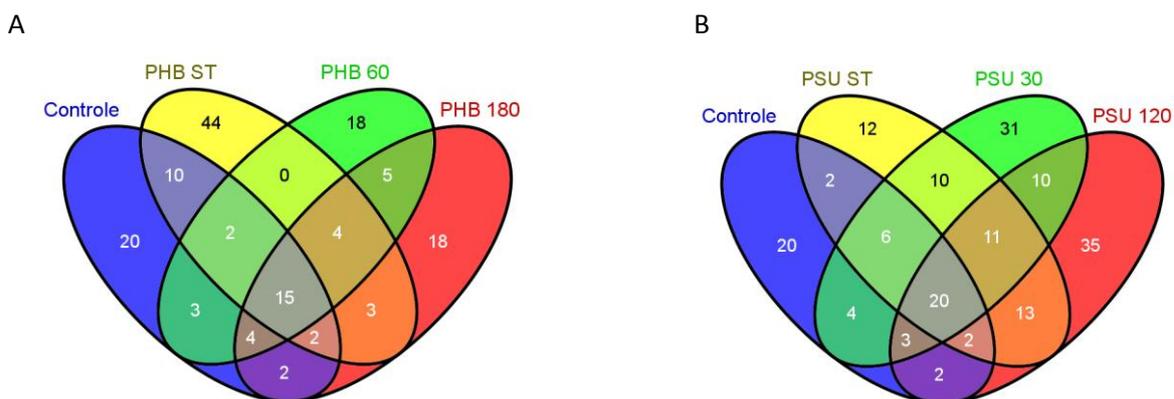


Figura 57: Proteínas secretadas pela linhagem E6. A) E6 controle, E6 X PHB ST/ PHB 60'/ PHB 180'. B) E6 controle, E6 X PSU ST/ PSU 30'/ PSU 120'.

Quando os cultivos foram realizados utilizando a linhagem E6 tem-se 15 proteínas compartilhadas entre todas as condições para PHB e 20 proteínas compartilhadas para PSU.

Ao contrário da linhagem CG97 tem-se uma menor repressão na expressão das proteínas na condição de contato com o polímero e uma indução na expressão destas quando incubadas com PHB ST. Da mesma maneira, PU parece reprimir a expressão de proteínas, enquanto PSU tem uma leve diminuição na condição PSU ST, e uma indução da expressão nas condições PSU 30' e PSU 120'.

As proteínas que aparecem como exclusivas em cada cultivo estão relacionadas a metabolismo celular, pois foram identificadas em sua maioria como Proteína Ribossomal das unidades 40S (MA08184, MA18089, MA08275), 30S (MA15468) e 60S (MA18178, MA12937), Endonucleases (322703828), Glicerol quinase (MA23974), Histona H2B (MA15521), Fator de alongação (MA04713, MA16480, MA07218) entre outras.

Dentre as proteínas compartilhadas entre os diferentes cultivos devem estar as proteínas que estariam atuando na degradação destes polímeros. Foi possível identificar duas proteínas que provavelmente estariam envolvidas neste processo, uma Peroxidase/catalase (322695874) e uma Aldeído desidrogenase (322701855, 322693884).

Segundo Lucas *et al.* (2008) micro-organismos podem usar diferentes “modi operandi” para clivar polímeros, seja secretando enzimas ou gerando radicais livres. Algumas enzimas extracelulares, em particular as peroxidases, são hábeis para atuar na degradação de hidrocarbonetos. Pedrini *et al.* (2006) sugerem que em fungos a catalase peroxissomal poderia estar envolvida no catabolismo de hidrocarboneto de insetos, podendo então assim atuar também como uma enzima chave na degradação de polímeros.

Durante os tratamentos superficiais e os processos de degradação é possível que surjam grupamentos do tipo aldeídos, permitindo então a ação da enzima aldeído desidrogenase acelerando ou melhorando o processo degradativo. Estas enzimas são capazes de metabolizar uma ampla gama de aldeídos endógenos ou exógenos (Sophos & Vasiliou 2003).

Levando-se em consideração a quantidade de proteínas identificadas pode-se deduzir que muitas delas podem e devem estar envolvidas na degradação de polímeros, porém não foi possível realizar esta identificação, pois o banco de dados (Plataforma SABIA) onde estão depositadas estas proteínas está passando por um processo de atualização tornando assim inviável a busca. Toda identificação e processamento destes dados serão realizados assim que o banco estiver totalmente atualizado.

Resumidamente, então, o que se pode observar é que ambas as linhagens de *M. anisopliae* são totalmente capazes de se desenvolver sobre o polímero natural PHB, mostrando um crescimento maior quando incubadas em MCM. Isto é válido para polímeros com e sem tratamento.

Embora as linhagens tenham crescimentos semelhantes quando observada por microscopia demonstram comportamentos distintos em relação gravimetria. CG97 é capaz degradar com maior eficiência PHB 60' e PHB ST, enquanto E6 degrada PHB 180'.

Quando foram realizadas as análise de superfície como FTIR-ATR e Tof-Sims pode-se observar que as linhagens retomam o comportamento inicial de similaridade. Em FTIR-ATR as bandas detectadas tanto para a linhagem E6 quanto para CG97 são as mesmas exceto pela banda 2850 cm^{-1} – característica de fungos - que está presente nos polímeros degradados por CG97 e não por E6.

Isto pode ter acontecido pelo fato de que a linhagem CG97 tem uma aderência maior nos polímeros tornando a lavagem menos eficiente.

A banda 1309 cm^{-1} que também está presente em todos os espectros é uma das bandas que demonstra o processo de hidrólise, pois no momento em que ocorre a remoção do oxigênio ocorre um rearranjo na molécula fazendo que esta banda se torne mais expressiva. Isto foi observado em polímeros tratados e não tratados.

Da mesma maneira acontece com Tof-Sims, onde o comportamento das duas linhagens é de extrema semelhança. Tanto para E6 quanto para CG97 observa-se nos espectros positivos a diminuição de intensidade do pico 69 m/z característico do monômero de PHB ST contendo oxigênio e o aumento principalmente do pico 55 m/z que demonstram a cadeia polimérica com a ausência do oxigênio corroborando com os dados de FTIR-ATR que mostram a perda do oxigênio pelo aumento da banda 1309 cm^{-1} .

Para PHB 60' e PHB 180' observa-se antes da degradação os fragmentos 173 , 155 e 127 m/z que correspondem a fragmentação de dímeros contendo oxigênio deixando de existir após a incubação com ambas as linhagens surgindo então os picos 111 , 113 , 125 e 143 m/z que correspondem aos mesmos fragmentos, porém sem a presença do oxigênio, confirmando novamente o que observado por FTIR-ATR segue o mesmo comportamento do polímero não tratado.

Nos espectros de íons negativos observou-se uma grande redução do íon 85 m/z que é característico do monômero de PHB e um aumento nos íons 42 , 50 , 79 e 97 m/z que são íons descritos por conter átomos de nitrogênio associado, o que foi observado também por FTIR-ATR através das bandas 3300 e 1525 cm^{-1} .

Já em PHB 60' X E6 houve uma grande diferenciação em comparação a PHB 60' X CG97, nos picos que estão no intervalo de 300 a 400 m/z nesta amostra. Quando incubado com E6 estão presentes os íons 311 , 325 e 339 m/z ao contrário de CG97 onde estes picos não estão presentes, isto indica a baixa degradabilidade desta linhagem. Isto também pode ser observado através das análises de gravimetria onde PHB E6 foi capaz de degradar mais eficientemente o polímero tratado por 180 min .

Por Tof-Sims foi possível observar uma superfície totalmente diferente da superfície original provavelmente pelo processo de degradação e também pelos possíveis metabolitos deixados na superfície pelo fungo.

Pelas análises proteicas foi possível observar a secreção de duas proteínas que provavelmente estão envolvidas na degradação destes polímeros uma peroxidase/catalase e uma aldeído desidrogenase, elas estão presentes em todos os cultivos com polímeros e foram secretadas pelas duas linhagens.

A proteína aldeído desidrogenase sugere que com a quebra das cadeias e abstração de oxigênio pelos processos de hidrólise, no caso de PHB, pode haver formação de grupos aldeídos justificando a presença desta enzima.

Embora, ainda, não tenha sido possível analisar os dados referentes os polímeros de fontes não renováveis por Tof-Sims, acredita-se que eles sigam a mesma tendência de PHB para o processo de degradação, uma vez que as análises por FTIR-ATR tiveram o mesmo comportamento. Após a análise destes dados poderá ser afirmado que o processo é o mesmo.

6. Conclusão

- *Metarhizium anisopliae* é capaz de acelerar a degradação de polímeros naturais e de degradar polímeros advindos de fontes não renováveis.

- A linhagem CG97 possui uma maior capacidade de adesão quando comparada a E6. Dados de gravimetria demonstram que polímeros incubados com CG97 tem um ganho de massa mais elevado.

- Pelos dados obtidos por FTIR-ATR e Tof-Sims foi possível observar que a degradação aconteceu principalmente nos grupamentos que foram inseridos ou modificados por esses tratamentos.

- Tof-Sims mostrou uma superfície totalmente diferente da original, pois os tratamentos empregados baseiam-se na inserção de grupamentos oxigenados (CO, COO, COH) na superfície e isto torna estas superfícies mais suscetíveis ao ataque enzimático.

Apêndice

Sumário:

Tabela 1: Valores de números de onda dos máximos de bandas e picos dos Espectros de Infravermelho de PHB ST x CG97 (cm ⁻¹).....	105
Figura 1: Espectro de Infravermelho de PHB ST X G97.....	106
Tabela 2: Valores de números de onda dos máximos de bandas e picos dos Espectros de Infravermelho PHB 60' X CG97 (cm ⁻¹).....	106
Figura 2: Espectro de Infravermelho de PHB 60' X CG97.....	108
Tabela 3: Valores de números de onda dos máximos de bandas e picos dos Espectros de Infravermelho de PHB 180' X CG97 (cm ⁻¹).....	108
Figura 3: Espectro de Infravermelho de PHB 180' x CG97.....	109
Figura 4: Espectro de Infravermelho de PU Controle.....	109
Tabela 4: Valores de números de onda dos máximos de bandas e picos dos Espectros de Infravermelho de PU ST X CG97(cm ⁻¹).....	110
Figura 5: Espectro de Infravermelho de PU ST X CG97.....	111
Tabela 5: Valores de números de onda dos máximos de bandas e picos dos Espectros de Infravermelho de PU 30' X CG97 (cm ⁻¹).....	111
Figura 6: Espectro de Infravermelho de PU 30' X CG97.....	112
Tabela 6: Valores de números de onda dos máximos de bandas e picos dos Espectros de Infravermelho de PU 120' X CG97(cm ⁻¹).....	112
Figura 7: Espectro de Infravermelho de PU 120' X CG97.....	113
Figura 8: Espectro de íons positivos de PHB 60'.....	114
Figura 9: Espectro de íons negativos de PHB 60'.....	114
Figura 10: Espectro de íons positivos de PHB 180'.....	115
Figura 11: Espectro de íons negativos de PHB 180'.....	115
Figura 12: Espectro de íons negativos de PHB ST.....	116
Figura 13: Espectro de íons positivos de PHB 60'.....	116

7. Apêndice

FTIR-ATR

Tabela 1: Valores de números de onda dos máximos de bandas e picos dos espectros de infravermelho de PHB ST x CG97 (cm^{-1}).

Controle	H ₂ O - 10 DIAS	COVE - 10 DIAS	H ₂ O - 20 DIAS	COVE - 20 DIAS
	3600-3100	3600-3100	3600-3100	3600-3100
2995				
2976				
2933				
2876				
1718				
1680	1680 ⁻	1680 ⁻	1680 ⁻	1680 ⁻
		1640		1640
		1525		1525
1450	1450 ⁻	1450 ⁻	1450 ⁻	1450 ⁻
	1402		1402	
1042				
1378				
1357				
	1309	1309	1309	1309
1274				
1261				
1225				
1180	1180 ⁻	1180 ⁻	1180 ⁻	1180 ⁻
1130	1130 ⁻	1130 ⁻	1130 ⁻	1130 ⁻
1100				
	1055 ⁻	1055 ⁻	1055 ⁻	1055 ⁻
1053				
1041	1041 ⁺	1041 ⁺	1041 ⁺	1041 ⁺

977
953
937
928
910
894
859
938
825
656
458
431
422

(⁻ leve redução) (⁻ redução) (⁺ aumento)

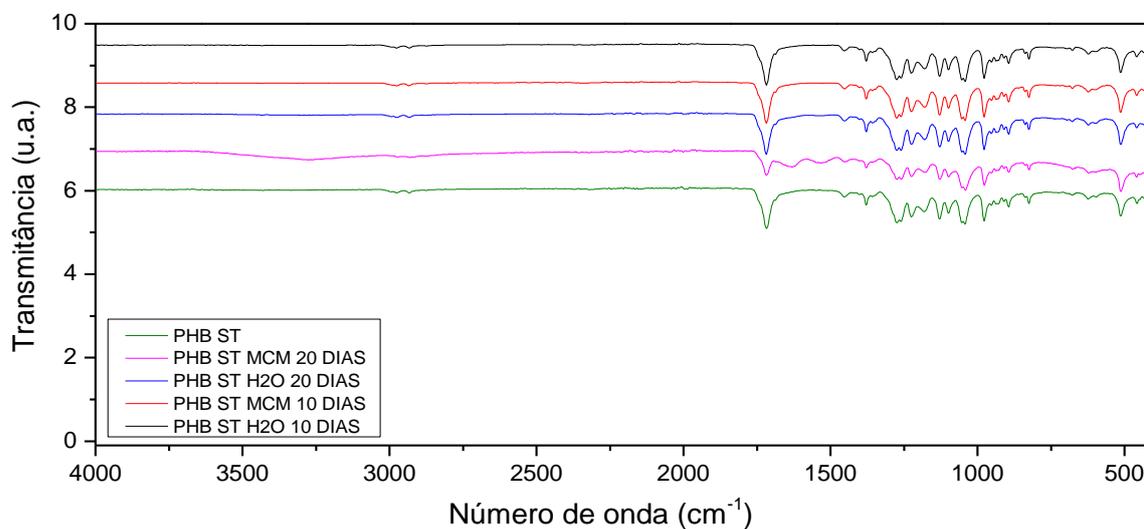


Figura 1: Espectro de Infravermelho de PHB ST X CG97.

Tabela 2: Valores de números de onda dos máximos de bandas e picos dos espectros de infravermelho PHB 60' X CG97 (cm⁻¹).

Controle	H ₂ O - 10 DIAS	COVE - 10 DIAS	H ₂ O - 20 DIAS	COVE - 20 DIAS
	3600-3100	3600-3100	3600-3100	3600-3100
	3300	3300	3300	3300

2995				
2976				
2933				
2876				
	2850	2850	2850	2850
1718	1718 [~]	1718 [~]	1718 [~]	1718 [~]
1680				
	1640		1640	
	1525		1525	
1450	1450 ^{^^}	1450 ^{^^}	1450 ^{^^}	1450 ^{^^}
		1402 ^{^^}		1402 ^{^^}
1042				
1378				
1357 ⁺				
	1309	1309	1309	1309
1274				
1261				
1225				
1180	1180	1180	1180	1180
1130	1130	1130	1130	1130
1100	1100	1100	1100	1100
	1055	1055	1055	1055
1053				
1041	1041	1041	1041	1041
977				
953				
930 ^{^^}				
937				
928				
910				
894				
	860	860	860	860
859				
938				
825				
656				
	593	593	593	593
	591	591	591	591
458				
431				
422				

([~] leve redução) (^{^^} redução) (⁺ aumento)

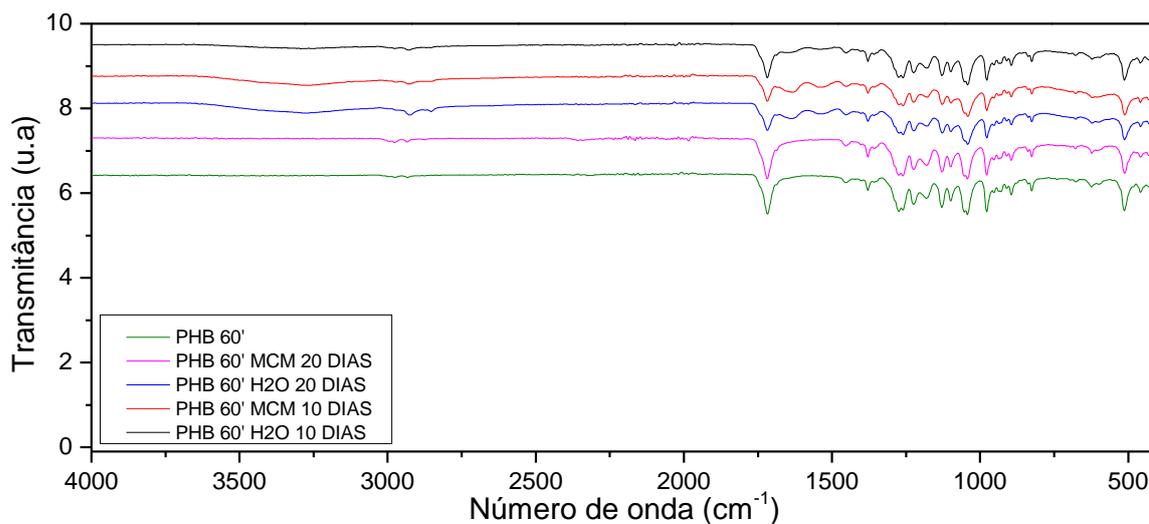


Figura 2: Espectro de infravermelho de PHB 60' X CG97.

Tabela 3: Valores de números de onda dos máximos de bandas e picos dos espectros de infravermelho de PHB 180' X CG97 (cm^{-1}).

Controle	H ₂ O - 10 DIAS	COVE - 10 DIAS	H ₂ O - 20 DIAS	COVE - 20 DIAS
3600-3100	3600-3100	3600-3100	3600-3100	3600-3100
	3300	3300	3300	3300
2995	2850		2850	
2976				
2933				
2876				
1718	1718	1718	1718	1718
1680				
	1640	1640	1640	1640
	1525	1525	1525	1525
1470				
1450	1450	1450	1450	1450
1042				
1378				
1357				
1274				
1261				
1225				
1180				
1130				
1100				
	1055	1055	1055	1055
1053				
1041				
977				
953				
930				
937				
928				

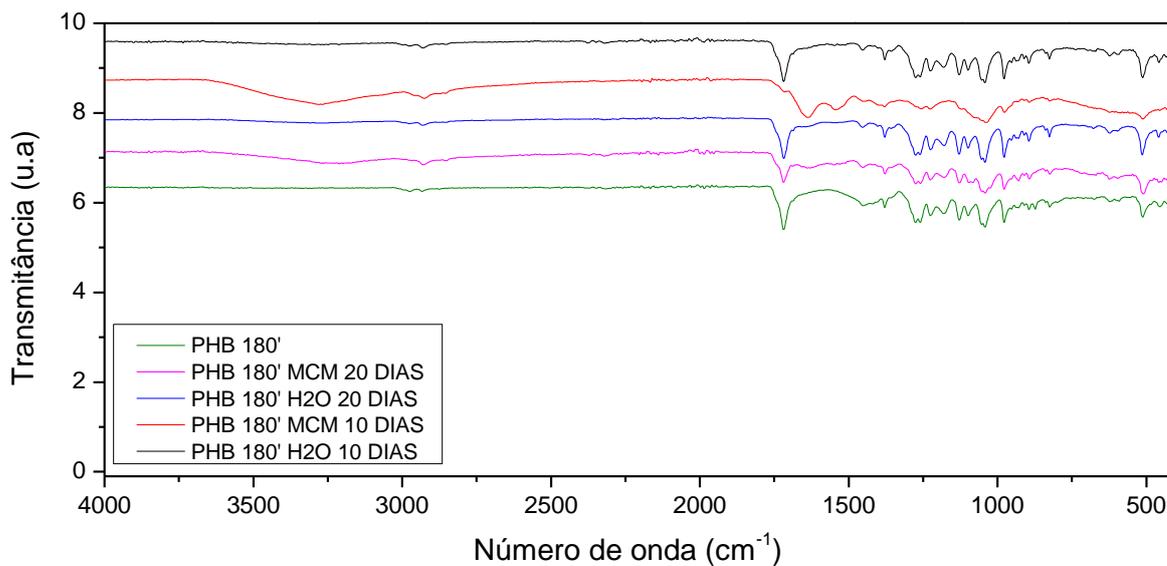
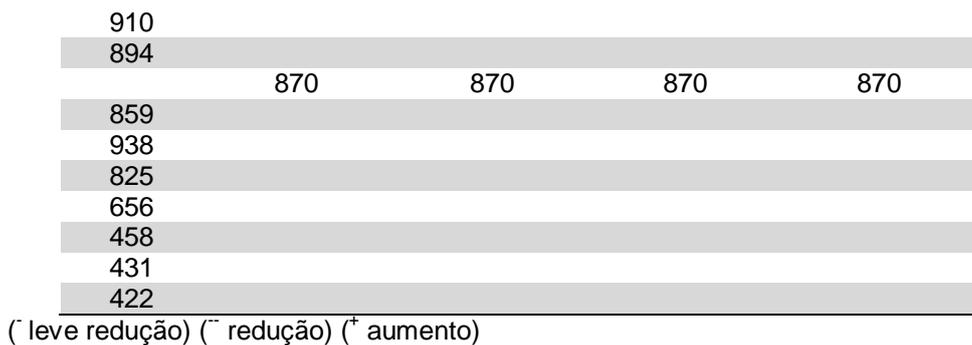


Figura 3: Espectro de infravermelho de PHB 180' x CG97.

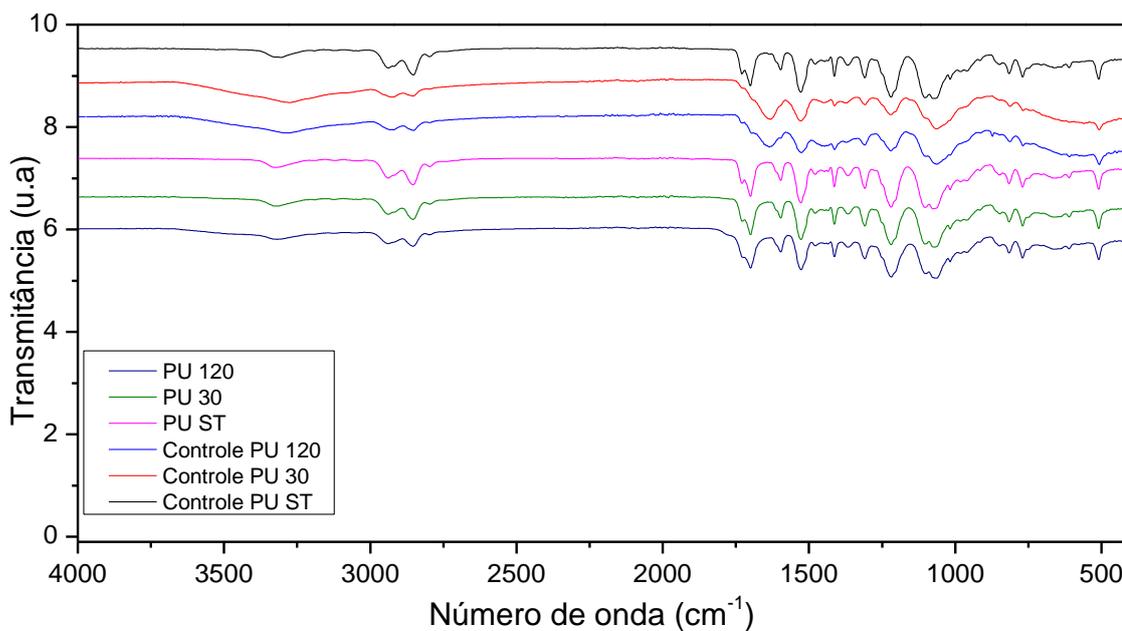


Figura 4: Espectro de infravermelho de PU Controle.

Tabela 4: Valores de números de onda dos máximos de bandas e picos dos espectros de infravermelho de PU ST X CG97(cm^{-1}).

Controle	H ₂ O - 30 DIAS	COVE - 30 DIAS	H ₂ O - 60 DIAS	COVE - 60 DIAS
		3600-3100	3600-3100	3600-3100
		3300		3300
3226	3226		3226	
2939		2939 ⁻		2939 ⁻
2853		2853 ⁻		2853 ⁻
2795				
		1720 ⁻		1720 ⁻
1729	1729		1729	
1699	1699	1699 ⁻	1699	1699 ⁻
		1636	1636	1636
1612	1612			
1596				
1527		1527 ⁻	1527 ⁻	1527 ⁻
1510				
		1480		1480
1478				
1447		1447	1447	1447
1435		1435	1435	1435
1413		1413 ⁻		1413 ⁻
1367				
1309		1309 ⁻		1309 ⁻
1219		1215 ⁻		1215 ⁻
1203				
1100			1100	
1076				
1017				
981				
961				
915				
848				
815				
771				
656	656		656	
610	610		610	

(⁻ leve redução) (⁻ redução) (⁺ aumento)

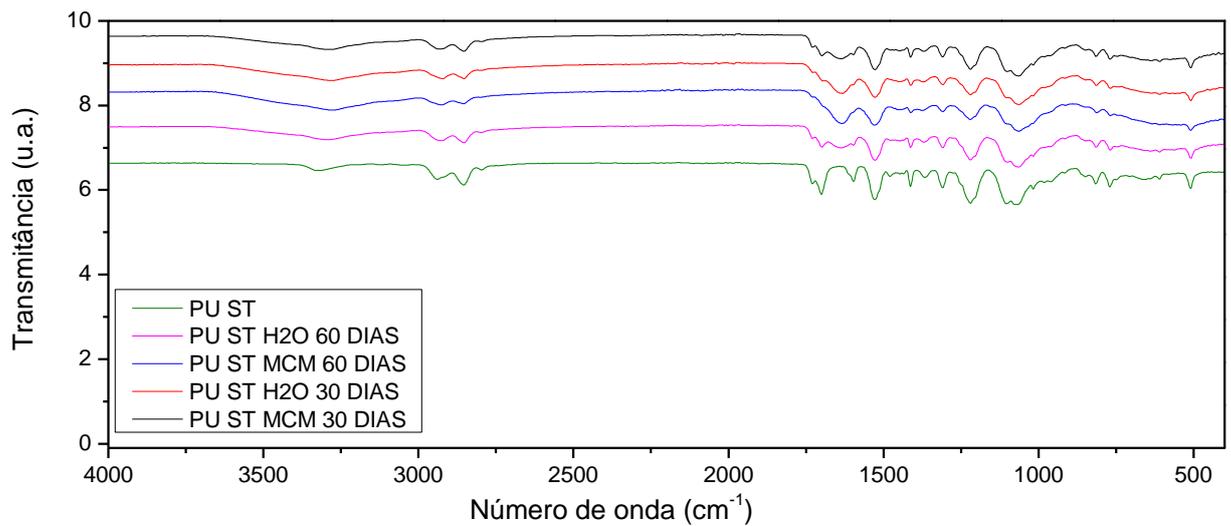


Figura 5: Espectro de infravermelho de PU ST X CG97.

Tabela 5: Valores de números de onda dos máximos de bandas e picos dos espectros de infravermelho de PU 30' X CG97 (cm^{-1}).

Controle	H ₂ O - 30 DIAS	COVE - 30 DIAS	H ₂ O - 60 DIAS	COVE - 60 DIAS
3600-3100	3600-3100		3600-3100	3600-3100
		3300		3300
3226	3226		3226	
2939		2939		2939
2853		2853		2853
2795				
1729	1729		1729	
		1720		1720
1699	1699	1699	1699	1699
1612	1636	1636	1636	1636
1596				
1527	1527	1527	1527	1527
1510				
		1480		1480
1478				
1447	1447	1447	1447	1447
1435	1435	1435	1435	1435
1413		1413		1413
1367		1309		1309
1309				
1219				
1203				
		1215		1215
1100	1100		1100	
1076				

1017		
981		
961		
915		
848		
815		
771		
656	656	656
610	610	610

(⁻ leve redução) (⁺⁺ redução) (⁺ aumento)

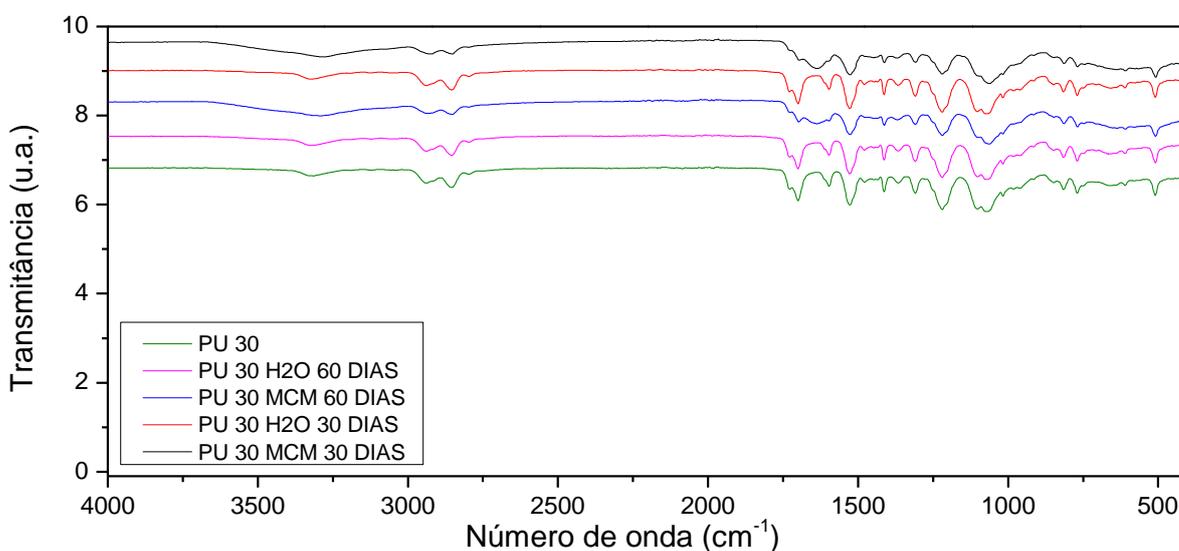


Figura 6: Espectro de infravermelho de PU 30' X CG97.

Tabela 6: Valores de números de onda dos máximos de bandas e picos dos espectros de infravermelho de PU 120' X CG97(cm^{-1}).

Controle	H ₂ O - 30 DIAS	COVE - 30 DIAS	H ₂ O - 60 DIAS	COVE - 60 DIAS
3600-3100		3600-3100		3600-3100
		3300		3300
3226	3226		3226	
2939	2939	2939 ⁺⁺	2939	2939 ⁺⁺
2853	2853	2853 ⁺⁺	2853	2853 ⁺⁺
2795	2795		2795	
1780				
1729	1729		1729	
		1720		1720
1699	1699 ⁺⁺	1699 ⁺⁺	1699 ⁺⁺	1699 ⁺⁺
		1636		1636
1612	1612		1612	
1596	1596		1596	
1527	1527 ⁺⁺	1527 ⁺⁺	1527 ⁺⁺	1527 ⁺⁺

1510	1510		1510	
		1480		1480
1478	1478		1478	
1447	1447	1447	1447	1447
1435	1435	1435	1435	1435
1413	1413	1413	1413	1413
1367	1367		1367	
1309	1309	1309	1309	1309
1219	1219		1219	
		1215		1215
1203	1203		1203	
1100	1100		1100	
1076	1076		1076	
1017	1017		1017	
981	981		981	
961	961		961	
915	915		915	
848	848		848	
815	815		815	
771	771		771	
656	656		656	
610	610		610	

(⁻ leve redução) (⁻ redução) (⁺ aumento)

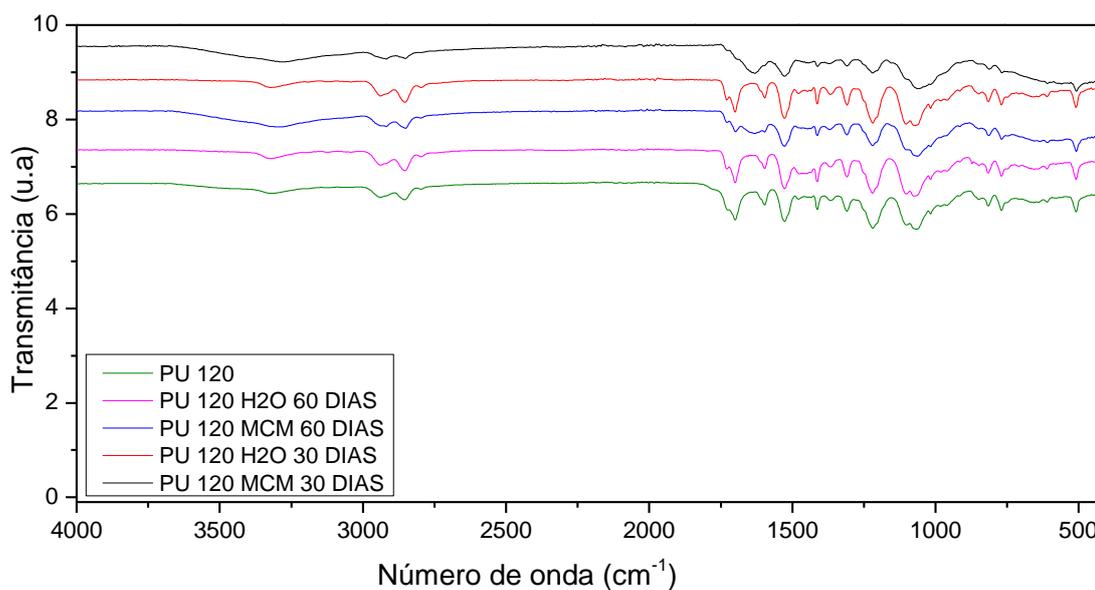


Figura 7: Espectro de infravermelho de PU 120' X CG97.

Tof-Sims

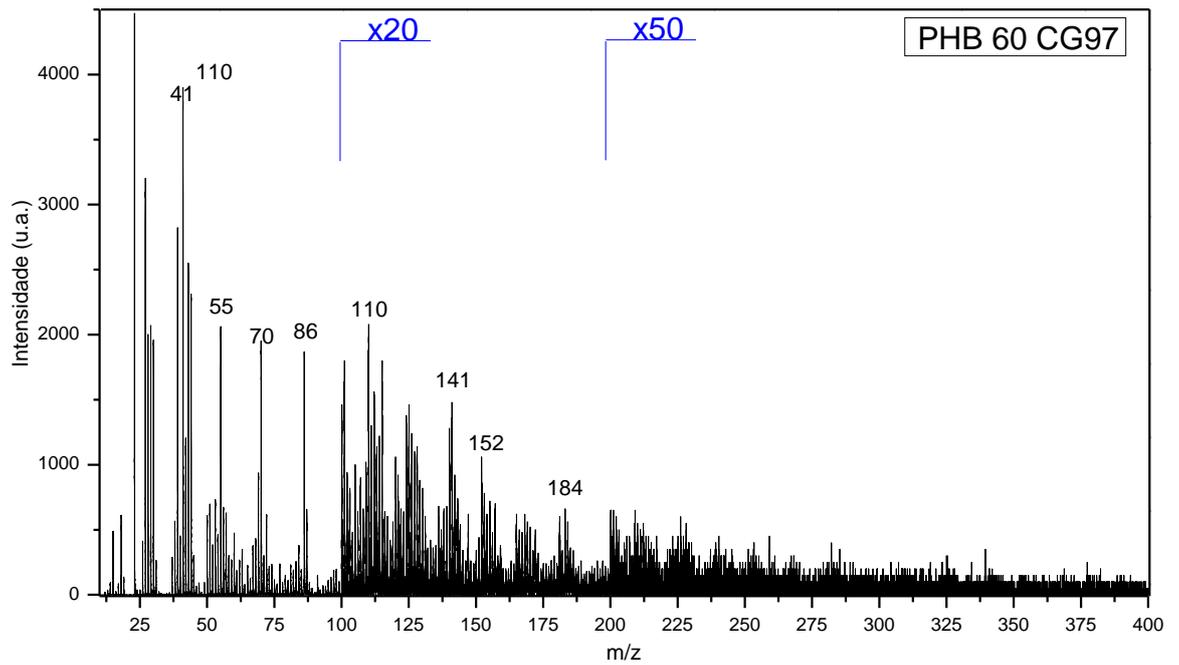


Figura 8: Espectro de íons positivos de PHB 60'. Relação m/z de 0-400.

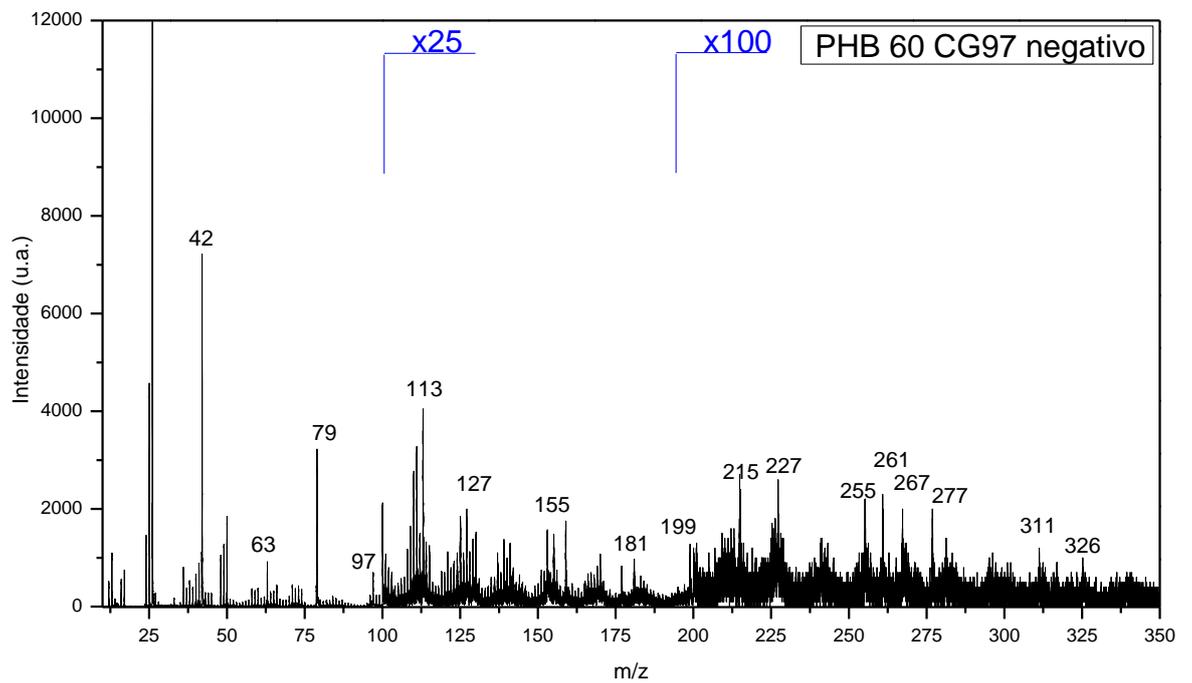


Figura 9: Espectro de íons negativos de PHB 60'. Relação m/z de 0-350.

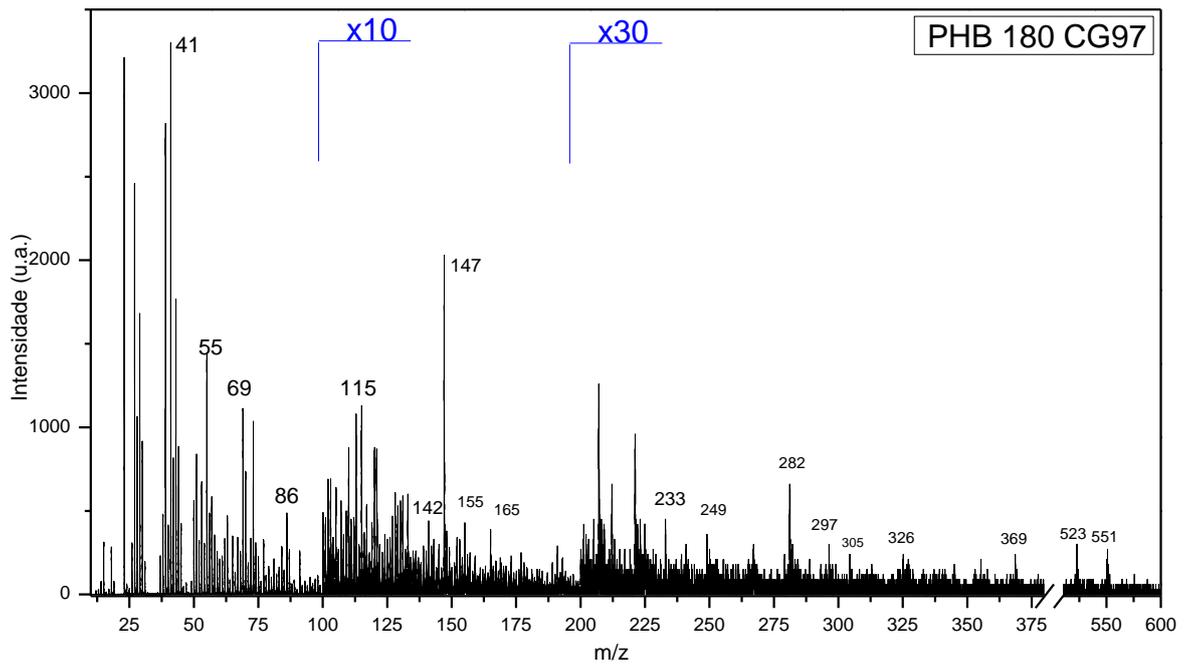


Figura 10: Espectro de íons positivos de PHB 180'. Relação m/z de 0-600.

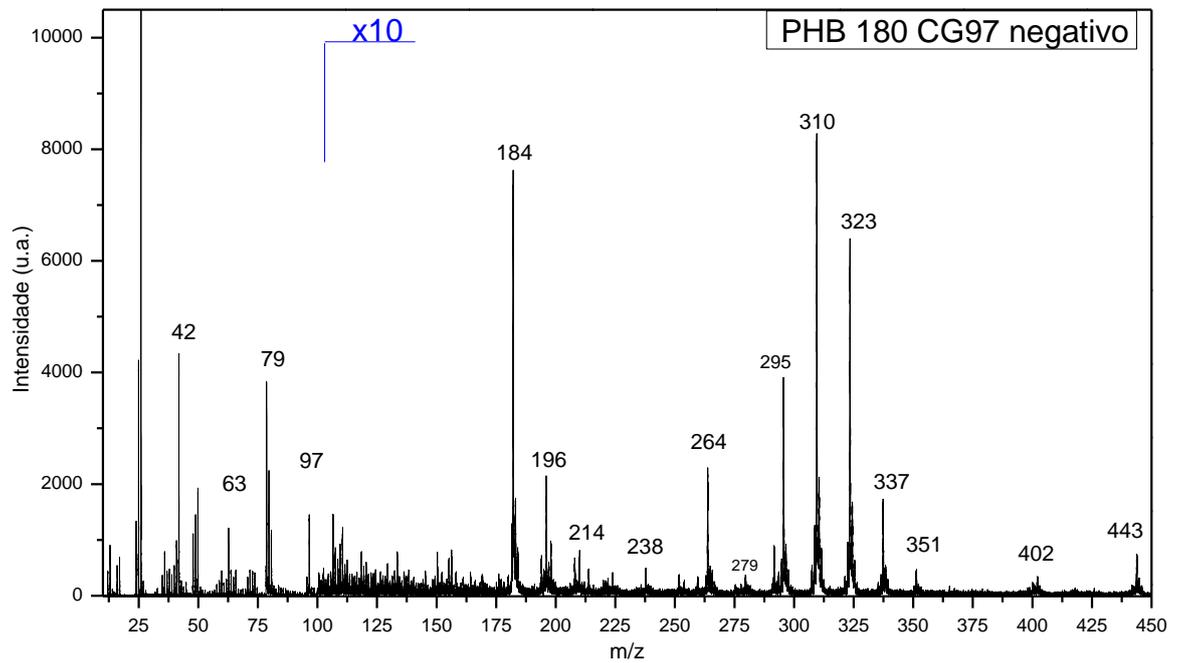


Figura 11: Espectro de íons negativos de PHB 180'. Relação m/z de 0-450.

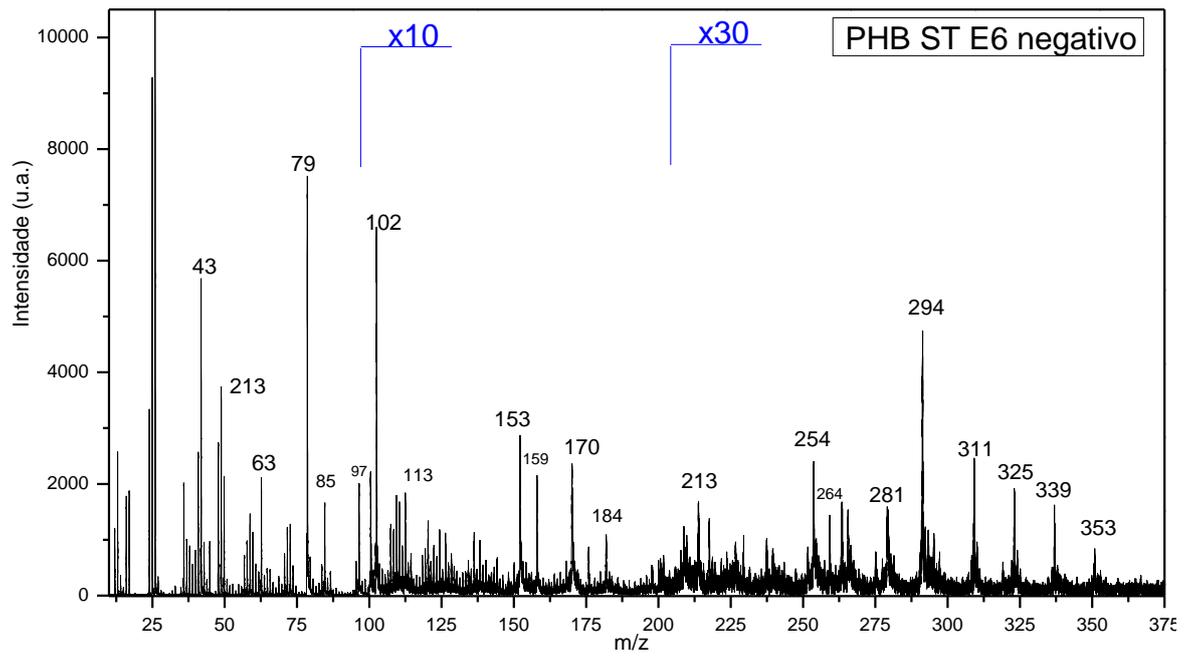


Figura 12: Espectro de íons negativos de PHB ST. Relação m/z de 0-375.

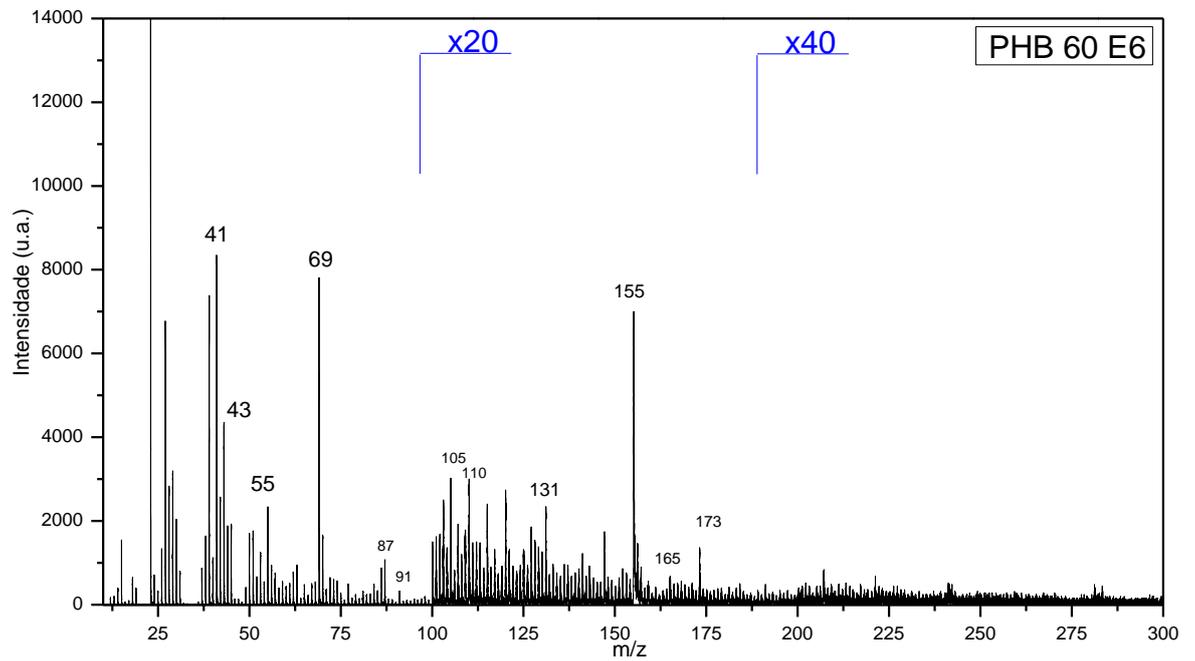


Figura 13: Espectro de íons positivos de PHB 60'. Relação m/z de 0-300.

Referências

1. Alves, P., et al. (2009). "Surface modification and characterization of thermoplastic polyurethane." *European Polymer Journal* 45(5): 1412-1419.
2. Andrady, A. L. and M. A. Neal (2009). "Applications and societal benefits of plastics." *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences* 364(1526): 1977-1984.
3. Arruda, W. et. al. (2005). "Morphological alterations of *Metarhizium anisopliae* during penetration of *Boophilus microplus* ticks". *Experimental and Applied Acarology*. 37: 231-244.
4. Artham, T. and M. Doble (2010). "Biodegradation of physicochemically treated polycarbonate by fungi." *Biomacromolecules* 11(1): 20-28.
5. Bischoff, J. F., et al. (2009). "A multilocus phylogeny of the *Metarhizium anisopliae* lineage." *Mycologia* 101(4): 512-530.
6. Blagojević, S. L., et al. (2013). "Influence of silica nanofiller on the isothermal crystallization and melting of polyurethane elastomer." *Journal of Applied Polymer Science* 129(3): 1466-1475.
7. Bonartsev, A.P.; et. al. (2007). "Biosynthesis, biodegradation, and application of poly(3-hydroxybutyrate) and its copolymers - natural polyesters produced by diazotrophic bacteria." *Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology* 1: 295-307.
8. Bradford, M. M. (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." *Anal Biochem* 72: 248-254.
9. Braun, R. M., et al. (1998). "Performance characteristics of a chemical imaging time-of-flight mass spectrometer." *Rapid Commun Mass Spectrom* 12(18): 1246-1252.
10. Chen, G. Q. and Q. Wu (2005). "The application of polyhydroxyalkanoates as tissue engineering materials." *Biomaterials* 26(33): 6565-6578.
11. Clarkson, J. M. and A. K. Charnley (1996). "New insights into the mechanisms of fungal pathogenesis in insects." *Trends Microbiol* 4(5): 197-203.
12. Davies, M. C., et al. (1989). "An XPS and SIMS analysis of biodegradable biomedical polyesters." *Surface and Interface Analysis* 14(3): 115-120.

13. Doi, Y., et al. (1990). "Biodegradation of microbial copolyesters: poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) and poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate)." *Macromolecules* 23(1): 26-31.
14. Driver, F., et al. (2000). "A taxonomic revision of *Metarhizium* based on a phylogenetic analysis of rDNA sequence data." *Mycological Research* 104(2): 134-150.
15. Gaur, M. S., et al. (2013). "Structural and thermal properties of polysulfone-ZnO nanocomposites." *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry* 111(1): 743-751.
16. Geweely, N. S. and S. A. Ouf (2011). "Enhancement of Fungal Degradation of Starch Based Plastic Polymer by Laser-Induced Plasma." *African Journal of Microbiology Research* 5(20): 3273-3281.
17. Grima, S., et al. (2000). "Aerobic Biodegradation of Polymers in Solid-State Conditions: A Review of Environmental and Physicochemical Parameter Settings in Laboratory Simulations." *Journal of Polymers and the Environment* 8(4): 183-195.
18. Gross, R. A. and B. Kalra (2002). "Biodegradable polymers for the environment." *Science* 297(5582): 803-807.
19. Gu, J.-D. (2003). "Microbiological deterioration and degradation of synthetic polymeric materials: recent research advances." *International Biodeterioration & Biodegradation* 52(2): 69-91.
20. Hartl, L., et al. (2012). "Fungal chitinases: diversity, mechanistic properties and biotechnological potential." *Appl Microbiol Biotechnol* 93(2): 533-543.
21. Howard, G. T. (2002). "Biodegradation of polyurethane: a review." *International Biodeterioration & Biodegradation* 49(4): 245-252.
22. Jacquelin, N., et al. (2008). "Isolation and purification of bacterial poly(3-hydroxyalkanoates)." *Biochemical Engineering Journal* 39(1): 15-27.
23. Jamshidian, M. et. al. (2010). "Poly-Lactic Acid: Production, Applications, Nanocomposites, and Release Studies". *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 9 (5): 552-571.

24. Janorkar, A. V., et al. (2006). "Surface-confined photopolymerization of single- and mixed-monomer systems to tailor the wettability of poly(L-lactide) film." *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry* 44(22): 6534-6543.
25. Kessler, F. (2010). Funcionalização superficial de materiais poliméricos induzida por radiação eletromagnética em presença de gases e vapores reativos. Instituto de Química Universidade Federal do Rio Grande do Sul Mestrado: 132.
26. Kessler, F., et al. (2013). "Controlling the surface wettability of poly(sulfone) films by UV-assisted treatment: benefits in relation to plasma treatment." *Polymer International* 62(2): 310-318.
27. Kessler, F.; Marconatto, L.; et al. (2014) "Biodegradation improvement of poly(3-hydroxy-butyrate) films by entomopathogenic fungi and UV-assisted surface functionalization." *Journal of Photochemistry and Photobiology*. 130: 57-67.
28. Kim, M.-N., et al. (2000). "Biodegradation of poly(3-hydroxybutyrate), Sky-Green® and Mater-Bi® by fungi isolated from soils." *European Polymer Journal* 36(8): 1677-1685.
29. Koosha, F., et al. (1989). "The surface chemical structure of poly(β -hydroxybutyrate) microparticles produced by solvent evaporation process." *Journal of Controlled Release* 9(2): 149-157.
30. Kumar, M.N.V.R. (2000). "A review of chitin and chitosan applications". *Reactive and Functional Polymers*. 46(1): 1-27.
31. Laemmly, U.K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4". *Nature*. 227
32. Leger, Raymond J. St.; et al. (1999). "The entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* alters ambient pH, allowing extracellular protease production and activity". *Microbiology* 145: 2691–2699.
33. Lubeck, I. et al. (2008). "Evaluation of *Metarhizium anisopliae* strains as potential biocontrol agents of the tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* and the cotton stainer *Dysdercus peruvianus*". *Fungal Ecology*. 78-88.
34. Lucas, N., et al. (2008). "Polymer biodegradation: Mechanisms and estimation techniques – A review." *Chemosphere* 73(4): 429-442.
35. Manufacturers, A. o. P. (2012). An analysis of European plastics production demand and waste data for 2011. . Brussels - Belgium 1-36.

36. Nakajima-Kambe, T., et al. (1999). "Microbial degradation of polyurethane, polyester polyurethanes and polyether polyurethanes." *Appl Microbiol Biotechnol* 51(2): 134-140.
37. Parra, D. F., et al. (2011). "Biodegradation of γ Irradiated Poly 3-hydroxybutyrate (PHB) Films Blended with Poly(Ethyleneglycol)." *Journal of Polymers and the Environment* 19(4): 918-925.
38. Pedrini, N., et al. (2006). "Clues on the role of *Beauveria bassiana* catalases in alkane degradation events." *Mycologia* 98(4): 528-534.
39. Plásticos., I. S.-A. d. (2012). Monitoramento dos Índices de Reciclagem Mecânica de Plástico no Brasil (IRmP) 2011. Brasil 1-28.
40. Rajajeyaganthan, R., et al. (2011). "Surface Modification of Synthetic Polymers Using UV Photochemistry in the Presence of Reactive Vapours." *Macromolecular Symposia* 299-300(1): 175-182.
41. Revankar, SANJAY G., et. al. (1999). "Metarrhizium anisopliae as a Cause of Sinusitis in Immunocompetent Hosts". *Journal of Clinical Microbiology*. 37 (1): 195-198.
42. Robert M. Silverstein, F. X. W., David Kiemle. *Spectrometric Identification of Organic Compounds*. New York (2005)
43. Rodriguez, F. *Principles of Polymer Systems*. Taylor & Francis. Washington, 1996.
44. Rosato, D.V. *Rosato's Plastics Encyclopedia an Dictionary*. Hanser Publish. Munich, 1993.
45. Rosu, D., et al. (2009). "IR-change and yellowing of polyurethane as a result of UV irradiation." *Polymer Degradation and Stability* 94(4): 591-596.
46. Russell, J. R., et al. (2011). "Biodegradation of Polyester Polyurethane by Endophytic Fungi." *Applied and Environmental Microbiology* 77(17): 6076-6084.
47. Salman, A., et al. (2012). "Detection of *Fusarium oxysporum* Fungal Isolates Using ATR Spectroscopy." *Spectroscopy: An International Journal* 27(5-6).
48. Salman, A., et al. (2010). "FTIR spectroscopy for detection and identification of fungal phytopathogenes." *Spectroscopy: An International Journal* 24(3): 261-267.
49. Sang, B. I., et al. (2002). "Fungal contribution to in situ biodegradation of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) film in soil." *Appl Microbiol Biotechnol* 58(2): 241-247.

50. Santi, L., et al. (2010). "Conidial surface proteins of *Metarhizium anisopliae*: Source of activities related with toxic effects, host penetration and pathogenesis." *Toxicon* 55(4): 874-880.
51. Schrank, A. and M. H. Vainstein (2010). "Metarhizium anisopliae enzymes and toxins." *Toxicon* 56(7): 1267-1274.
52. Song, H. J. and C. K. Kim (2013). "Fabrication and properties of ultrafiltration membranes composed of polysulfone and poly(1-vinylpyrrolidone) grafted silica nanoparticles." *Journal of Membrane Science* 444(0): 318-326.
53. Sophos, N. A. and V. Vasiliou (2003). "Aldehyde dehydrogenase gene superfamily: the 2002 update." *Chem Biol Interact* 143-144: 5-22.
54. Stoica-Guzun, A., et al. (2011). "Biodegradation of Poly(vinyl alcohol) and Bacterial Cellulose Composites by *Aspergillus niger*." *Journal of Polymers and the Environment* 19(1): 69-79.
55. Stuart, B. *Infrared Spectroscopy: Fundamentals and Applications*. (2004)
56. Sudesh, K., et al. (2000). "Synthesis, structure and properties of polyhydroxyalkanoates: biological polyesters." *Progress in Polymer Science* 25(10): 1503-1555.
57. Sutherland, G. R., et al. (1997). "Biodegradation of crosslinked acrylic polymers by a white-rot fungus." *Environ Sci Pollut Res Int* 4(1): 16-20.
58. Theophanides, T. M. *Infrared Spectroscopy - Materials Science, Engineering and Technology*, InTech. (2012)
59. Unnikrishnan, L., et al. (2012). "Synthesis and characterization of polysulfone/clay nanocomposite membranes for fuel cell application." *Journal of Applied Polymer Science* 124(S1): E309-E318.
60. Vroman, I. and L. Tighzert (2009). "Biodegradable Polymers." *Materials* 2(2): 307-344.
61. Wang, C. and R. J. St Leger (2007). "The MAD1 adhesin of *Metarhizium anisopliae* links adhesion with blastospore production and virulence to insects, and the MAD2 adhesin enables attachment to plants." *Eukaryot Cell* 6(5): 808-816.
62. Weibel, D. E., et al. (2009). "Ultraviolet-induced surface modification of polyurethane films in the presence of oxygen or acrylic acid vapours." *Thin Solid Films* 517(18): 5489-5495.

63. Weng, Y.-X., et al. (2010). "Biodegradation behavior of PHBV films in a pilot-scale composting condition." *Polymer Testing* 29(5): 579-587.
64. Wessels, J. G. H. (1993). "Tansley Review No. 45 Wall growth, protein excretion and morphogenesis in fungi." *New Phytologist* 123(3): 397-413.
65. Wu, C.-S. (2009). "Renewable resource-based composites of recycled natural fibers and maleated polylactide bioplastic: Characterization and biodegradability." *Polymer Degradation and Stability* 94(7): 1076-1084.
66. Zahra, S., et al. (2010). "Biodegradation of low-density polyethylene (LDPE) by isolated fungi in solid waste medium." *Waste Management* 30(3): 396-401.