

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS**

**KALEBE FERREIRA FURTADO**

**POTENCIAL COLONIZAÇÃO E BIODEGRADAÇÃO DE FILMES E  
MICROPLÁSTICOS DE POLIETILENO DE BAIXA DENSIDADE UTILIZANDO  
UMA ABORDAGEM MICOGÊNICA**

**POÇOS DE CALDAS/MG**

**2026**

**KALEBE FERREIRA FURTADO**

**POTENCIAL COLONIZAÇÃO E BIODEGRADAÇÃO DE FILMES E  
MICROPLÁSTICOS DE POLIETILENO DE BAIXA DENSIDADE UTILIZANDO  
UMA ABORDAGEM MICOGÊNICA**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Engenharia Química pela Universidade Federal de Alfenas.

Área de concentração: Engenharia Química.

Orientadora: Prof<sup>fa</sup>. Dr<sup>a</sup>. Cristiane Angélica Ottoni.

Coorientador: Prof. Dr. Rafael Firmani Perna.

**POÇOS DE CALDAS/MG**

**2026**

Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal de Alfenas  
Biblioteca Campus Poços de Caldas

Furtado, Kalebe Ferreira.

Potencial colonização e biodegradação de filmes e microplásticos de polietileno de baixa densidade utilizando uma abordagem micogênica / Kalebe Ferreira Furtado. - Poços de Caldas, MG, 2026.

90 f. : il. -

Orientador(a): Cristiane Angélica Ottoni.

Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade Federal de Alfenas, Poços de Caldas, MG, 2026.

Bibliografia.

1. Polietileno. 2. Microplásticos. 3. Fungos filamentosos. 4. Enzimas. 5. Biodegradação. I. Ottoni, Cristiane Angélica, orient. II. Título.

**NOME COMPLETO DO AUTOR**

**POTENCIAL COLONIZAÇÃO E BIODEGRADAÇÃO DE FILMES E MICROPLÁSTICOS DE POLIETILENO DE BAIXA DENSIDADE UTILIZANDO UMA ABORDAGEM MICOGÊNICA**

A Presidente da banca examinadora abaixo assina a aprovação da Dissertação apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Engenharia Química pela Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Engenharia Química.

Aprovada em: 20 de fevereiro de 2026.

Profa. Dra. Cristiane Angélica Ottoni

Presidente da Banca Examinadora

Instituição: Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho

Profa. Dra. Ana Carolina Vieira

Instituição: Universidade Federal de Alfenas

Prof. Dr. Sergio Andres Villalba Morales

Instituição: Universidade Federal do Tocantins



Documento assinado eletronicamente por **Cristiane Angélica Ottoni, Usuário Externo**, em 20/02/2026, às 13:45, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [https://sei.unifal-mg.edu.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://sei.unifal-mg.edu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **1727816** e o código CRC **911E2056**.

---

*Aos meus ausentes, que seguem ainda mais próximos e a mim, alheios.*

*Aos meus presentes, que, insistentes, seguem comigo, apesar de mim.*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus.

Ao Deus de Adélia,

Deus que não suporta ficar escondido.

Deus que se revela como comunidade: Pai/Mãe, Filho e Espírito, um só Deus.

Prometemos mutuamente que não haveria abandono entre nós e por isso, nunca estou sozinho.

Unido a meus irmãos e irmãs num Corpo, carne mesmo.

Movidos pela mesma Vida e Utopia, seguimos.

Agradeço a minha família: meu pai Nonato, minha mãe Eliene e irmão Daniel.

Apesar das distâncias,

seu apoio, paciência e carinho são lembretes constantes de seu amor por mim.

Agradeço à minha parentela.

Agradeço aos amigos e amigas.

Agradeço a Lucely Nogueira.

Agradeço a Matheus Pimentel.

Agradeço ao Professor Nelson Rosa Ferreira e ao Laboratório de Processos Biotecnológicos da Universidade Federal do Pará.

Agradeço aos meus Professores Orientadores Cristiane Angélica Ottoni e Rafael Firmani Perna pela oportunidade de desenvolver esta dissertação, suas orientações auxiliaram o meu crescimento como pessoa e acima de tudo, suas paciências. A eles, meu sincero respeito e admiração.

Agradeço aos Laboratórios LABTEB (UNIFAL) e MICOBIONANOTEC (UNESP) que possibilitaram o desenvolvimento deste trabalho. Associados a estes, agradeço aos alunos e alunas de IC, especialmente Krycia e Stella; colegas de mestrado, especialmente Dani, Crislaine, Vinicius, Andressa e Paula; doutorandos, especialmente, Arthur e Mariana. E como menção honrosa, Ana Carolina Vieira, agradeço pela paciência e apoio. Além destes, agradeço ao Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN) pela parceria neste projeto.

Agradeço aos amigos que a UNIFAL me deu: aos físicos, especialmente Tatiana; Thais, Danilo, Gilbão e Samuel.

Agradeço a Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL).

Agradeço a todas as pessoas que convivi nestes dois anos de mestrado.

Sem as quais, este trabalho não existiria.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

*“Life in plastic, it’s fantastic”*

Aqua, 1997

## RESUMO

Os plásticos são macromoléculas produzidas e consumidas em larga escala desde a década de 1950, moldáveis sob calor e/ou pressão. Entre eles, destaca-se o polietileno de baixa densidade (PEBD), um polímero recalcitrante, hidrofóbico e amplamente associado à poluição macro e microplástica. A biodegradação mediada por enzimas secretadas por microrganismos tem se destacado como alternativa sustentável para mitigar a poluição plástica, alinhando-se aos princípios da Agenda 2030 da Organização das Nações Unidas ao promover a conversão biológica do plástico em subprodutos menos poluentes e potencialmente circulares. Neste contexto, o presente estudo teve como objetivo desenvolver um protocolo para a seleção de fungos filamentosos (Ff) com potencial de degradar PEBD e validar sua atividade decompositora em cultivos líquidos. A seleção foi conduzida com base na interação dos Ff com filmes e microplásticos de PEBD e na avaliação de potenciais atividades enzimáticas relacionadas à oxidação do polímero. Nove Ffs apresentaram adesão e crescimento sob filmes de PEBD. Análises por espectroscopia no infravermelho (FTIR) evidenciaram modificações nas cadeias do polímero e índices de oxidação para todos os isolados, indicando processos oxidativos na matriz polimérica. Nos ensaios de atividade enzimática baseados na formação de zonas de coloração, seis Ffs apresentaram halos indicativos da presença de oxirredutases, enzimas frequentemente associadas à degradação de polietilenos. A integração dos resultados das etapas de seleção permitiu identificar o fungo RMP5 como potencial agente decompositor de filmes e microplásticos de PEBD. O isolado RMP5 foi então empregado em cinéticas de degradação de 28 dias em meio líquido, nas quais reduziu  $21,962 \pm 3,761$  % da massa de microplásticos e  $1,147 \pm 0,162$  % da massa de filmes de PEBD. Durante as cinéticas, o fungo apresentou dinâmicas enzimáticas distintas conforme a geometria do substrato, priorizando a secreção de peroxidases no cultivo com microplásticos e de lacases no cultivo com filmes. Em ambos os sistemas ocorreu acidificação do meio, associada à produção de ácidos orgânicos, além da secreção expressiva de tirosinases e proteases. As alterações químicas observadas no material, associadas ao monitoramento enzimático, indicam significativa redução do substrato em período inferior a 30 dias. Assim, este trabalho contribui para o desenvolvimento de estratégias de remediação da poluição plástica ao propor um protocolo acessível de seleção microbiana e validar a capacidade de degradação de PEBD do fungo RMP5.

**Palavras-chave:** polietileno; microplásticos; fungos filamentosos; enzimas; biodegradação.

## ABSTRACT

Plastics are macromolecules produced and consumed on a large scale since the 1950s, being moldable under heat and/or pressure. Among them, low-density polyethylene (LDPE) stands out as a recalcitrant and hydrophobic polymer widely associated with macro- and microplastic pollution. Biodegradation mediated by enzymes secreted by microorganisms has emerged as a sustainable alternative for mitigating plastic pollution, aligning with the principles of the United Nations 2030 Agenda by promoting the biological conversion of plastic into less polluting and potentially circular by-products. In this context, the present study aimed to develop a protocol for the selection of filamentous fungi (Ff) with the potential to degrade LDPE and to validate their decomposing activity in liquid cultures. The selection was conducted based on the interaction of Ff with LDPE films and microplastics, as well as the evaluation of potential enzymatic activities related to polymer oxidation. Nine Ff isolates showed adhesion and growth beneath LDPE films. Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) analyses revealed modifications in the polymer chains and oxidation indices for all isolates, indicating oxidative processes in the polymeric matrix. In enzymatic activity assays based on the formation of color zones, six Ff isolates produced halos indicative of oxidoreductases, enzymes frequently associated with polyethylene degradation. The integration of the results from the selection steps allowed the identification of the fungus RMP5 as a potential decomposer of LDPE films and microplastics. The RMP5 isolate was then employed in 28-day degradation kinetics in liquid medium, where it reduced the mass of microplastics by  $21.962 \pm 3.761\%$  and LDPE films by  $1.147 \pm 0.162\%$ . During the kinetics, the fungus exhibited distinct enzymatic dynamics depending on substrate geometry, prioritizing peroxidase secretion in microplastic cultures and laccase secretion in film cultures. In both systems, medium acidification occurred, associated with the production of organic acids, along with significant secretion of tyrosinases and proteases. The chemical alterations observed in the material, together with enzymatic monitoring, indicate a significant reduction of the substrate in less than 30 days. Therefore, this study contributes to the development of plastic pollution remediation strategies by proposing an accessible microbial selection protocol and validating the LDPE degradation capacity of the fungus RMP5.

**Keywords:** polyethylene; microplastics; filamentous fungi; enzymes; biodegradation.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> - Fluxograma das etapas experimentais de seleção e validação realizadas neste trabalho .....	33
<b>Figura 2</b> - Filmes plásticos de polietileno de baixa densidade (PEBD) .....	36
<b>Figura 3</b> - $\mu$ Ps de polietileno de baixa densidade (PEBD) com granulometria de ( $\leq$ 355 $\mu$ m), apresentados junto a uma moeda de 10 centavos para referência de tamanho .....	36
<b>Figura 4</b> - Fungos que apresentaram alterações macroscópicas no meio de cultura sob a interface do filme após 15 dias de incubação a 30 °C .....	45
<b>Figura 5</b> - Índices oxidativos (IO) obtidos por espectroscopia no infravermelho (FTIR) em função da composição dos filmes após exposição fúngica .....	47
<b>Figura 6</b> - Espectros de absorção no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), normalizados, obtidos no intervalo de 4000–500 $\text{cm}^{-1}$ .....	48
<b>Figura 7</b> - Halos de coloração formados pela ação de Ffs em meio seletivo MMSC contendo guaiacol e $\mu$ Ps de PEBD após o período de incubação .....	54
<b>Figura 8</b> - Crescimento do fungo filamentososo RMP5 em meio batata dextrose ágar (BDA) após 7 dias de incubação .....	55
<b>Figura 9</b> - Monitoramento da atividade enzimática para lacases em cultivos que utilizaram PEBD como substrato durante 28 dias, Ff RMP5 .....	57
<b>Figura 10</b> - Monitoramento da atividade enzimática para peroxidases totais em cultivos que utilizaram PEBD como substrato durante 28 dias, Ff RMP5 .....	60
<b>Figura 11</b> - Monitoramento da atividade enzimática para tirosinases em cultivos que utilizaram PEBD como substrato durante 28 dias, Ff RMP5 .....	65
<b>Figura 12</b> - Comparação entre o controle abiótico e frasco-amostra da cinética com $\mu$ Ps ....	66
<b>Figura 13</b> - Monitoramento da atividade enzimática para endoproteases em cultivos que utilizaram PEBD como substrato durante 28 dias, Ff RMP5 .....	67
<b>Figura 14</b> - Espectros de absorção no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) obtidos no intervalo de 4000–500 $\text{cm}^{-1}$ para cinética utilizando $\mu$ Ps de PEBD como substrato .....	69
<b>Figura 15</b> - Evolução dos índices oxidativos (IO) obtidos por espectroscopia no infravermelho (FTIR) durante o cultivo de degradação de $\mu$ Ps .....	70

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Estudos sobre a degradação de polietileno por fungos filamentosos (2020 - 2025) .....	23
<b>Tabela 2</b> - Comparação da composição de meios de cultivo restritos em carbono .....	29
<b>Tabela 3</b> - Ffs cedidos pelos laboratórios das universidades UNESP, UFPA e UNIFAL para esse trabalho .....	33
<b>Tabela 4</b> - Observação preliminar da interação do fungo com o filme agarizado após 15 dias de incubação a 30 °C (ver Apêndice A) .....	43
<b>Tabela 5</b> - Descrição das principais modificações químicas superficiais em filmes de PEBD expostos a fungos filamentosos (Ff) identificadas por espectroscopia de infravermelho (FTIR) .....	48
<b>Tabela 6</b> - Índices qualitativos obtidos a partir da formação de halos como medida de potencial enzimático para oxiredutases .....	50

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

μP	microplástico(s)
nP	nanoplásticos(s)
Lac	lacases
MnP	manganês peroxidases
LiP	lignina peroxidases
LCMO	oxidases multicobre semelhantes à lacases
Ff	fungo(s) filamentoso(s)
PO/PPO	fenoloxidasas/polifenoloxidasas

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>14</b>
<b>2. REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	<b>16</b>
2.1 PLÁSTICOS, MICROPLÁSTICOS E NANOPLÁSTICOS .....	16
2.2 BIODEGRADAÇÃO .....	19
2.3 ESTADO DA TÉCNICA (2020 - 2025) .....	21
<b>3 JUSTIFICATIVA</b> .....	<b>30</b>
<b>4 OBJETIVOS</b> .....	<b>32</b>
4.1 OBJETIVO GERAL .....	32
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	32
<b>5 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>33</b>
5.1 FUNGOS .....	33
5.2 POLIETILENO DE BAIXA DENSIDADE (FILMES E $\mu$ Ps) .....	34
5.3 ENSAIOS DE SELEÇÃO DE CULTURAS DECOMPOSITORAS DE PEBD .....	35
5.4 ENSAIOS DE DEGRADAÇÃO EM MEIO LÍQUIDO .....	34
5.5 TÉCNICAS ANALÍTICAS .....	38
<b>5.5.1 Biomassa fúngica e PEBD reduzido</b> .....	<b>38</b>
<b>5.5.2 pH</b> .....	<b>39</b>
<b>5.5.3 Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)</b> .....	<b>39</b>
<b>5.5.4 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)</b> .....	<b>40</b>
<b>5.5.5 Ensaio Enzimáticos</b> .....	<b>40</b>
5.5.5.1 Tirosinases .....	40
5.5.5.2 Lacases e Peroxidasas Totais .....	41
5.5.5.3 Endoproteases .....	41
<b>6 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>43</b>
6.1 INTERAÇÃO FÚNGICA AO FILME DE PEBD .....	43
6.2 ÍNDICE DE POTENCIAL ENZIMÁTICO PARA LACASES .....	52
6.3 ENSAIOS DE BIODEGRADAÇÃO EM MEIO LÍQUIDO .....	57
<b>7 CONCLUSÕES E SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS</b> .....	<b>70</b>
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>71</b>
<b>APÊNDICES</b> .....	<b>81</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Os plásticos foram criados no ano de 1860 e, no ano de 2022, a sua produção ultrapassou 400,3 milhões de toneladas. Esses materiais poliméricos possuem composição variada e múltiplas aplicações. Os plásticos podem ser classificados por diferentes critérios, sendo a classificação mais usual a que utiliza conceitos associados a características físico-químicas. Os termoplásticos, que incluem os polietilenos (PE) e polipropilenos (PP), são materiais que não sofrem alterações na composição química quando aquecidos e correspondem a 80 % de todo plástico consumido, enquanto os termofixos, que incluem tereftalatos de polietileno (PET), poliuretanos (PU), isoprenos e fibras, sofrem alterações químicas quando aquecidos.

Dentre os milhões de toneladas desses polímeros produzidos anualmente, apenas cerca de 15% são reciclados. Em acréscimo, somente a partir de 2004, ocorreu um aumento na preocupação com as partículas derivadas da produção e degradação destes materiais. Estas partículas são denominadas de microplásticos ( $\mu$ Ps) cujo tamanho é definido entre 5 mm e 1  $\mu$ m e nanoplásticos (nPs), cujos tamanhos são inferiores a 1  $\mu$ m. Tanto os  $\mu$ Ps como os nPs, influenciam de forma negativa nos ecossistemas terrestres e aquáticos e, conseqüentemente, na saúde humana.

Devido a sua ampla utilização, os  $\mu$ Ps de PE são as partículas de plástico encontradas com maior frequência e abundância nos ambientes terrestres e aquáticos. Esses  $\mu$ Ps são descritos como materiais rígidos, inertes, hidrofóbicos, cristalinos e altamente resistentes à degradação. Os seres humanos são potencialmente expostos a  $\mu$ Ps por meio da ingestão, inalação e contato com a pele. Os efeitos tóxicos dos  $\mu$ Ps em modelos experimentais como células, organóides e animais estão principalmente associados a estresse oxidativo, danos ao DNA, disfunção orgânica, distúrbio metabólico, resposta imune, neurotoxicidade, bem como toxicidade reprodutiva e de desenvolvimento. Os  $\mu$ Ps podem alterar as propriedades físico-químicas do solo, por exemplo, estrutura e ciclagem de nutrientes, afetando potencialmente o crescimento das plantas e os organismos que vivem no solo. Os  $\mu$ Ps podem entrar em corpos d'água diretamente de fontes como lixo, descarga de águas residuais e escoamento de águas pluviais, ou indiretamente por meio da decomposição de detritos plásticos maiores (macroplásticos). Os ecossistemas lóticos, como rios, córregos e nascentes, desempenham um papel importante no transporte de detritos plásticos da terra para o mar. Organismos aquáticos, como peixes, crustáceos e plâncton, podem ingerir  $\mu$ Ps, desencadeando bloqueios físicos, redução da eficiência alimentar e potencial transferência de  $\mu$ Ps pela cadeia alimentar. Os  $\mu$ Ps

podem atuar como transportadores de produtos químicos tóxicos, associando poluentes presentes na água circundante e potencialmente liberando-os em organismos após a ingestão. A presença de  $\mu$ Ps pode alterar o comportamento de organismos aquáticos e interromper seus processos reprodutivos e de crescimento.

A reciclagem, incineração ou degradação química são as principais estratégias utilizadas para amenizar a poluição plástica. Existem outras medidas para a circularidade, regulamentação e substituição dos materiais plásticos, por exemplo, a biodegradação. Ainda que sua aplicação seja limitada e necessite de estudos mais robustos para a implementação em larga escala. Geralmente, os métodos de degradação de  $\mu$ Ps englobam abordagens físicas, químicas ou biológicas. A degradação biológica ou biodegradação, utiliza microrganismos como biocatalisadores no processo de mineralização dos  $\mu$ Ps e desponta como uma alternativa econômica e ecológica. Os microrganismos rompem as longas e complexas cadeias dos carbônicas presentes nos  $\mu$ Ps utilizando o seu maquinário enzimático, decompondo as estruturas poliméricas em estruturas mais assimiláveis, como oligômeros, dímeros e monômeros, que serão utilizados como fontes de carbono no metabolismo microbiano. Nessa decomposição mediada por processos enzimáticos, as enzimas como lipases, cutinases, proteases e esterases, facilitam o crescimento e aderência da biomassa microbiana ao substrato e enzimas como hidrolases, lacases, oxidases, amidases e peroxidases atuam diretamente na despolimerização. E por isso, tal processo de degradação biológica requer microrganismos com uma ampla maquinaria enzimática.

Dentre os microrganismos isolados de efluentes plásticos, utilizados nos estudos de biodegradação de plásticos e  $\mu$ Ps, assim como, organismos de ampla aplicação biotecnológica, destacam-se os Ff, principalmente os pertencentes aos gêneros *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Fusarium* e *Trichoderma*. Esses microrganismos possuem amplo espectro enzimático extracelular e seu crescimento através de hifas facilita a penetração em superfícies rígidas e hidrofóbicas, como os  $\mu$ Ps de PE, além disso, a sua resistência a possíveis subprodutos de degradação plástica e condições de cultivo, são características importantes quando os trabalhos com microrganismos decompositores de plástico visam a gênese de uma aplicação industrial.

Diante desse contexto, este trabalho tem como objetivo avaliar o potencial de fungos filamentosos na biodegradação de  $\mu$ Ps de PE, buscando compreender os mecanismos enzimáticos envolvidos e as condições que favorecem esse processo.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 PLÁSTICOS, MICROPLÁSTICOS E NANOPLÁSTICOS

Polímeros são macromoléculas, naturais ou sintéticas, formadas por moléculas orgânicas menores chamadas monômeros. Essas unidades químicas ligam-se covalentemente entre si, formando cadeias com certo grau de polimerização, isto é, o número de unidades químicas repetitivas que constituem o material polimérico. A composição e as configurações químicas dos monômeros na cadeia polimérica determinam o tamanho, as interações intra- e intermoleculares, o peso molecular da macromolécula e outras propriedades físico-químicas. Dessas características, podemos classificar a maioria dos polímeros em plásticos, borrachas/elastômeros ou fibras (Mano; Mendes, 2004; Bahl *et al.*, 2021; Andradý *et al.*, 2022; Dumon, 2025).

Os plásticos (*gr.* “moldáveis”) são materiais poliméricos com alta massa molar e cadeias poliméricas longas. Esses materiais podem ser definidos como sólidos que, em algum estágio de seu processamento tornam-se fluidos e, em seguida, são moldados por meio de calor e/ou pressão. Os materiais plásticos podem ser classificados como termoplásticos (plásticos com a capacidade de remoldagem após novas aplicações de calor e/ou pressão e por isso, fusíveis, solúveis em determinados solventes orgânicos e recicláveis), termofixos (plásticos que não podem ser remoldados após o processo de cura devido a transformações químicas irreversíveis, portanto, rígidos e não-recicláveis) ou baroplásticos (plásticos que fluem para um estado borrachoso a partir de modificações de pressão) (Khan; Majeed, 2019; Canevarolo, 2024).

Os polímeros também podem ser agrupados quanto ao método de preparação. Isto é, polímeros de adição e polímeros de condensação. Quanto aos polímeros de adição, os monômeros ligam-se sem a perda de massa na forma de compostos de baixo peso molecular, e por isso, os monômeros são unidos e convertidos diretamente na cadeia polimérica. Quanto aos polímeros de condensação, a cadeia polimérica é formada a partir de reações entre duas ou mais espécies químicas, as quais liberam compostos de baixo peso molecular quando ocorre a polimerização da cadeia polimérica, por exemplo, a condensação de moléculas de água (Canevarolo, 2024).

No ano de 1912, o primeiro polímero totalmente sintético foi produzido a partir da reação de condensação entre moléculas de fenol e formaldeído, originando a resina Baquelite. Entretanto, a produção e consumo em larga escala de polímeros sintéticos ganharam destaque

apenas a partir da década de 1950 por causa da industrialização, desenvolvimento econômico e o crescimento da população global (Chamas *et al.*, 2020). Entre esses materiais, os plásticos se destacam devido à diversidade de suas aplicações, à durabilidade, ao baixo custo e propriedades como leveza, resistência mecânica, estabilidade química e hidrofobicidade. Contudo, tais características, quando aliadas à produção em massa e o consumo irresponsável desses recursos recalcitrantes (baixa biodegradabilidade), resultaram na problemática da poluição plástica (Anjana *et al.*, 2020; Ghatge *et al.*, 2020).

Na década de 1950, o mundo produziu cerca de 2 milhões de toneladas de plásticos por ano. Hoje, as projeções indicam que, até 2050, essa produção poderá chegar a impressionantes 590 milhões de toneladas anuais. Ao mesmo tempo, estima-se que 76% de todo plástico produzido se torne lixo e desses, apenas 9% são reciclados e 40% incinerados (Gilani *et al.*, 2023; Zaini *et al.*, 2024). Esses resíduos podem ser classificados por tamanho: macrolásticos (maiores que 25 mm), mesoplásticos (entre 5 e 25 mm);  $\mu$ Ps (entre 20  $\mu$ m e 5 mm) e nanoplásticos (nPs, abaixo de 20  $\mu$ m). O tamanho dessas partículas justifica a disseminação ubíqua dessa poluição pelos ecossistemas e seus acúmulos das “manchas de macrolásticos” nos oceanos a contaminação por  $\mu$ Ps nos organismos (Pilapitiya; Ratnayake, 2024).

A dispersão dos  $\mu$ Ps e nPs na natureza se torna uma problemática global paralela a poluição macrolástica e dela, dependente. Isto é, os  $\mu$ Ps podem surgir de duas origens: uma origem primária, a qual engloba tanto os resíduos da produção quanto o consumo de microprodutos plásticos e, uma origem secundária, os  $\mu$ Ps formados a partir da degradação de macrolásticos na natureza. Estes  $\mu$ Ps contaminam águas superficiais e profundas de oceanos, lagos, manguezais, estuários, praias, solos cultiváveis e a atmosfera. E a partir desses, eles são receptados pelos organismos quando ingeridos, inalados ou expostos dermicamente (Lalrinfela *et al.*, 2024). Os efeitos tóxicos que os  $\mu$ Ps podem causar nos organismos ainda não são completamente conhecidos pela literatura científica. Ainda assim, alguns estudos apontam para desordens metabólicas e processos inflamatórios gastrointestinais em organismos aquáticos. Ao mesmo tempo, a aspiração de partículas finas de  $\mu$ Ps pode estar relacionada a doenças respiratórias crônicas, doenças cardíacas e o desenvolvimento de lesões pré-neoplásicas ou cancerosas no tecido pulmonar. Enquanto a ingestão pode acarretar em toxicidade química, física e/ou biológica. Além disso, os  $\mu$ Ps podem estar associados a outros poluentes orgânicos persistentes (POPs) como quando adsorvem agrotóxicos e antibióticos, metais tóxicos como Cr, Co, Ni, Cu, Zn, Cd, Pb, As, Mn e Fe, metalóides e outros aditivos usados na sua fabricação como plastificantes e corantes. Os quais podem cooperar com a

toxicidade dos  $\mu$ Ps e bioacumulados na natureza podem acarretar em estresse oxidativo, estímulo da imunidade inata, neurotoxicidade, citotoxicidade, toxicidade reprodutiva, mudanças fisiológicas e desnutrição em peixes, aves, seres humanos e outros animais (Bai *et al.*, 2022; Rakib *et al.*, 2023; Deo; Benjami; Osborne, 2024).

Bandara *et al.* (2024) descrevem ainda alterações nos ciclos biogeoquímicos do carbono, nitrogênio, fósforo e enxofre causadas pela estrutura dos hidrocarbonetos, estresse e morte de bactérias fixadoras, assim como, a inativação de fosfatases. E as plantas cultivadas nesses solos contaminados adquirem limitações de performance e desenvolvimento como a supressão de genes de crescimento, bloqueio da fotossíntese e a redução da captação de água e sais minerais (Devi *et al.*, 2023).

Além da contaminação sistêmica e da redução da produtividade dos solos agrícolas, Villarrubia-Gómez *et al.* (2024) destacam que os plásticos contribuem significativamente para as mudanças climáticas e a acidificação dos oceanos ao longo de todo o seu ciclo de vida, da extração de combustíveis fósseis à degradação ambiental. A produção de plásticos é responsável por cerca de 5,3% das emissões globais de gases de efeito estufa, podendo alcançar 4,3 gigatoneladas de CO<sub>2</sub> e por ano até 2060. Sua degradação libera metano, etileno e CO<sub>2</sub>, reduz o albedo terrestre e marinho, acelera o derretimento polar e altera fluxos biogeoquímicos, contribuindo para a acidificação oceânica e desequilíbrios nos ciclos de carbono e nutrientes.

Segundo Li *et al.* (2024), os  $\mu$ Ps impactam profundamente os ciclos do carbono e do nitrogênio, aumentando as emissões de CO<sub>2</sub> e N<sub>2</sub>O, modificando a atividade microbiana e enzimática e alterando a disponibilidade de nutrientes em solos e ambientes aquáticos. De forma complementar, Parvez *et al.* (2024) destacam que os  $\mu$ Ps contribuem para o aquecimento global em todas as etapas de seu ciclo de vida, produção, transporte, uso, descarte e degradação. Na hidrosfera, comprometem os ecossistemas de carbono azul, reduzindo o armazenamento de carbono e promovendo desoxigenação oceânica; na litosfera, alteram as propriedades do solo, reduzem a produtividade vegetal e intensificam as emissões de gases de efeito estufa.

Os polietilenos são homopolímeros de composição química simples, isto é, são formados por somente um monômero, o etileno (ou eteno), assim como, podem ser caracterizados como termoplásticos. Outra classificação dos PEs diz respeito à sua densidade, isto é, quando nomeados a partir da estrutura de hidrocarbonetos e suas ramificações. Os PEs mais comuns são o polietileno de baixa densidade (PEBD), o polietileno de alta densidade (PEAD) e o polietileno linear de baixa densidade (PELBD) (Montazer *et al.*, 2020).

Eles figuram entre os primeiros plásticos sintetizados em escala industrial a partir do refino do petróleo. Devido à sua ampla produção e ao elevado consumo global, esses materiais constituem uma das principais fontes de poluição macroplástica e microplástica nos ecossistemas aquáticos. Estima-se que o polietileno represente cerca de 80% das partículas microplásticas detectadas nos oceanos, conforme dados do Banco de Dados de  $\mu$ Ps Marinhos da NOAA (Burelo *et al.*, 2023; Hossaine Engelhardt, 2025).

Ao mesmo tempo, os estudos de degradação de plásticos, incluindo os polietilenos, consideram esses materiais como substratos complexos para a atuação da maquinaria de decomposição microbiana. Desse modo, a biodegradação de plásticos e  $\mu$ Ps constitui um dos principais desafios ambientais contemporâneos, devido às suas características químicas e estruturais recalcitrantes. Os plásticos convencionais derivados do petróleo apresentam cadeias poliméricas longas, elevado peso molecular, alta cristalinidade e hidrofobicidade, além de escassez de grupos funcionais reativos e ligações hidrolisáveis, fatores que os tornam inadequados tanto para a adesão microbiana quanto para a ação enzimática (Cai *et al.*, 2023).

## 2.2 BIODEGRADAÇÃO

Aterros sanitários, incineração, decomposição física e química para a reciclagem são alguns dos métodos utilizados no enfrentamento da poluição plástica. Entretanto, tais abordagens não podem ser consideradas ecologicamente seguras. Os aterros sanitários podem contaminar o solo e aquíferos subterrâneos; a incineração libera gases de efeito estufa e aerossóis na atmosfera; e a decomposição física ou química frequentemente gera subprodutos tóxicos durante o beneficiamento do lixo plástico (Gilani *et al.*, 2023; Pilapitiya; Ratnayake, 2024). Dessa forma, a biodegradação, isto é, a utilização de microrganismos (como bactérias, algas e/ou fungos) como agentes decompositores, têm sido alvo de intensa pesquisa biotecnológica nos últimos anos devido à sua capacidade de, sob condições de processo amenas, converter resíduos plásticos em compostos de valor agregado, tais como biopolímeros, ácidos orgânicos, metano e biomassa microbiana (Liu *et al.*, 2022). Esse processo apresenta-se como uma alternativa sustentável, pois minimiza o impacto ambiental, reduz a necessidade de energia e evita a formação de subprodutos tóxicos, desvantagens comuns em outros métodos convencionais (Rezaei; Dinani; Moghimi, 2024).

O processo de biodegradação de macrolásticos e  $\mu$ Ps podem ser didaticamente distinguidos, no mínimo, a partir de três etapas. Essas etapas são semelhantes para plásticos e microrganismos diferentes. Isto é, de maneira geral, o processo envolve a colonização do substrato plástico, seguida da sua degradação metabólica, resultando na conversão das cadeias poliméricas em produtos mais simples e ambientalmente compatíveis (Roy; Chakraborty, 2024). A eficiência desse processo depende da cristalinidade, tamanho das partículas e presença de grupos funcionais sensíveis, isto é, características do material plástico que influenciam na atuação das enzimas microbianas, biomoléculas essenciais para a remediação ambiental e biotransformação ecológica (Cai *et al.*, 2023; Ihsanullah *et al.*, 2024).

### **2.2.1 Adesão seguida de colonização**

A biodegradação inicia-se com a adesão dos microrganismos à superfície do polímero. Em Ff, essa adesão é mediada por hidrofobinas, pequenas proteínas anfífilas que apresentam regiões hidrofóbicas e hidrofílicas, permitindo a ancoragem das células microbianas ao substrato polimérico. Essa etapa é fundamental para o estabelecimento da colonização microbiana, caracterizada pela formação de biofilmes e de microambientes favoráveis às etapas subsequentes do processo de degradação (Khatua; Simal-Gandara; Acharya, 2024).

### **2.2.2 Deterioração ou Fragmentação**

Através da colonização, os microrganismos secretam enzimas extracelulares e/ou exoenzimas associadas à membrana celular, capazes de romper e modificar as ligações químicas da estrutura polimérica. A ação dessas enzimas leva ao enfraquecimento do substrato plástico, promovendo alterações nas propriedades físicas, químicas e mecânicas do material. Conseqüentemente, os macrolásticos são fragmentados em  $\mu$ Ps, que por sua vez são degradados em oligômeros, dímeros e monômeros (Bacha *et al.*, 2023).

Nesta etapa, atuam principalmente duas classes de enzimas: oxirredutases (EC 1) e hidrolases (EC 3). Dentre as oxirredutases, destacam-se as lacases e peroxidases (como a manganês peroxidase – MnP e a lignina peroxidase – LiP), que introduzem oxigênio nas cadeias de hidrocarbonetos do polímero, originando estruturas oxigenadas, como grupos carbonila (C=O). Por outro lado, as hidrolases, como glicosidases, celulasas, pectinases, hemicelulasas, cutinases, lipases e proteases, clivam a estrutura de hidrocarbonetos e hidrolisam as estruturas oxidativas formadas pelas oxirredutases (Temporiti *et al.*, 2022). Essa

maquinaria enzimática despolimeriza as cadeias do polímero a fim de que a partir do substrato plástico, estruturas químicas possam ser formadas e integradas ao metabolismo microbiano.

### 2.2.3 Assimilação seguida de Mineralização

As estruturas modificadas pela maquinaria enzimática microbiana são assimiladas por essa maquinaria biológica, isto é, os oligômeros, dímeros e monômeros resultantes da fragmentação enzimática são processados por enzimas extracelulares e intracelulares (após permearem a membrana) e integrados como intermediários de outras vias metabólicas (Ghatge *et al.*, 2020). As quais, originam produtos metabólicos finais mais simples e ambientalmente menos recalcitrantes. Por exemplo, Amobonye *et al.* (2021) citam duas propostas da literatura científica para os intermediários da fragmentação do polietileno: a formação de ácido acético a partir do acetil-CoA no ciclo de Krebs e/ou a obtenção de diferentes ácidos graxos. Além disso, Roy e Chakraborty (2024) destacam que o processo e os produtos finais da degradação dependem do tipo de polímero (por exemplo, sua composição química, arranjo estrutural e a possibilidade de pré-tratamento do material), do microrganismo, condições ambientais (por exemplo, pH e a quantidade de oxigênio) e a disponibilidade de outros nutrientes. Ainda assim, o processo de biodecomposição tende, a partir do macrolástico ou  $\mu$ Ps de interesse, a liberar, como produtos finais do metabolismo, compostos químicos orgânicos e inorgânicos menos recalcitrantes, como CO<sub>2</sub>, CH<sub>4</sub>, água e biomassa microbiana (Carmen, 2021; Cai *et al.*, 2023).

## 2.3 DECOMPOSIÇÃO DE POLIETILENO POR FUNGOS FILAMENTOSOS (2020-2025).

Há um evidente avanço nos estudos relacionados à utilização de Ffs na decomposição do polietileno (PE) e de outros tipos de plásticos. As pesquisas iniciais se concentraram principalmente no uso de filmes de PE como substrato, tanto em meios sólidos quanto líquidos, com o objetivo de avaliar a degradação do material polimérico. Nesses trabalhos, as análises realizadas após o cultivo fúngico restringiam-se, em grande parte, às alterações físico-químicas do polímero (Lee *et al.*, 1991; Yamada-Onodera *et al.*, 2001; Zahra *et al.*, 2010; Balasubramanian *et al.*, 2014; Das; Kumar, 2014; Awasthi *et al.*, 2017). As metodologias mais comuns incluíam a medição da quantidade de plástico residual, a determinação da força tênsil do material ( $\sigma$ ), além do uso frequente de microscopia eletrônica de varredura (MEV) e espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR).

Contudo, a partir de 2015, a decomposição de PE passa a receber uma abordagem mais biológica. Os conceitos bioquímicos que fornecem o suporte teórico para a degradação por microrganismos começam a ser integrados aos fundamentos da ciência de materiais. Nesse contexto, além da diversificação das técnicas de microscopia (como microscopia de força atômica – MFA e microscopia eletrônica de transmissão – MET), espectroscopia (como RAMAN, NMR e ATR-FTIR), análises térmicas (TGA, DSC), observa-se a aplicação crescente das ciências ômicas. Entre estas, destacam-se a caracterização da produção enzimática microbiana, análises cromatográficas de metabólitos, simulações de *docking* e dinâmica molecular, bem como a identificação de potenciais decompositores por meio de estratégias de triagem genética (Bernat *et al.*, 2023; Hoang *et al.*, 2024).

Quanto aos procedimentos microbiológicos, a Tabela 1 apresenta certas tendências observadas entre os pesquisadores e grupos de trabalho em estudos recentes sobre a degradação de polietilenos por fungos filamentosos. Observa-se uma preferência pelo uso de microrganismos isolados de ambientes contaminados por plásticos, como lixões, aterros sanitários, manguezais e resíduos plásticos recuperados do oceano. Esses microrganismos são frequentemente avaliados quanto a presença de alguma característica de interesse, por exemplo, a produção de enzimas específicas ou a capacidade de biodegradação preliminar, antes da realização do cultivo de degradação prolongado, geralmente em meio líquido.

Esse cultivo de longa duração, entre 30 e 90 dias, costuma ser desenvolvido em variações de meios salinos restritos em carbono visando direcionar o metabolismo fúngico (Tabela 2). Durante esses cultivos, o perfil de algumas enzimas de interesse (oxirredutases e hidrolases) e/ou o material plástico é analisado quanto a alterações físico-químicas e estruturais, com o objetivo de determinar a extensão e o mecanismo da biodegradação.

Tabela 1 - Estudos sobre a degradação de polietileno por fungos filamentosos (2020 - 2025), continua.

Isolamento	Seleção	Decompositores	Pré-tratamento	Polímero	Configurações	Enzimas	Referências*
Vísceras da traça <i>Galleria mellonella</i> (alimentadas com filmes de PE)	Meios de aclimação, BDA, Ágar e Caldo restritos em carbono contendo $\mu$ Ps de PEBD ou PEAD	<i>A. flavus</i>	Não	Caldo Salino com restrição de carbono com $\mu$ Ps de PEAD (< 200 $\mu$ m)	30 dias	Lacase LCMOs	1
-	-	<i>T. lanuginosus</i>	Sim	Caldo Mineral com restrição de carbono suplementado com filmes de PEBD (16 cm <sup>2</sup> e 8 $\mu$ m de espessura)	120 rpm 45° C 30 dias	-	2
-	-	Co-cultura: <i>A. niger</i> <i>A. oryzae</i> <i>A. flavus</i>	Não	Caldos Czapek, Czapek restrito ou Batata com tiras de sacos plásticos de PEBD (4 ou 9 cm <sup>2</sup> ), Tween 80 foi usado nos ensaios com “aditivo”	20, 30 e 45 dias	-	3
Aterros sanitários	Ágar Salino, Ágar Czapek (sem glicose) com 3% de filmes de pretos de PEBD e Caldos Salinos com filmes de PEBD	Co-cultura: <i>A. fumigatus</i> <i>A. carbonarius</i>	Sim	Caldo salino com filmes de PEBD tratados (4 cm <sup>2</sup> )	pH 7 28 °C 120 rpm 15 dias	Lacase MnP	4

Tabela 1 - Estudos sobre a degradação de polietileno por fungos filamentosos (2020 - 2025), continuação.

Isolamento	Seleção	Decompositores	Pré-tratamento	Polímero	Configurações	Enzimas	Referências*
-	Caldo Czapek (sem sacarose) com filmes de PEBD	<i>D. italiana</i> <i>T. jaczewskii</i> <i>C. fructicola</i> <i>S. citrulli</i>	-	Caldo salino com filmes de PEBD (4 cm <sup>2</sup> )	27 °C Estático pH 7 30, 60 e 90 dias	Lacase MnP LiP	5
Aterro sanitário abandonado	Caldo Czapek com 1% de óleo mineral, EMA, Meio salino com µPs de PE e Ágar Czapek com µPs de PE	<i>A. fructus</i> <i>F. falciforme</i> <i>F. oxysporum</i> <i>P. lilacinum</i>	Não	Ágar salino com filmes de PE (400 µm, 2 × 2 cm)	30 dias	-	6
Solo de depósitos de resíduos	-	<i>A. niger</i> <i>A. flavus</i> Podridão branca Podridão preta <i>Penicillium sp.</i>	Sim	Caldo salino com filmes de PE (2 × 2 cm)	30 dias 28 °C 150 rpm	-	7
-	-	<i>A. aegerita</i>	Sim	Ágar salino com filmes de PE (500 µm, 10 × 10 cm) feitos a partir da mistura de PE com ácido oléico	30 dias 26 °C 70-80% UR	-	8
-	-	<i>Cephalosporium sp.</i>	Sim	Caldo salino com filmes poliméricos (PS ou PE)	56 dias 120 rpm 28 °C	-	9
Solo de depósitos sanitários	-	<i>Rhizopus sp.</i>	Não	Ágar e Caldo salinos com filmes de PEBD (50 µm de espessura e 0,2; 0,4 e 0,6 g)	10-30 dias	-	10

Tabela 1 - Estudos sobre a degradação de polietileno por fungos filamentosos (2020 - 2025), continuação.

Isolamento	Seleção	Decompositores	Pré-tratamento	Polímero	Configurações	Enzimas	Referências*
-	Ágar salino com filmes de PEBD	<i>N. phangngaensis</i>	Sim	Caldo salino com filmes de PEBD (1,0 × 4,0 cm, 0,11 mm)	30, 60 e 90 dias	Lacase MnP LiP	11
Manguezal e Plantas associadas a manguezais	-	<i>C. globosum</i> <i>D. eschscholtzii</i> <i>N. occulatum</i> <i>P. chryso sporium</i> <i>S. commune</i> <i>X. feejeensis</i>	Não	Caldo salino com filmes de LDPE (10 × 3 cm, 375 µm de espessura)	pH 7 21 dias 28 °C 150 rpm	Lacase MnP LiP Amilase Lipase Esterase	12
Lixo plástico de aterros sanitários	AN e BDA suplementados com PVC ou PE pulverizados	Dos fungos, <i>A. niger</i> <i>A. glaucus</i>	Não	Caldo salino com filmes de PVC ou PE (2 × 2 cm)	30 dias 150 rpm	-	13
-	-	<i>Cephalosporium sp.</i>	Sim	Caldo salino com filmes de PEBD ou PEAD (4 × 4 cm)	56 dias 28 °C 120 rpm	-	14
Vísceras de larvas contaminando favos de cera de abelha	LBA, Ágar Cera de Abelha, Ágar PE e LBA suplementado com PEAD pulverizado	<i>C. halotolerans</i>	Não	Caldo LB com PEAD pulverizado 1% (m/v)	15 dias 30 °C	Oxirredu tases (Lacase)	15
Solo de aterros sanitários misturadas com fragmentos de plástico durante 100 dias	Ágar Microcarbonado (MCA) e Ágar Salino suplementados com µPs de PEBD	<i>C. basi-inflatum</i>	Sim	Caldo salino (MSM) com filmes de PEBD	30 dias 30 °C	Lacase	16

Tabela 1 - Estudos sobre a degradação de polietileno por fungos filamentosos (2020 - 2025), continuação.

Isolamento	Seleção	Decompositores	Pré-tratamento	Polímero	Configurações	Enzimas	Referências*
Solo de de aterros sanitários	Czapek Dox Ágar e Ágar salino (suplementado com PEBD pulverizado)	<i>P. citrinum</i>	Sim	Caldo salino com filmes de PEBD (4 × 3 cm)	Estático 15-90 dias 28 °C	Lacase, Esterase, Lipase MnP	17
Madeira em decomposição	PDA (suplementado com antibióticos) com fragmentos de madeira (5 × 5 cm) e Caldo salino de Swe (2015) com fragmentos de mogno (4 meses)	<i>P. flavidoalba</i>	Não	Caldo salino de Swe (2015) com filmes de PEBD (2 × 10 cm × 37,5 µm), fragmentos de mogno foram usados nos ensaios com “aditivos”	45 dias 28-30 °C	Lacase MnP Lip	18
Fragmentos de plásticos coletados de campos agrícolas	PDA (suplementado com antibióticos) com fragmentos de PEBD (5 × 5 mm)	<i>C. cladosporioides</i>	Não	Discos de PEBD (5,5 cm) umedecidos com caldo salino	90 dias	-	19
Solo de aterros sanitários	Grânulos de PE ou PP em solução salina (com antibióticos)	<i>F. solani</i> , <i>F. oxysporum</i> <i>Fusarium sp.</i> <i>L. araneicola</i> <i>T. lixii.</i>	Sim	Grânulos de PE ou PP em solução salina (com antibióticos)	30-90 dias	-	20
Sedimentos de manguezal	-	<i>Aspergillus sp.</i> <i>Aspergillus sp.</i> <i>Aspergillus sp.</i> <i>T. pseudokonigii</i>	Não	Caldo salino com µPs de PEBD	28 dias 150 rpm 30 °C	Lacase	21

Tabela 1 - Estudos sobre a degradação de polietileno por fungos filamentosos (2020 - 2025), continuação.

Isolamento	Seleção	Decompositores	Pré-tratamento	Polímero	Configurações	Enzimas	Referências*
Lagos	Ágar salino com $\mu$ Ps de PE, PU, RU ou filmes de PEBD (1 $\times$ 1 mm)	<i>F. tricinctum</i> <i>F. solani</i> <i>Psathyrella sp.</i> <i>T. harzianum</i> <i>B. cinerea</i> <i>C. tenuissimum</i> <i>C. herbarum</i> <i>C. cladosporioides</i> <i>P. brevicompactum</i> <i>P. crustosum</i> <i>S. boydii</i> <i>C. tenellum</i> <i>Hongkongmyces sp.</i> <i>A. alternata</i> <i>M. marginalis</i>	Não	Caldo salino com $\mu$ Ps de PE, PU, RU (10 g $\cdot$ L <sup>-1</sup> ) ou filmes de PEBD (1 $\times$ 1 mm)	~ 90 dias 150 rpm 28 °C	-	22
Solo de aterros sanitários	Ágar e Caldo salinos com tiras de PEAD	<i>T. liani</i>	Não	Caldo salino otimizado com tiras de PEAD (0,5 g)	15-90 dias 160 rpm 28 °C	Lacase MnP LiP	23
Solo de manguezal	-	<i>niger</i>	Não	Caldo salino Bushnell Haas (BHC) com PEAD pulverizado	30 dias 25 °C 120 rpm	-	24
Solo de aterros sanitários	Caldos Batata (BDC) e Czapek Dox (CDC) modificados e suplementados com pellets de PEBD	<i>T. purpureogenus</i>	Sim	Ágar Batata modificado (mBDA) e Ágar Bushnell Haas (BHA) com tiras de PEBD (5 $\times$ 5 mm)	15-90 dias 28 °C	-	25

Tabela 1 - Estudos sobre a degradação de polietileno por fungos filamentosos (2020 - 2025), última parte.

Isolamento	Seleção	Decompositores	Pré-tratamento	Polímero	Configurações	Enzimas	Referências*
-	-	<i>A. niger</i> <i>C. albicans</i> <i>A. sclerotigenum</i> Co-cultura	Não	Sabouraud Dextrose Caldo com $\mu$ Ps de PE, PET ou PS	30 dias 37 °C 120 rpm pH 7	-	26
Coleção de Microrganismos (UAL), isolados a partir de diferentes plastíferas	Ágar Nutriente com filmes de PELBD (1 cm <sup>2</sup> )	Co-cultura fúngica: <i>B. subtilis</i> <i>F. oxysporum</i> <i>A. alternata</i>	Não	Caldo salino com $\mu$ Ps de PEBD, PELBD, PET ou PS (virgens ou reciclados, < 2 mm)	30 °C 120 rpm 30 dias	Lipase Cutinase Lacase PO	27
Resíduos plásticos de aterros sanitários e corpos de água contaminados	Caldo Batata Dextrose com PEBD 0,5% (m/v) e Ágar PEDB 0,5% (m/v)	<i>C. sphaerospermum</i>	Não	Caldo Batata Dextrose com filme de PEBD (2 × 2 mm)	Estático 35 °C 7 dias	Hidrolases Lacase MnP LiP	28
Amostras de solo contaminadas	Caldo salino com PEBD pulverizado e Ágar salino com filmes de PEBD	<i>Alternaria sp.</i> <i>Trametes sp.</i> Co-cultivo	Sim	Caldo salino com filmes de PEBD (3 × 3 mm)	150 rpm 30 °C 30 dias	Lacase	29
-	-	<i>P. ostreatus</i> <i>A. bisporus</i>	Sim	Ágar salino com filmes de PEBD (1 cm <sup>2</sup> )	90 dias 28 °C 90% UR	-	30
-	BDA e Czapek Dox Ágar suplementados com reagentes colorimétricos (guaiacol, Brilliant Blue R e fenol vermelho)	<i>S. commune</i> <i>L. sajor-caju</i>	Não	Caldo Batata Dextrose com filmes de PELBD (3 × 3 mm)	30 dias 25-29 °C	Lacase MnP LiP	31

Fonte: Autor (2026),

Legenda: \* Os números apresentados correspondem às referências bibliográficas identificadas com os mesmos números sobrescritos na lista de referências.

Tabela 2 - Comparação da composição de meios de cultivo restritos em carbono.

Componente Salino	Sowmya <i>et al.</i> , 2014	Das; Kumar, 2014	Das <i>et al.</i> , 2018	Satti <i>et al.</i> , 2020	Spina <i>et al.</i> , 2021 (2016)	Mohamed <i>et al.</i> , 2022	Chien <i>et al.</i> , 2022	Khan <i>et al.</i> , 2023	Gong <i>et al.</i> , 2023
<b>CaCl<sub>2</sub> · 2 H<sub>2</sub>O</b>	-	0,002	0,002	0,002	0,02	0,05	-	0,002	0,1
<b>CuSO<sub>4</sub> · 5 H<sub>2</sub>O</b>	-	0,001	0,001	-	-	-	-	0,001	-
<b>Fe<sub>2</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>3</sub> · 6 H<sub>2</sub>O</b>	-	0,01	0,01	-	-	-	-	0,01	-
<b>FeCl<sub>3</sub></b>	-	-	-	-	0,05	-	-	-	-
<b>FeSO<sub>4</sub> · 7 H<sub>2</sub>O</b>	-	-	-	0,001	-	0,05	0,002	-	0,01
<b>H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub></b>	-	0,005	0,005	-	-	-	-	0,005	-
<b>K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub></b>	5	1	1	0,5	1	2,5	-	1	-
<b>KCl</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	0,15
<b>KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></b>	-	0,2	0,2	0,04	1	0,2	0,7	2	1
<b>MgSO<sub>4</sub> · 7 H<sub>2</sub>O</b>	0,2	0,5	0,5	0,02	0,2	0,1	0,7	0,5	0,2
<b>MnSO<sub>4</sub> · H<sub>2</sub>O</b>	-	-	0,001	-	-	-	0,001	0,001	0,001
<b>Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub></b>	-	-	-	-	-	-	-	-	1,5
<b>NaCl</b>	1	1	1	0,1	-	0,5	0,005	1	-
<b>NH<sub>4</sub>Cl</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	2
<b>NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub></b>	3	-	-	-	1	-	1	-	-
<b>(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></b>	-	1	1	0,2	-	1	-	1	-
<b>ZnSO<sub>4</sub> · 7 H<sub>2</sub>O</b>	-	0,001	0,001	-	-	-	0,002	0,001	0,1

Fonte: Autor (2026).

Além disso, a Tabela 1 evidencia a tendência recente de utilização de  $\mu$ Ps de PE, os quais passaram a ser empregados como alternativa e/ou em conjunto com os filmes tradicionalmente utilizados, refletindo uma diversificação nas abordagens experimentais de biodegradação. Além disso, o uso de polietilenos tratados ou não tratados é relevante. De maneira geral, esses pré-tratamentos podem ser químicos, por exemplo, imersão em xilana para induzir a ação de hidrolases ou enfraquecimento com ácidos antes do cultivo prolongado, ou físicos, como aquecimento ou radiação UV, mimetizando as condições às quais os plásticos e  $\mu$ Ps são submetidos quando dispersos na natureza.

Nota-se ainda que, dentre os 31 trabalhos recentes analisados, aproximadamente 64% foram conduzidos por pesquisadores e instituições de pesquisa do continente asiático (China, Coreia do Sul, Índia, Tailândia, Malásia, Paquistão e Sri Lanka). Em seguida, destaca-se a Europa (Itália, Espanha, Polônia, Alemanha, Portugal, Suécia), responsável por cerca de 28% das publicações da Tabela 1. Os trabalhos restantes pertencem aos outros continentes (África, Américas e Oceania), dentre esses, o trabalho de Aguiar *et al.* (2024) figura como o único representante do continente americano. Observa-se ainda que, embora haja convergência metodológica entre os estudos analisados, estes evidenciam a urgente necessidade de ampliar a cooperação internacional, especialmente entre países em desenvolvimento, como se reflete no protagonismo asiático. Tal cooperação é essencial para direcionar e fortalecer o avanço tecnológico da biorremediação da poluição plástica, promovendo uma produção científica mais equitativa e globalmente sustentável.

### 3 JUSTIFICATIVA

O presente trabalho se insere no estado da arte apresentado e busca contribuir para o avanço desse campo, dialogando com os progressos alcançados nos últimos 15 anos em pesquisas voltadas à mitigação dos efeitos da poluição plástica, em suas formas macro e micro, por meio da utilização de fungos filamentosos como alvos biotecnológicos para a decomposição desses poluentes.

Embora existam estudos relevantes na literatura recente, ainda assim, em sua maioria os experimentos e análises ainda se encontram em estágios embrionários, apresentando diversas lacunas (algumas das quais este trabalho pretende contemplar), sobretudo no que se refere à definição de padrões para aquisição de dados. Essa limitação dificulta a comparação e validação de resultados. Nesse sentido, este projeto propõe o desenvolvimento de um protocolo preliminar que seja acessível a outros grupos de pesquisa, favorecendo o alinhamento metodológico e viabilizando, futuramente, a construção de uma base de metadados robusta.

A seleção de fungos filamentosos, a elaboração de um protocolo experimental preliminar e a validação da ação decompositora se configuram como três ações fundamentais e interdependentes para o avanço de futuras tecnologias associadas à aplicação de processos enzimáticos na biodegradação de polietileno de baixa densidade (PEBD). Essas ações contribuem, assim, tanto para a mitigação da poluição plástica quanto para o desenvolvimento de processos alternativos e circulares voltados ao tratamento de resíduos industriais, alinhando o presente projeto à Agenda 2030 proposta pela Organização das Nações Unidas (ONU), especialmente 5 dos 17 Objetivos para o Desenvolvimento Sustentável (ODS): 9 (Indústria, Inovação e Infraestrutura), 12 (Consumo e Produção Responsáveis), 13 (Combate às Alterações Climáticas), 14 (Vida na água) e 15 (Vida terrestre).

## 4 OBJETIVOS

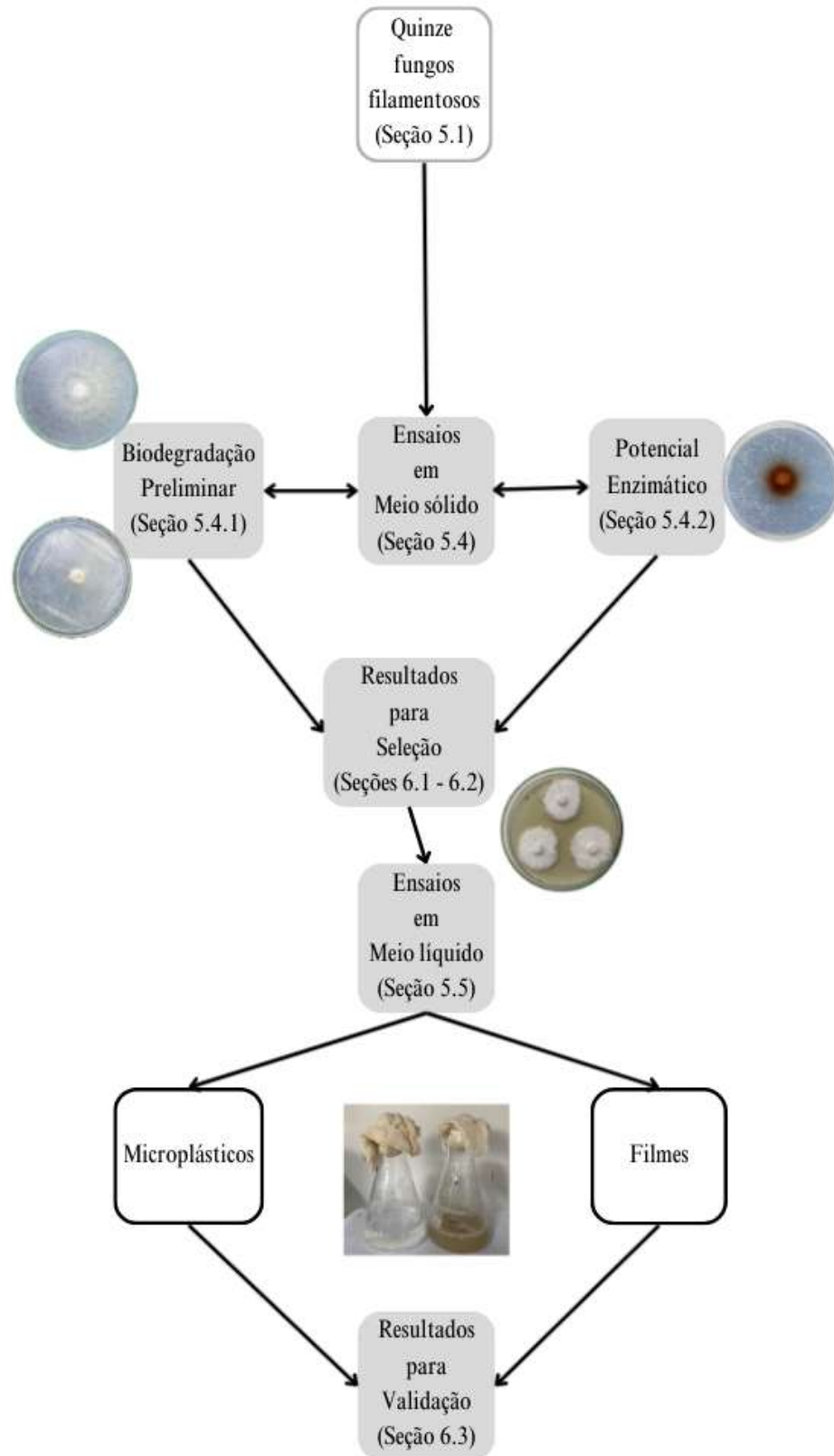
### 4.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver um protocolo para seleção de fungos filamentosos que possuam a capacidade de degradar polietileno de baixa densidade (PEBD) a ser usado em estudos futuros.

### 4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a. Avaliar, por meio de etapas em meios sólido, fungos filamentosos com capacidade de biodegradar filmes plásticos e microplásticos ( $\mu$ Ps) de polietileno de baixa densidade (PEBD);
- b. Realizar ensaios de decomposição de filmes e  $\mu$ Ps de PEBD em meio líquido utilizando o(s) fungo(s) filamentoso(s) selecionado(s) nas etapas de seleção anteriores, afim de validar a ação decompositora;
- c. Definir parâmetros preliminares para a biodegradação de PEBD (*p. ex.* o tempo mínimo de cultivo e a prospecção de atividades enzimáticas envolvidas na degradação).

Figura 1 - Fluxograma das etapas experimentais de seleção e validação realizadas neste trabalho.



Fonte: Autor (2026).

## 5 MATERIAIS E MÉTODOS

### 5.1 FUNGOS FILAMENTOSOS

#### 5.1.1 Culturas fúngicas

No presente estudo foram utilizados 15 fungos filamentosos (Tabela 3). Estas culturas fúngicas foram cedidas pelos Laboratórios de Micologia e Aplicações Biotecnológicas e Nanotecnológicas (IB - CLP - UNESP, São Paulo), Processos Biotecnológicos (ITEC - FEA - UFPA, Pará) e Tecnologia Enzimática e Bioprocessos (ICT - UNIFAL, Minas Gerais).

Tabela 3 - Ffs cedidos pelos laboratórios das universidades UNESP, UFPA e UNIFAL para esse trabalho.

Universidade	Nome científico	Código	Local de Isolamento
UNESP	<i>Aspergillus sp.</i>	<b>IBCLP20</b>	
	<i>Aspergillus sp.</i>	<b>AQ2A</b>	Manguezal/Apicum
	<i>Aspergillus sp.</i>	<b>AQ3A</b>	
	Não identificado	<b>RMP1</b>	
	Não identificado	<b>RMP3</b>	
	Não identificado	<b>RMP5</b>	
	<i>Colletotrichum sp.</i>	<b>ASP1</b>	Vegetação de região de Manguezal/Apicum
	<i>Diaporthe sp.</i>	<b>ASP2</b>	
	Não identificado	<b>ASP4</b>	
	<i>Colletotrichum apelinum</i>	<b>ASP6</b>	
	Não identificado	<b>ASP7</b>	
		Não identificado	<b>ASP9</b>
UFPA	<i>Fusarium fujikuroi</i>	<b>BAC</b>	Bacaba ( <i>Oenocarpus bacaba</i> )
	Não identificado	<b>CR04</b>	Cuia ( <i>Crescentia cujete L.</i> )
UNIFAL	<i>Aspergillus oryzae</i>	<b>IPT-301</b>	Micoteca

Fonte: Autor (2026).

Os fungos AQ2A e AQ3A foram adicionados como fungos de controle. Trabalhos anteriores (Aguiar *et al.*, 2024) selecionaram estes fungos como potenciais decompositores de polietileno e por isso, foram adicionados como microrganismos para comparação.

### 5.1.2 Manutenção e preservação das culturas fúngicas

Os isolados fúngicos foram inoculados em placas de Petri contendo meio batata dextrose ágar (BDA). Após 7 dias de incubação a 30 °C (DBO, TECNAL TE-371), três discos (cilindros de BDA com micélio fúngico periférico, Ø 5 mm) foram recortados a partir das placas de Petri, armazenados em microtubos estéreis de 2 mL de capacidade em seguida, os microtubos foram preenchidos com uma solução de glicerol 15 %. Os tubos foram dispostos em geladeira (ELETROLUX, DF50) a - 18 °C. Essa metodologia foi adaptada segundo as conclusões de Eichlerová (2025).

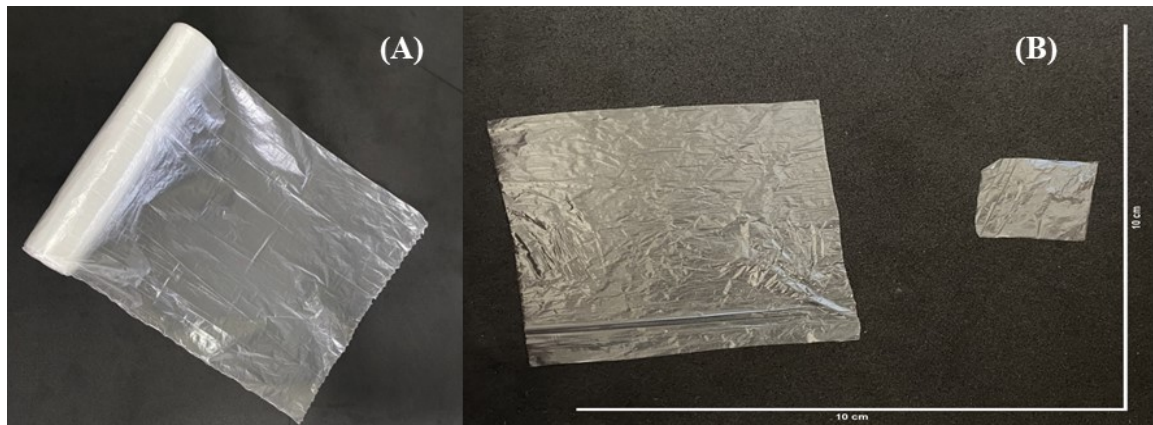
### 5.1.3 Inóculos

O preparo dos inóculos foi realizado a partir de um cilindro de cada microrganismo em BDA (preservado em glicerol, *Seção 5.1.2*). Este cilindro foi inserido de forma individualizada em placas de Petri preenchidas com meio BDA. Essas placas foram incubadas a 30°C (DBO, TECNAL TE-371) por um período de 7 dias e delas, cilindros de 5 mm de diâmetro foram obtidos como inóculos para os ensaios de seleção e biodegradação de PEBD.

## 5.2 PREPARO E ESTERILIZAÇÃO DOS FILMES E MICROPLÁSTICOS DE PEBD

Os filmes de PEBD de 36 cm<sup>2</sup> (6 × 6 cm) e 4 cm<sup>2</sup> (2 × 2 cm) foram obtidos a partir de sacos plásticos comerciais transparentes (Fig. 2). Em seguida, estes filmes de PEBD foram submersos individualmente em uma solução de álcool 70% e irradiados sob luz UV durante 30 minutos.

Figura 2 - Filmes plásticos de polietileno de baixa densidade (PEBD).

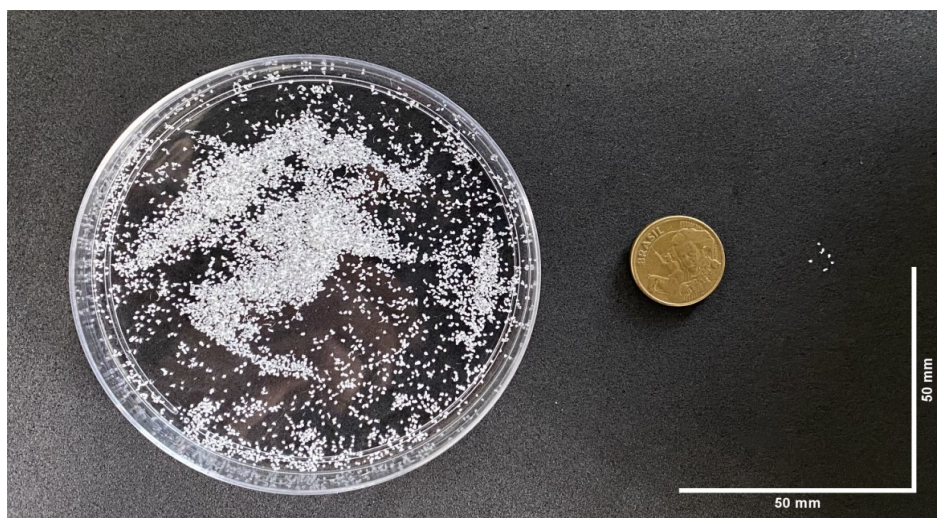


Fonte: Autor (2026).

Legenda: Bobina de sacos plásticos de PEBD comercial (A) e amostras de filme plástico com áreas de 36 cm<sup>2</sup> e 4 cm<sup>2</sup> (B).

Os  $\mu$ Ps de PEBD foram obtidos a partir de PEBD comercial (Fig. 3), reduzido mecanicamente. Essas partículas passaram por vibrador mecânico, composto por peneiras de diferentes granulometrias (500 - 63  $\mu$ m), operado a 3.600 rpm por 15 min. Destas, foram selecionados  $\mu$ Ps de PEBD com tamanho igual ou menor que 355  $\mu$ m em formato de microesferas, analisadas em estereoscópio (Hidalgo-Ruz *et al.*, 2012). Estes  $\mu$ Ps foram submersos em uma solução de álcool 70% e irradiados sob luz UV durante 30 minutos (Zahra *et al.*, 2010; Kang *et al.*, 2019; Sathiyabama *et al.*, 2024).

Figura 3 -  $\mu$ Ps de polietileno de baixa densidade (PEBD) com granulometria de ( $\leq$  355  $\mu$ m), apresentados junto a uma moeda de 10 centavos para referência de tamanho.



Fonte: Autor (2026).

### 5.3 MEIO DE CULTURA (MMSC)

O meio de cultivo utilizado neste trabalho seguiu a formulação descrita por Das *et al.* (2018) e Khan *et al.* (2023) para um meio mínimo mineral com restrição de carbono (MMSC) (Tabela 2). Essa composição consistiu em 0,005 g de ácido bórico ( $H_3BO_3$ ); 0,002 g de cloreto de cálcio ( $CaCl_2$ ); 1 g cloreto de sódio ( $NaCl$ ); 1 g de fosfato de potássio dibásico ( $K_2HPO_4$ ); 2 g de fosfato de potássio monobásico ( $KH_2PO_4$ ); 1 g de sulfato de amônia ( $(NH_4)_2SO_4$ ); 0,001 g de sulfato de cobre ( $CuSO_4$ ); 0,01 g de sulfato de ferro ( $Fe_2(SO_4)_3$ ); 0,5 g de sulfato de magnésio ( $MgSO_4$ ); 0,001 g de sulfato de manganês ( $MnSO_4$ ); 0,001 g de sulfato de zinco ( $ZnSO_4$ ); 1000 mL de água destilada e para os meios sólidos, 15 g de ágar bacteriológico. O pH do meio foi ajustado para  $7,2 \pm 0,2$ . Todos os meios foram esterilizados em autoclave a  $121\text{ }^\circ\text{C}$  por 20 minutos.

### 5.4 SELEÇÃO DE POTENCIAIS CULTURAS DECOMpositorAS DE PEBD

As quinze culturas fúngicas cedidas para este trabalho (*Seção 5.1.1*) foram empregadas em dois ensaios visando selecionar um fungo filamentosos a ser utilizado como uma potencial cultura decompositora de PEBD (*Seção 5.4*). O primeiro experimento consistiu na observação da interação de cada cultura fúngica com um filme de PEBD agarizado e o segundo, avaliou a secreção de uma classe de enzimas associadas à degradação do PEBD por fungos filamentosos (Tabela 1).

#### 5.4.1 Interação de cada fungo com um filme de PEBD

Um cilindro de 8 mm de diâmetro foi coletado a partir da área periférica de uma colônia de cada fungo previamente crescido em BDA (*Seção 5.1.3, Inóculo*). Esse disco foi colocado sobre um filme de polietileno (*Seção 3.2.*) centralizado sobre o meio de cultura restrito em carbono (*Seção 5.3.1*). As placas de Petri foram incubadas em estufa DBO (TECNAL, TE - 371) por 15 dias à temperatura de  $30\text{ }^\circ\text{C}$ . Após esse período, as placas de Petri foram registradas fotograficamente e os filmes de PEBD foram coletados para análises complementares de MEV e FTIR (*Seções 5.4.5 e 5.4.6*). Os ensaios foram realizados em triplicata.

### 5.4.2 Índice de potencial enzimático para oxirredutases

A inferência de potenciais enzimáticos é realizada a partir de zonas reveladas em meios sólidos indutores de determinada ação enzimática. Esses halos coloridos indicam a secreção de enzimas que modificam componentes do meio pela cultura microbiana (Porter *et al.*, 2023; Ansari *et al.*, 2024). Hankin e Anagnostakis (1975) propuseram uma resposta adimensional, indireta e semi-quantitativa denominada índice enzimático (IE) baseada na medição dessas zonas de coloração.

Com base nesses conceitos, a metodologia para detecção de oxidases (como lacases e peroxidases) foi adaptada de forma semelhante à utilizada por Sathiyabama *et al.* (2024) na seleção de leveduras com ação lignocelulolítica em cultivos com PEBD pulverizado. Em adição, potencial enzimático para enzimas da classe das oxidases, amplamente associadas à degradação de PE por Ffs (Tabela 1), foi avaliado.

O cultivo dos Ffs foi realizado de forma semelhante à etapa anterior (Seção 5.3.2). Um cilindro de 8 mm de diâmetro foi coletado da região periférica de colônias previamente cultivadas em BDA (Seção 5.1.3., *Inóculo*) e centralizado sobre o meio de cultivo. O meio (Seção 5.3.1) foi suplementado com uma solução de guaiacol (concentração de 0,01% no meio) e 5 g · L<sup>-1</sup> de  $\mu$ Ps de PEBD (Seção 5.2), misturados ao meio momentos antes do preparo das placas de Petri. As placas foram incubadas por um período de 4 dias (30 ± 1 °C). Após quatro dias de incubação, as colônias foram avaliadas quanto à atividade oxidativa, inferida pela oxidação do guaiacol (incolor) por enzimas como lacases e peroxidases, resultando em halos de coloração acobreada ou marrom no meio de cultura.

O ensaio foi realizado em triplicata para cada cultura fúngica. As placas foram submetidas a registro fotográfico, e as respostas semi-quantitativas foram obtidas com base na intensidade da coloração dos halos de atividade enzimática e na razão entre o diâmetro do halo e o diâmetro da colônia, medidas com auxílio de um paquímetro, conforme a equação:

$$\text{Índice Enzimático (IE)} = \frac{\text{Diâmetro do Halo Colorido (mm)}}{\text{Diâmetro da Colônia (mm)}} \quad (1)$$

## 5.5 ENSAIOS DE DEGRADAÇÃO EM MEIO LÍQUIDO

Os ensaios de decomposição de PEBD foram conduzidos em frascos Erlenmeyer de 250 mL, mantidos em agitador orbital (*shaker*, TECNAL TE-4200) sob agitação contínua a 120 rpm e temperatura de 30 °C, durante 28 dias. A cultura fúngica RMP5 foi selecionada como decompositora em potencial a partir das etapas de seleção acima (*Seções 5.3.2 e 5.3.3*) e utilizada como microrganismo de interesse biotecnológico dos ensaios em meio líquido.

Cada frasco receberá 50 mL de caldo salino (*Seção 5.3.1*), cinco discos fúngicos ( $\varnothing$  6 mm, *Seção 5.1.3*) e 5 g · L<sup>-1</sup> de plástico ( $\mu$ Ps ou tiras de PEBD, *Seção 5.2*).

Para ambos os ensaios ( $\mu$ Ps e filmes), as amostras foram preparados em triplicata, e controles abióticos e bióticos foram incluídos. Amostras de sacrifício foram retiradas a cada 4 dias, correspondendo aos tempos de incubação: 0, 4, 8, 12, 16, 20, 24 e 28 dias.

## 5.6 TÉCNICAS ANALÍTICAS

### 5.6.1 Biomassa fúngica e PEBD residual

O cultivo será analisado quanto ao crescimento da biomassa fúngica e a redução do material plástico. Isto é, após a coleta de cada tempo dos ensaios em meio líquido, as amostras foram filtradas em um sistema de filtração a vácuo (papel filtro qualitativo com porosidade de 45  $\mu$ m, funil de Buchner e kitassato) para a separação do caldo de cultivo.

Em seguida, o procedimento para realizar a separação entre o microplástico residual e a biomassa fúngica seguirá as etapas de centrifugação e ação de surfactante descrita na literatura recente para decomposição microbiana de polietileno e dela, adaptada (Gong *et al.*, 2023; Khan; Ali; Ali, 2023; Chaturvedi *et al.*, 2024; Nair *et al.*, 2024; Ong *et al.*, 2024; Salinas *et al.*, 2024; Sathiyabama *et al.*, 2024; Singh *et al.*, 2024; Yang *et al.*, 2024). A biomassa e os resíduos  $\mu$ Ps foram recuperados do filtro de papel e solubilizados em uma solução de dodecil sulfato de sódio (SDS) a 5% (m/v). A suspensão será mantida em repouso, no mínimo, por 24 horas, seguida de desagregação mecânica por ação de esferas de vidro em agitador de soluções (*vórtex*, PHOENIX LUTERCO AP-56). Em seguida, o material será centrifugado em centrífuga refrigerada (NOVATECNICA, modelo NT 815) a 4000  $\times$  g por 20 min. Após a centrifugação, a biomassa e os  $\mu$ Ps foram separados, lavados com água deionizada e filtrados utilizando aparato de Büchner. Os materiais recuperados (biomassa e microplástico residual) foram secos em estufa a 50 °C durante a noite para determinação do peso seco.

O procedimento de separação entre biomassa e filmes plásticos consistiu na lavagem com água destilada a fim de retirar a biomassa aderida. Em seguida, ambos foram secos em estufa a 50°C durante a noite para determinação do peso seco.

A redução plástica será expressa através da equação (b):

$$\text{Redução Plástica (\%)} = \frac{\text{Peso inicial do Plástico} - \text{Peso final do Plástico}}{\text{Peso inicial}} \times 100 \quad (2)$$

### 5.6.2 pH

O pH dos ensaios líquidos será mensurado utilizando pHmêtro de bancada TecnoPON™.

### 5.6.3 Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)

Alterações nos  $\mu$ Ps ( $\mu$ Ps) e filmes de PEBD (controles e residuais) foram avaliadas por espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR), com resolução de  $4 \text{ cm}^{-1}$  ( $4000$  a  $500 \text{ cm}^{-1}$ ). Dos espectros, índices químicos foram obtidos a partir da razão da integração das absorvâncias de bandas específicas para carbonilas ( $1850$ - $1650 \text{ cm}^{-1}$ ), “carbono-oxigênio” ( $1150$ - $950 \text{ cm}^{-1}$ ) e hidroxilas ( $3500$ - $3300 \text{ cm}^{-1}$ ) por uma banda de referência para o PE (estiramento do metileno,  $1500$ - $1420 \text{ cm}^{-1}$ ) (Almond *et al.*, 2020; Son *et al.*, 2024). Esses índices foram corrigidos pela resposta do controle, de modo a descontar quaisquer sinais de oxidação de fundo.

### 5.6.4 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A observação da morfologia dos microparticulados ( $\mu$ Ps) e filmes de PEBD (controles e residuais) foi realizada por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), utilizando um microscópio Leica/Cambridge S360. As amostras foram desidratadas por meio de lavagens sucessivas em soluções aquosas de etanol em concentrações crescentes (10%, 30%, 60%, 70% e etanol absoluto) e armazenadas em dessecador até o momento da análise. Antes da observação, as amostras foram metalizadas com ouro.

## 5.6.5 Ensaios Enzimáticos

### 5.6.5.1 *Tirosinases* (EC 1.14.18.1)

A quantificação da atividade de tirosinases (EC 1.14.18.1) foi adaptada a partir de Pomerantz e Murthy (1974), os quais consideraram as aplicações do sistema DOPA/DOPAcromo no estudo da oxidação de compostos fenólicos (Mason, 1948). O uso da L - tirosina como substrato da reação engloba duas atividades, monofenolases e difenolases (catecolases).

A quantificação foi realizada a partir da cinética de formação e oxidação da L-DOPA em DOPAcromo, monitorada espectrofotometricamente a 475 nm ( $\epsilon = 3700 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ). As misturas reacionais foram preparadas com 1500  $\mu\text{L}$  de uma solução de L - tirosina 20 mM em tampão Tris-HCl 50 mM (pH 7,5) e 1500  $\mu\text{L}$  do extrato enzimático, totalizando 3 mL de volume de reação; as amostras foram medidas em espectrofotômetro após 40 minutos de reação ao abrigo da luz e calor (Panke-Buisse *et al.*, 2020; Cha *et al.*, 2021; Salah *et al.*, 2021; Vetchinkina; Meshcherov; Gorshkov, 2022; Sowjanya; Girijasankar, 2023; Kim; Yang; Kang, 2024). Controles específicos foram utilizados para corrigir a absorbância (amostra, tampão e substrato). A água destilada foi utilizada como branco no espectrofotômetro (BEL Photonics, modelo UV-M51). A equação (c) foi aplicada para o cálculo da atividade enzimática:

$$\textit{Atividade Enzimática (Unidade por L, U/L)} = \frac{(\Delta Abs * V * 10^6)}{(\epsilon * d * v * \Delta t)} * FD_{amostra} \quad (c)$$

U = Unidade Enzimática Internacional (U/L), liga-se a Molaridade em Litros

$\Delta Abs$  = Diferença entre absorbâncias (cinética, 475 nm)

V = Volume total da mistura de reação

$10^6$  = fator de conversão de mol para  $\mu\text{mol}$

$\epsilon$  = Coeficiente de Extinção Molar para o DOPAcromo,  $3700 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$

d = Caminho óptico, 1 cm

v = Volume do extrato enzimático na mistura de reação

$\Delta t$  = Tempo de reação

FD = Fator de diluição da amostra

A unidade enzimática internacional (1 U) usada para atividade enzimática de fenoloxidasas foi definida como a quantidade de enzima necessária para oxidar 1  $\mu\text{mol}$  de L - DOPA em DOPAcromo (*i. e.* modificar a absorvância medida) em 1 minuto nas condições de trabalho.

#### 5.6.5.2 Lacases e Peroxidases Totais

Os ensaios para a quantificação de lacases (Wolfenden & Willson, 1982; Schneider *et al.*, 2018) e peroxidases totais (Heinzkill *et al.*, 1998) foram adaptados considerando as diferentes aplicações do método na biodegradação de polietileno descritas na literatura (Gómez-Méndez *et al.*, 2018; Kang *et al.*, 2019; Zhang *et al.*, 2020a; Carstens *et al.*, 2020; Zhang *et al.*, 2020b; Khruengsai *et al.*, 2022; Gong *et al.*, 2023; Perera *et al.*, 2023; Aguiar *et al.*, 2024; Chaturvedi *et al.*, 2024; Nair *et al.*, 2024; Yang *et al.*, 2024).

O valor obtido para a atividade das peroxidases totais foi subtraído da atividade das lacases para a obtenção do valor final (Schneider *et al.*, 2019). As atividades enzimáticas foram determinadas a partir da cinética de oxidação do sal de diamônio do ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato) (ABTS), monitorada a 420 nm ( $\epsilon = 36.000 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ ). As misturas reacionais foram preparadas com 300  $\mu\text{L}$  de uma solução aquosa de ABTS 0,5 mM, 1350  $\mu\text{L}$  de tampão acetato de sódio-ácido acético 100 mM (pH 5) e 1350  $\mu\text{L}$  do extrato enzimático para lacases, enquanto para peroxidases totais foram utilizados 300  $\mu\text{L}$  de uma solução aquosa de ABTS 0,5 mM, 1050  $\mu\text{L}$  de tampão acetato de sódio-ácido acético 100 mM (pH 5), 300  $\mu\text{L}$  de uma solução de  $\text{H}_2\text{O}_2$  1 M e 1350  $\mu\text{L}$  do extrato enzimático (Chevreuil *et al.*, 2022; Hartman *et al.*, 2022).

A água foi utilizada como controle branco no espectrofotômetro (BEL Photonics, modelo UV-M51). E a absorvância das misturas foram medidas após 15 minutos.

A equação (c) foi aplicada com as seguintes modificações: Coeficiente de Extinção Molar ( $\epsilon$ ) para o ABTS a 420 nm,  $36000 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ , valores de volume e 15 minutos como tempo de reação ( $\Delta t$ ).

A unidade enzimática internacional (1 U) usada para atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima necessária para oxidar alterar 1  $\mu\text{mol}$  de ABTS (*i. e.* modificar a absorvância medida) em 1 minuto nas condições de trabalho.

### 5.6.5.3 Endopeptidases

A atividade enzimática para endopeptidases (endoproteases, EC 3.4.X) seguiu o protocolo de Sarath *et al.* (1989) com caseína como substrato e modificações descritas por Oliveira *et al.* (2024).

A caseína foi inicialmente solubilizada em solução de NaOH concentrado e posteriormente misturada com tampão fosfato de sódio 50 mM (pH  $7 \pm 0,5$ ), resultando em uma solução de caseína tamponada a 1%. Em seguida, 938  $\mu$ L da solução-substrato de caseína foi misturada com 188  $\mu$ L do extrato enzimático, incubando por 30 minutos (37° C). Após esse período, a reação foi interrompida com a adição de 1875  $\mu$ L de ácido tricloroacético (TCA) 10% à mistura, a qual ficou em repouso durante 30 minutos (37° C). Logo em seguida, os tubos foram refrigerados por 20 minutos e centrifugados para a separação e descarte de precipitados (4°C, 20 minutos e  $4000 \times g$ ).

Por fim, realizou-se a medida espectrofotométrica (BEL Photonics, modelo UV-M51) a 280 nm. O controle-branco consistiu na adição do desnaturante (TCA) antes da mistura com a solução-substrato: TCA, extrato enzimático e caseína tamponada.

A obtenção da unidade enzimática internacional (1 U) para essa atividade enzimática consistiu na quantidade de enzima necessária para promover a liberação de 1  $\mu$ mol de tirosina por minuto. A tirosina é um dos aminoácidos que compõem a estrutura da caseína, logo, o aumento da absorbância medida a 280 nm corresponde a liberação desse aminoácido pela ação das proteases na estrutura da caseína.

## 6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 6.1 INTERAÇÃO FÚNGICA AO FILME DE PEBD

A Tabela 4 detalha as interações entre os Ff e o material polimérico após 15 dias de exposição. Esta análise preliminar fundamentou-se na observação visual do crescimento fúngico sobre o filme plástico, cujas evidências são corroboradas pelos resultados analíticos apresentados nas seções subsequentes.

Tabela 4 - Observação preliminar da interação do fungo com o filme agarizado após 15 dias de incubação a 30 °C (ver Apêndice A).

Fungo	Crescimento	
	Sobre o filme	Sob o filme (Ágar-suporte)
ASP1	+	+
ASP2	-	-
ASP4	+	+
ASP6	+	+
ASP7	+	+
ASP9	+	+
RMP1	+	-
RMP3	+	-
RMP5	+	+
IBCLP20	-	-
AQ2A	-	-
AQ3A	-	+
IPT301	+	+
BAC	+	+
CR04	+	-

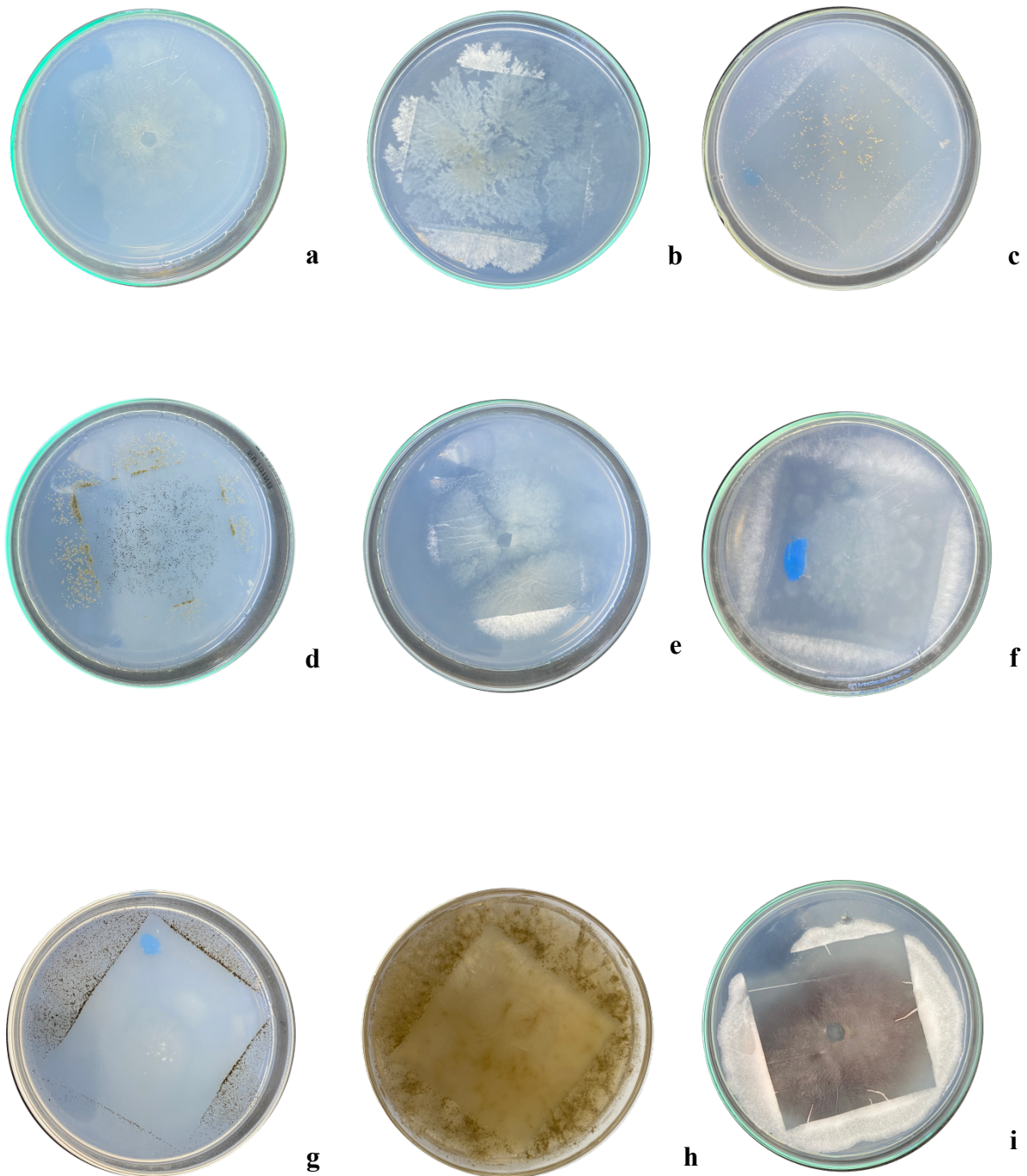
Fonte: Autor (2026).

**Legenda:** Os sinais (+) e (-) indicam a ocorrência e a não ocorrência de interação, respectivamente.

Os isolados ASP1, ASP4, ASP6, ASP7, ASP9, RMP5, AQ3A, IPT301 e BAC promoveram alterações visíveis no ágar de suporte sob o filme de PEBD (Fig. 4). Tais

modificações constituíram evidências qualitativas preliminares de que, após 15 dias de incubação, os microrganismos haviam interagido com o filme polimérico, atravessando-o até atingir o meio salino.

Figura 4 - Fungos que apresentaram alterações macroscópicas no meio de cultura sob a interface do filme após 15 dias de incubação a 30 °C.



Fonte: Autor (2026).

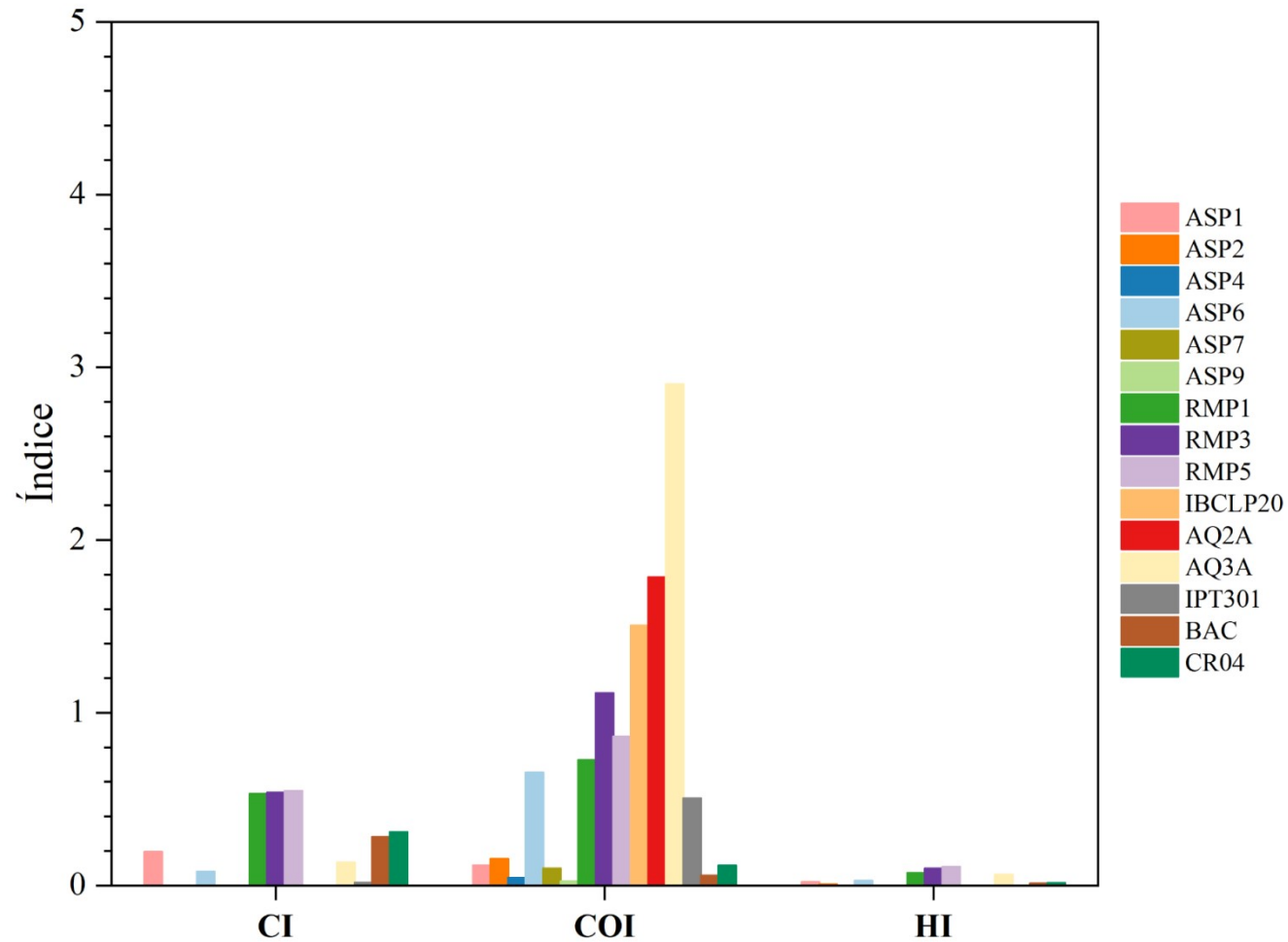
Legenda: Fungos **a** (ASP1), **b** (ASP4), **c** (ASP6), **d** (ASP7), **e** (ASP9), **f** (RMP5), **g** (AQ3A), **h** (IPT301) e **i** (BAC).

A partir dos espectros FTIR foram obtidos índices de ligações químicas para carbonilas (CI), carbonos oxigenados simples (COI) e hidroxilas (HI) (Seção 5.6.3) apresentados na Figura 5. Os índices foram obtidos das áreas sob as bandas de interesse (Método SAUB) (Almond *et al.*, 2020), diferindo do uso de números de ondas específicos, como os usados por Gowthami *et al.* (2023) e Sathiyabama *et al.* (2024) na obtenção dos índices para as ligações de carbonilas de cetonas (KCI), carbonilas de ésteres (ECI), estruturas vinílicas (VI) e duplas ligações internas (IDI). As duas medidas não alteraram as conclusões apresentadas neste trabalho e segundo Almond (2020) e Bertolacci (2022), a integração das bandas tende a ser mais acurada e consistente que os métodos que utilizam números de onda específicos para avaliar índices de oxidação em poliolefinas. (Apêndice B e C). Esses índices (CI, COI e HI) quando analisados de maneira integrada mostram perfis distintos de modificação do PE em cultivo sólido.

Os Ffs RMP1, RMP3 e RMP5 apresentaram os maiores índices de CI, enquanto os Ffs IBCLP20, AQ2A e AQ3A apresentaram os maiores índices de COI. Essas medidas concordam com a literatura que utiliza esses índices como medidas de oxidação do material polimérico, por exemplo, Sathiyabama *et al.* (2024) que utilizaram o CI para confirmar a participação de microrganismos na degradação de PE. A preferência pela medida de CI se deve a indicação da formação de estruturas oxidativas mais complexas, correspondente a oxidação avançada. Enquanto os índices COI e HI tendem a indicar a oxidação inicial das cadeias poliméricas, diminuindo com o aumento da exposição ao agente biológico (Khruengsai *et al.*, 2021; Son *et al.*, 2024). Esses resultados demonstram, de forma semi-quantitativa, que os tratamentos RMP1, RMP3 e RMP5, promoveram modificações oxidativas nas cadeias de PE.

Os filmes PEBD utilizados neste estudo apresentaram as bandas  $\sim 2915$  e  $\sim 2850$   $\text{cm}^{-1}$  (vibrações assimétrica e simétrica do grupo C–H alifático),  $\sim 1460$ ,  $860\text{-}890$  e  $720\text{-}730$   $\text{cm}^{-1}$  (ligações C=C, grupos metilenos, deformações e vibrações de  $\text{CH}_2$ , respectivamente) como bandas características. Os espectros apresentados na Figura 6 comparam os Ff com os maiores índices de CI, COI e HI com filme de PE virgem (controle) e as principais modificações nas estruturas dos filmes poliméricos tratados são descritas na Tabela 5.

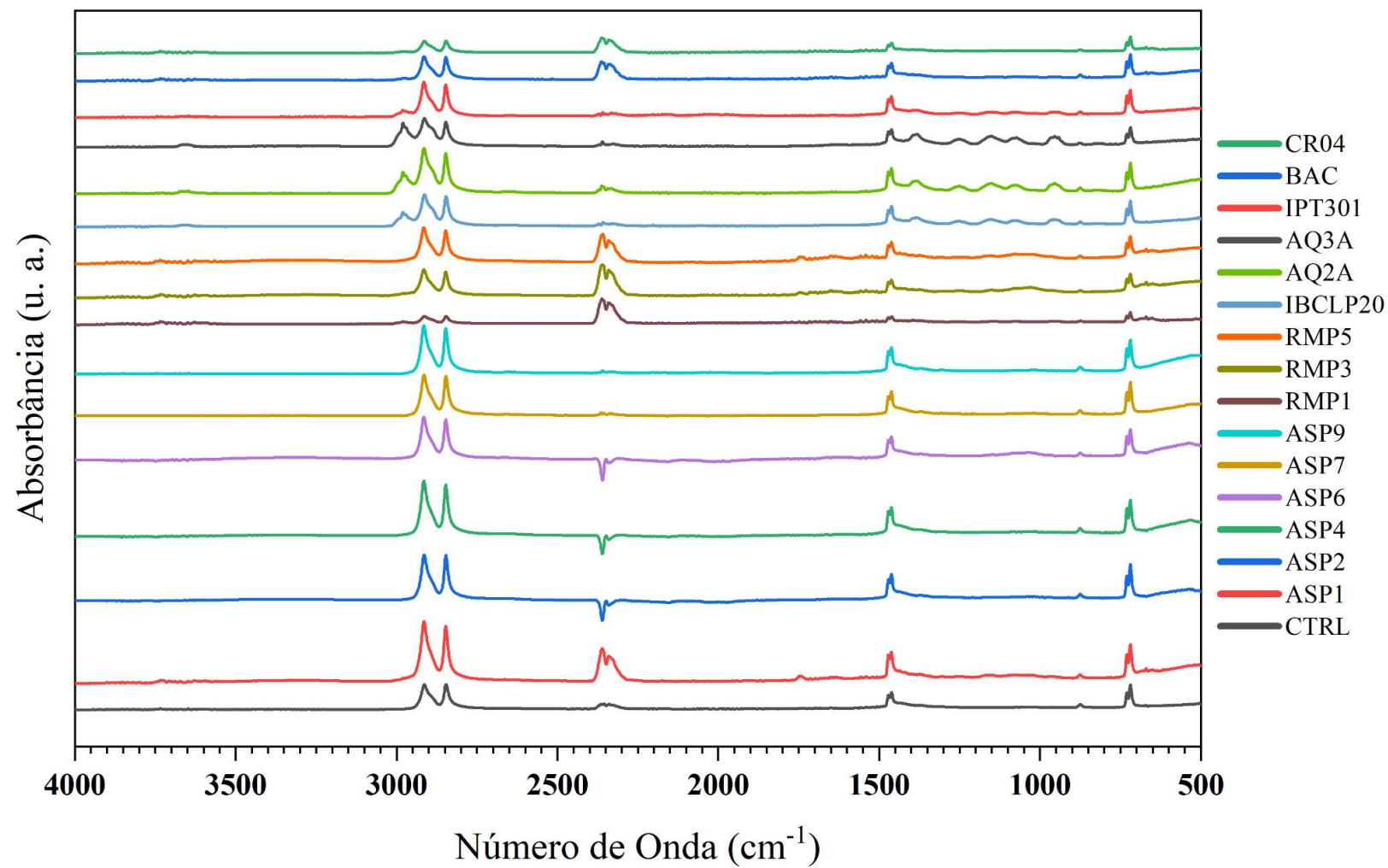
Figura 5 - Índices oxidativos (IO) obtidos por espectroscopia no infravermelho (FTIR) em função da composição dos filmes após exposição fúngica.



Fonte: Autor (2026).

Legenda: **CI** (índice de carbonilas, C=O), **COI** (índice de carbonos oxigenados simples, C-O) e **HI** (índice de hidroxilas, O-H).

Figura 6 - Espectros de absorção no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), normalizados, obtidos no intervalo de 4000–500  $\text{cm}^{-1}$ .



Fonte: Autor (2026).

Tabela 5 - Descrição das principais modificações químicas superficiais em filmes de PEBD expostos a fungos filamentosos (Ff) identificadas por espectroscopia de infravermelho (FTIR).

<b>Região (cm<sup>-1</sup>)</b>	<b>Atribuição Química</b>
<b>3950 – 3550</b>	Vibrações de alguns grupos hidroxila, correspondente a um ruído do controle, os tratamentos apresentaram aumento de intensidade. Em particular, o tratamento com o fungo RMP5 apresentou uma ligeira banda em ~3730 cm <sup>-1</sup> indicando hidroxilas livres.
<b>3040 – 3530</b>	Carbonos oxigenados simples, alcóois, OH formadas a partir de ácidos carboxílicos (sinais de formação de grupos oxigenados), água ou resíduos proteicos.
<b>2980</b>	Ligeira formação sem atribuição química descrita.
<b>2915 e 2850</b>	Estiramento de bandas características do PE.
<b>2330 – 2370</b>	Ligações triplas C≡C e/ou carbonilas (O=C=O).
<b>1730 – 1760</b>	Carbonilas de ésteres e cetonas, aldeídos, ácidos conjugados ou anidridos.
<b>1600 – 1670</b>	C=C terminais e/ou amidas, N=O.
<b>1500 – 1580</b>	C=C e alguns aromáticos.
<b>950 – 1380</b>	Formação de bandas distintas em ~1380, ~1240, ~1140, ~1060 e ~950, N/A.
<b>920 – 1180</b>	Sinais indicando estruturas semelhantes a éteres (C–O–C), álcoois (OH), alcenos (CH=CH), ácidos carboxílicos e/ou resíduos de biomassa fúngica.
<b>~ 870 e ~ 725</b>	Estiramento de bandas características do PE.
<b>790 – 840</b>	Ligeira formação sem atribuição química descrita.
<b>670 – 680</b>	Ligeira formação sem atribuição química descrita.

Fonte: (2026).

Os outros tratamentos apresentaram modificações similares como o estiramento em  $2980\text{ cm}^{-1}$ , formação de bandas entre  $900\text{-}1500\text{ cm}^{-1}$  ou perda de intensidade de picos característicos do PE controle.

A interpretação das modificações descrita na Tabela 5 utilizou a literatura de degradação de PEBD por Ff (El-Sayed; Rabie; Hamed, 2021; Khruengsai; Sripahco; Pripdeevech, 2021; Perera *et al.*, 2022; Chaudhary *et al.*, 2023; Perera *et al.*, 2023; Wróbel *et al.*, 2023; Khampratueng; Rice; Anal, 2024; Safdar *et al.*, 2024; Yang *et al.*, 2024), os quais, relacionaram a formação dos grupos oxidativos à degradação enzimática do substrato polimérico. Além disso, alterações nas bandas características do PE sugerem a existência de modificações na estrutura de C-H do polímero, por exemplo, porções amorfas do substrato. Em consonância com a literatura, o estudo de Zhang *et al.* (2020) utilizando o Ff *A. flavus* reforçou que o aparecimento de hidroxilas, carbonilas e éteres são indicadores qualitativos de bio-oxidação durante o processo de decomposição. De modo análogo, o estudo de Spina *et al.* (2021) com diferentes fungos (*F. oxysporum*, *T. brevicompactum*, *P. lilacinum* e *F. falciforme*) atribuiu o aparecimento de carbonilas nos espectros de PEBD à ação de peroxidases, corroborando as modificações observadas. Ao mesmo tempo, alguns picos que ainda estariam em formação (por exemplo,  $3040\text{-}3530\text{ cm}^{-1}$ ) nos espectros obtidos podem ser explicados pelo tempo relativamente curto do cultivo utilizado para a seleção da degradação do filme (15 dias, Seção 3.3.2). Esse período é menor do que o utilizado em estudos da literatura (30–90 dias) e tais bandas podem se tornar evidentes apenas em etapas posteriores do processo de degradação (Gong *et al.*, 2023; Khan; Ali; Ali, 2023).

Este ensaio da seleção, que avaliou a interação de cada Ff cultivado sobre um filme de PEBD, possui semelhanças com os estudos conduzidos por Bertolacci *et al.* (2022), Harrat *et al.* (2022) e Maisto *et al.* (2024), os quais classificam esse tipo de cultivo como uma forma de biodegradação em meio sólido. Assim, o presente trabalho empregou a interação entre a cultura fúngica e o filme de polietileno como um ensaio de biodegradação prévio. E com base nos resultados obtidos a partir dos filmes oxidados, incluindo alterações visíveis no ágar de suporte, índices químicos e as estruturas oxidativas reveladas pelos espectros FTIR, os fungos ASP1, RMP1, RMP3, RMP5, RMP3, IBCLP20, AQ2A, AQ3A e BAC foram identificados como potenciais candidatos para a etapa de validação da degradação em cultivo líquido. Entretanto, a fim de conceder maior robustez a escolha do decompositor fúngico, os dados qualitativos e semi-quantitativos desse ensaio de biodegradação preliminar foram integrados às informações obtidas no ensaio da seleção para prospecção enzimática (Seção 3.3.3).

## 6.2 ÍNDICE DE POTENCIAL ENZIMÁTICO PARA LACASES

O segundo ensaio na seleção consistiu no cultivo de cada Ff em ágar salino com restrição de carbono (MMSC) contendo guaiacol e  $\mu$ Ps de PE como indutores de atividade lacásica (*Secção 5.3.3*). Os valores de índice enzimático obtidos a partir das medições são descritos na Tabela 6 e os halos de coloração fotografados podem ser observados na Figura 7.

Tabela 6 - Índices qualitativos obtidos a partir da formação de halos como medida de potencial enzimático para oxiredutases.

Fungo	Qualidade do Halo	Índice Enzimático
ASP1	+	-
ASP2	+	-
ASP4	+++	1,259 $\pm$ 0,155 <sup>a</sup>
ASP6	-	-
ASP7	+	-
ASP9	+++	1,176 $\pm$ 0,048 <sup>a</sup>
RMP1	+++	0,772 $\pm$ 0,028 <sup>b</sup>
RMP3	-	-
RMP5	+++	1,260 $\pm$ 0,124 <sup>a</sup>
IBCLP20	-	-
AQ2A	-	-
AQ3A	+	-
IPT301	+	-
BAC	++	0,691 $\pm$ 0,078 <sup>b</sup>
CR04	++	0,690 $\pm$ 0,068 <sup>b</sup>

Fonte: Autor (2026).

Legenda: Halo inexistente (-); halo fraco (+); halo moderado (++) e halo forte (+++). Classificação adaptada de Zajc *et al.* (2019) e Tsagain *et al.* (2022). <sup>a,b</sup>Comparação das médias de atividade enzimática entre isolados fúngicos pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ). Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si.

O guaiacol, um composto fenólico derivado da lignina, é amplamente utilizado como um dos substratos padrões para detecção de lacases, uma vez que essas enzimas oxidam a estrutura fenólica, formando produtos coloridos visíveis no meio de cultura (Kiiskinen; Ratto;

Kruus, 2004; Viswanath *et al.*, 2008). Ainda assim, o guaiacol também pode ser oxidado por outras enzimas, como observado por Tsigain *et al.* (2022), que utilizaram guaiacol e tinta de guaiaco como reagentes não específicos para fenoloxidasas, acoplando outros ensaios de coloração específicos para lacases, tirosinases e peroxidases para complementar a triagem de fungos com capacidade enzimática lignolítica (por exemplo,  $\alpha$ -naftol, seringaldazina, P-cresol e  $H_2O_2$  com pirogalol). Assim, a presença de halo no ensaio sólido indica a atividade de fenoloxidasas, incluindo lacases, mas não exclui a ação de outras oxirredutases. Estas outras atividades enzimáticas específicas foram avaliadas nos ensaios subsequentes em cultivo líquido (*Seção 3.6.5*).

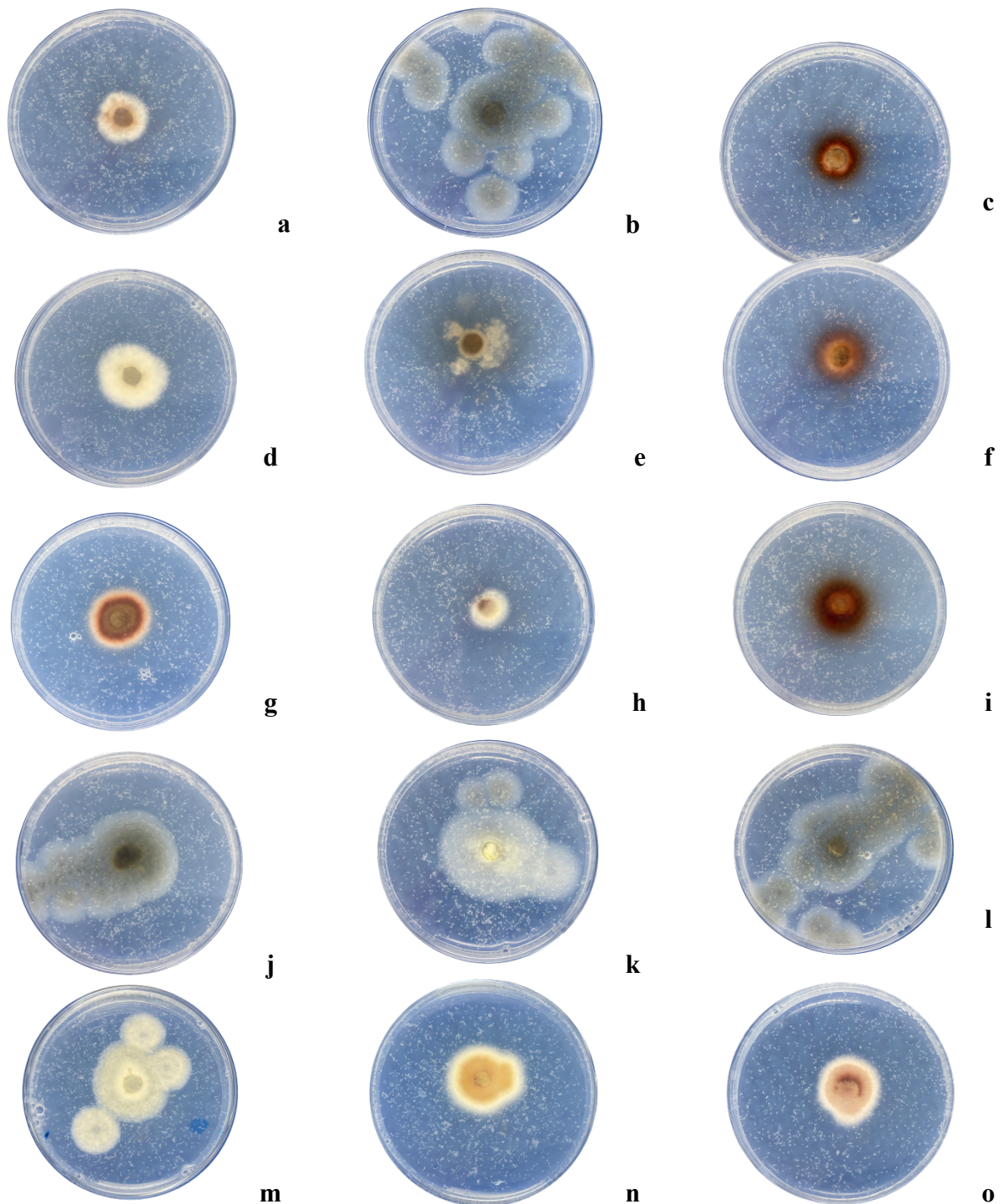
A escolha da atividade enzimática lacásica, representando o grupo das oxirredutases, por meio da oxidação do guaiacol e formação de zona de coloração, baseia-se em evidências das diversas pesquisas sobre degradação de polietileno que relatam a participação dessas enzimas na oxidação das cadeias poliméricas de polietileno durante o cultivo fúngico (Tabela 1). Trabalhos recentes, como os de Sathiyabama *et al.* (2024) e Aiduang *et al.* (2025), empregaram ensaios semelhantes de detecção de enzimas (hidrolases, lacases, LiP e MnP) para a triagem de fungos filamentosos com potencial decompositor de polietilenos.

O presente trabalho adotou um período de incubação de quatro dias para o ensaio de atividade lacásica. Esse método, de caráter semi-quantitativo, baseia-se na formação do halo rubro como indicativo da ação de oxirredutases no meio de cultura (Coll *et al.*, 1993; Bhelose; Malik, 2024). Considerando que diferentes períodos de incubação são relatados na literatura para medições de halos enzimáticos de oxirredutases ou hidrolases, variando de 3 a 14 dias, a escolha de um tempo reduzido neste estudo teve como objetivo associar a resposta colorimétrica do ensaio à adaptação inicial dos fungos ao meio indutor da atividade. Nesse contexto, a interpretação dos resultados não se limita ao valor absoluto do índice enzimático, mas também à identificação de quais isolados apresentam atividade detectável precocemente, reconhecendo que isolados que não respondem neste período podem apresentar níveis similares em medições posteriores (Gaur *et al.*, 2018; Aiduang *et al.*, 2025).

Os fungos ASP4, ASP9, RMP1, RMP5, BAC e CR04 apresentaram halos moderados a fortes após 4 dias de incubação (Fig. 7). Entre eles, RMP5 ( $1,260 \pm 0,124$ ) e ASP4 ( $1,259 \pm 0,155$ ) exibiram os maiores índices enzimáticos (Tabela 5). Esse potencial oxidativo, associado à atividade de lacases, pode servir como indicador complementar na escolha de fungos com potencial decompositor de polietileno, especialmente quando considerado em conjunto com os resultados de biodegradação preliminar (*Seção 4.1*). As oxirredutases, como

as lacases, são amplamente reconhecidas por sua participação na degradação de lignina e também pela capacidade de oxidar cadeias de polietileno, sendo frequentemente monitoradas em cultivos fúngicos voltados à otimização de processos de degradação (Tabela 1) (Temporiti *et al.*, 2022).

Figura 7 - Halos de coloração formados pela ação de Ffs em meio seletivo MMSC contendo guaiacol e  $\mu$ Ps de PEBD após o período de incubação.



Fonte: Autor (2026).

Legenda: Os fungos utilizados neste trabalho seguindo a seguinte ordem: **a** (ASP1), **b** (ASP2), **c** (ASP4), **d** (ASP6), **e** (ASP), **f** (ASP9), **g** (RMP1), **h** (RMP3), **i** (RMP5), **i** (IBCLP20), **k** (AQ2A), **l** (AQ3A), **m** (IPT301), **n** (BAC) e **p** (CR04) com seus halos enzimáticos após 4 dias (30°C).

O fungo RMP5 (Fig. 8) apresentou crescimento micelial através do filme de PE, indicando colonização efetiva do polímero. A oxidação da matriz foi confirmada por FTIR através da elevação do índice de carbonila, enquanto o potencial degradativo foi reforçado pelo expressivo índice enzimático lacásico em meio sólido. Diante desse desempenho, o Ff RMP5 foi o isolado selecionado para os cultivos em meio líquido, visando quantificar a degradação em 30 dias e elucidar os mecanismos enzimáticos associados.

Figura 8 - Crescimento do fungo filamentoso RMP5 em meio batata dextrose ágar (BDA) após 7 dias de incubação.



Fonte: Autor (2026).

Dessa forma, o isolado RMP5 se destacou por apresentar crescimento micelial tanto na superfície quanto sob o filme de PEBD, o que indicou uma interação preliminar direta com o substrato. As análises de espectroscopia no infravermelho (FTIR) evidenciaram alterações químicas na matriz polimérica, com elevação do índice de carbonila, sugerindo a ocorrência de processos oxidativos. Adicionalmente, o Ff RPM5 apresentou um elevado índice enzimático lacásico em meio sólido. Tais resultados justificaram a seleção do RMP5 entre as culturas estudadas para a avaliação em meio líquido, visando analisar a degradação prolongada (30 dias) e os mecanismos enzimáticos envolvidos.

### 6.3 ENSAIOS DE BIODEGRADAÇÃO EM MEIO LÍQUIDO

O fungo filamentoso RMP5 (Fig. 8) foi selecionado como um potencial agente de biodegradação de PEBD a partir dos resultados promissores obtidos nas etapas de seleção em meio sólido (*Seções 6.1 e 6.2*). E a fim de validar a correlação entre a biodegradação do polímero e a secreção de enzimas oxirredutoras, assim como, avaliar sua eficiência decompositora, o isolado fúngico foi submetido a cultivos em meio mínimo por um período de 28 dias (*Seção 5.5*).

As metodologias utilizadas para recuperar os  $\mu$ Ps e filmes de PEBD residuais correspondem a procedimentos recentes dentro da literatura de biodegradação de PEs (*Seção 3.6.1*), ainda assim, percebeu-se que suas aplicações ainda correspondem a uma lacuna importante para os ensaios de degradação, isto é, a perda de massa microplástica durante o processo de recuperação e a separação do plástico residual da biomassa fúngica (Montazer; Najafi; Levin, 2020). E por isso, tais desafios direcionaram esforços para a quantificação da perda de massa percentual de plástico ao final do processo (T28). Dito isso, obtivemos uma perda de massa de  $21,962 \pm 3,761$  % para o cultivo que utilizou  $\mu$ Ps de PEBD ( $\leq 355$   $\mu$ m) como substrato e cerca de  $1,147 \pm 0,162$  % para o cultivo com filmes de PEBD (2 x 2 cm) após 28 dias de cultivo de degradação.

As perdas de massa plástica observadas neste trabalho mostram-se promissoras quando comparadas a estudos recentes de biodegradação fúngica (Chaudhary *et al.*, 2023; Morales Ramos *et al.*, 2024; Kong *et al.*, 2025). De modo geral, valores elevados de redução de massa na literatura estão associados a períodos prolongados de cultivo, isto é, exposição ao agente microbiano, tanto para filmes quanto para  $\mu$ Ps. Gajendiran *et al.* (2016) relataram uma perda de 35 % em filmes de PEBD (2 x 2 cm) após 90 dias utilizando uma cepa de *Aspergillus clavatus*. Em condições semelhantes, Abraham *et al.* (2017) descreveram 4,9 % de degradação para *Aspergillus nomius*, valor próximo aos  $4,25 \pm 1,67$  % obtidos por Rojas-Villacorta *et al.* (2025) após 50 dias em microcultivos de PEBD (1 x 5 cm) com *A. niger*. Outros estudos, como o de Elsamahy *et al.* (2023), reportaram valores superiores a 10 % para filmes de PEBD (2,5 x 2,5 cm), com destaque para *Sterigmatomyces halophilus*, que atingiu 18,6 % de redução de massa. Embora não seja possível extrapolar a relação entre perda de massa e tempo de cultivo, conforme demonstrado por Mohan e Hamid (2026) e Saira *et al.* (2022), que observaram reduções em torno de 20 % em apenas 30 dias de cultivo para filmes de PEBD (2 x 2 cm) utilizando *A. fumigatus* e *A. niger*, respectivamente. Além disso, Perera

*et al.* (2022) que descreveram reduções maiores que 10 % para somente 6 dos 31 fungos associados a líquens de manguezais, enquanto o restante não passou de  $0,28 \pm 0,17$  % após de 21 dias de cultivo salino (filmes de PEBD, 10 cm  $\times$  3 cm); ainda assim, ao se considerar especificamente o intervalo de 28 a 30 dias, período empregado no presente estudo, os valores de degradação relatados tendem a ser menores. Por exemplo, Gong *et al.* (2023) reportaram apenas  $0,3 \pm 0,06$  % de perda de massa em filmes de PEBD (3 x 3 cm) não tratados e  $0,43 \pm 0,01$  % para filmes tratados termicamente, utilizando *Cladosporium sp.* como agente decompositor; enquanto Yang *et al.* (2024) obtiveram  $0,66 \pm 0,06$  % utilizando uma co-cultura de *Alternaria sp.* e *Trametes sp.*, mesmo com aplicação de pré-tratamento térmico aplicado aos filmes; em outro exemplo, Aiduang *et al.* (2025) obtiveram uma redução de  $1,182 \pm 0,239$  % da massa de filmes de polietileno linear de baixa densidade (PLBD) utilizando *Schizophyllum commune* após 30 dias.

Ademais, a literatura de biodegradação tende a conceder ênfase a redução de massa final, sem tecer comentários sobre o tempo utilizado para tais valores. Khrugensai *et al.* (2021), Khrugensai *et al.* (2022) e Ojha *et al.* (2017) são exemplos de trabalhos que são citados com alta redução após 90 dias, embora, seus resultados apresentem valores semelhantes aos encontrados neste trabalho (10 - 20 %) com 30 dias de cultivo. Outros exemplos de tempos prolongados são El-Sayed, Rabiell e Hamed (2021) acompanharam cultivos de *A. carbonarius*, *A. fumigatus* e sua co-cultura durante 120 dias visando a degradação de filmes de PEBD (2 x 2 cm), porém, descreveram apenas 7 % de redução de massa como resultado do melhor pré-tratamento, PEBD tratado termicamente; e, Zhang *et al.* (2026) que para duas cepas de *Aspergillus sp.* diferentes descreveram 7 - 10 % e 6 - 9 % de redução após 120 dias, respectivamente. Nesse contexto, a eficiência do isolado RMP5 destaca-se como promissora, sobretudo por apresentar atividade significativa sobre filmes de polietileno não tratado em um período experimental reduzido.

Quanto à redução da massa microplástica, Shazia *et al.* (2022) descreveram  $38,82 \pm 1,08$  % de perda de massa após 90 dias para partículas de PEBD (51  $\mu$ m) utilizando *Penicillium citrinum*. Da mesma forma, Seenivasagan, Karthika e Poonkuzhali (2022) descreveram valores acima de 40 % de redução após 60 dias para  $\mu$ Ps tratados com cepas de *Aspergillus sp.* ou *Rhizopus oryzae*. Porém, geralmente, os valores descritos para 28-30 dias são menores para ensaios com cepa única. E enquanto Arshad *et al.* (2025) conseguiu redução maior que 50 % a partir de um consórcio fúngico após 30 dias; Ramanayake *et al.* (2024) conseguiram 6 % de redução para filmes e 13 % de redução para  $\mu$ Ps, aproximadamente, em

cultivo com *Talaromyces purpureogenus* após 30 dias. Omidoyin *et al.* (2025) conseguiram 5,25 % de redução da massa de  $\mu$ Ps após 30 dias com uma cepa de *Penicillium sp.* e em sua discussão, somente o trabalho de Das *et al.* (2018) conseguiram um valor acima de 10 %, a saber, 13 % com *Fusarium sp.* após 60 dias. Ao mesmo tempo, citamos o trabalho anterior de nosso grupo de pesquisa que descreveu um valor semelhante ao encontrado por esse trabalho para *Penicillium crisogenum* (21 %) ainda que o cultivo com *Aspergillus sp.* tenha apresentado um valor maior (47 %) no mesmo estudo após 30 dias (Aguiar *et al.*, 2024). Em conjunto, esses resultados permitem classificar o Ff RMP5 como um decompositor eficiente de  $\mu$ Ps de PEBD, uma vez que promoveu a redução de aproximadamente um quarto da massa plástica inicial em apenas 28 dias de cultivo.

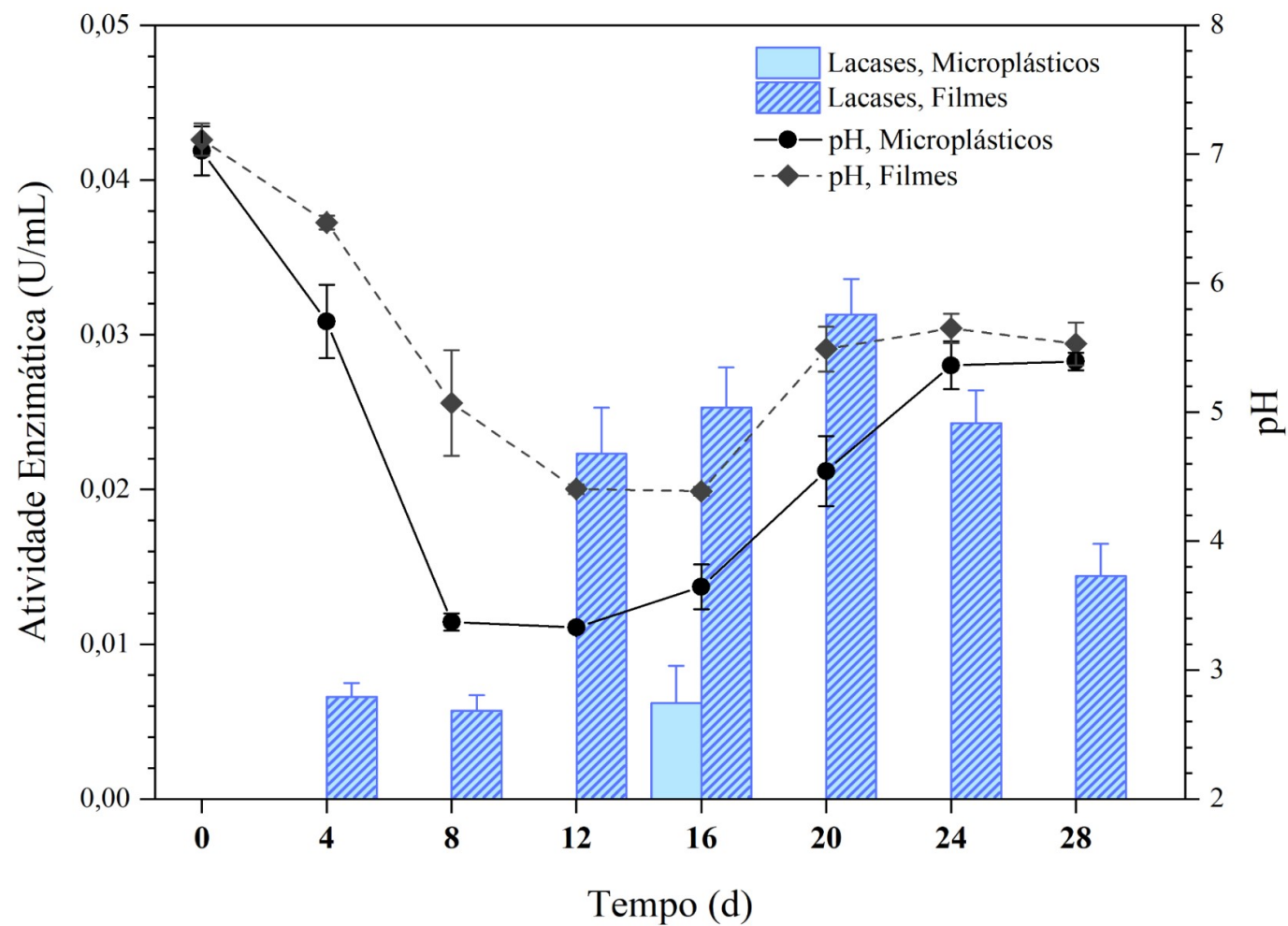
Quanto ao contraste observado nas reduções de massa plástica entre  $\mu$ Ps e filmes, esse comportamento também foi relatado nos poucos estudos que utilizaram diferentes geometrias do substrato, isto é, formato e/ou dimensões, como no trabalho de Ramanayake *et al.* (2024). Contudo, a discussão desses autores restringiu-se somente à influência dos pré-tratamentos aplicados ao plástico antes da degradação. No presente estudo, os polietilenos ( $\mu$ Ps ou filmes) não foram submetidos a pré-tratamentos, de modo que a geometria do substrato pode ter influenciado de forma significativa tanto o metabolismo fúngico quanto a eficiência da ação enzimática sobre o material polimérico. Essa hipótese é corroborada por Pérez-García *et al.* (2025), ao destacarem que a relação entre o tamanho das partículas e a área superficial constitui um dos fatores determinantes para a degradação de materiais plásticos.

O presente trabalho realizou duas cinéticas de cultivo de 28 dias, retirando amostras para os ensaios enzimáticos a cada 4 dias. A literatura de degradação fúngica de polietilenos tendeu a aumentar a amostragem nos últimos anos, embora, continue a realizar longos cultivos (60 - 120 dias); isto é, geralmente, retiram amostras a cada 7 ou 10 dias, talvez, priorizando a redução de massa plástica ao tempo (Chaturverdi *et al.*, 2024; Omidoyin *et al.*, 2025; Mohan; Hamid, 2026). Neste trabalho, o desenho experimental visou enfatizar o metabolismo extracelular a partir das enzimas analisadas (lacases, peroxidases totais, tirosinases e proteases) e de alguma forma, contribuir para a redução dos tempos de cultivo de degradação, direcionando para um futuro processo de remediação industrialmente viável (Sutkar *et al.*, 2023; Ciuffi; Fratini; Rosi, 2024).

Dentre as enzimas escolhidas para verificação analítica no processo, as lacases e as peroxidases destacam-se como os principais marcadores metabólicos analisados nos cultivos

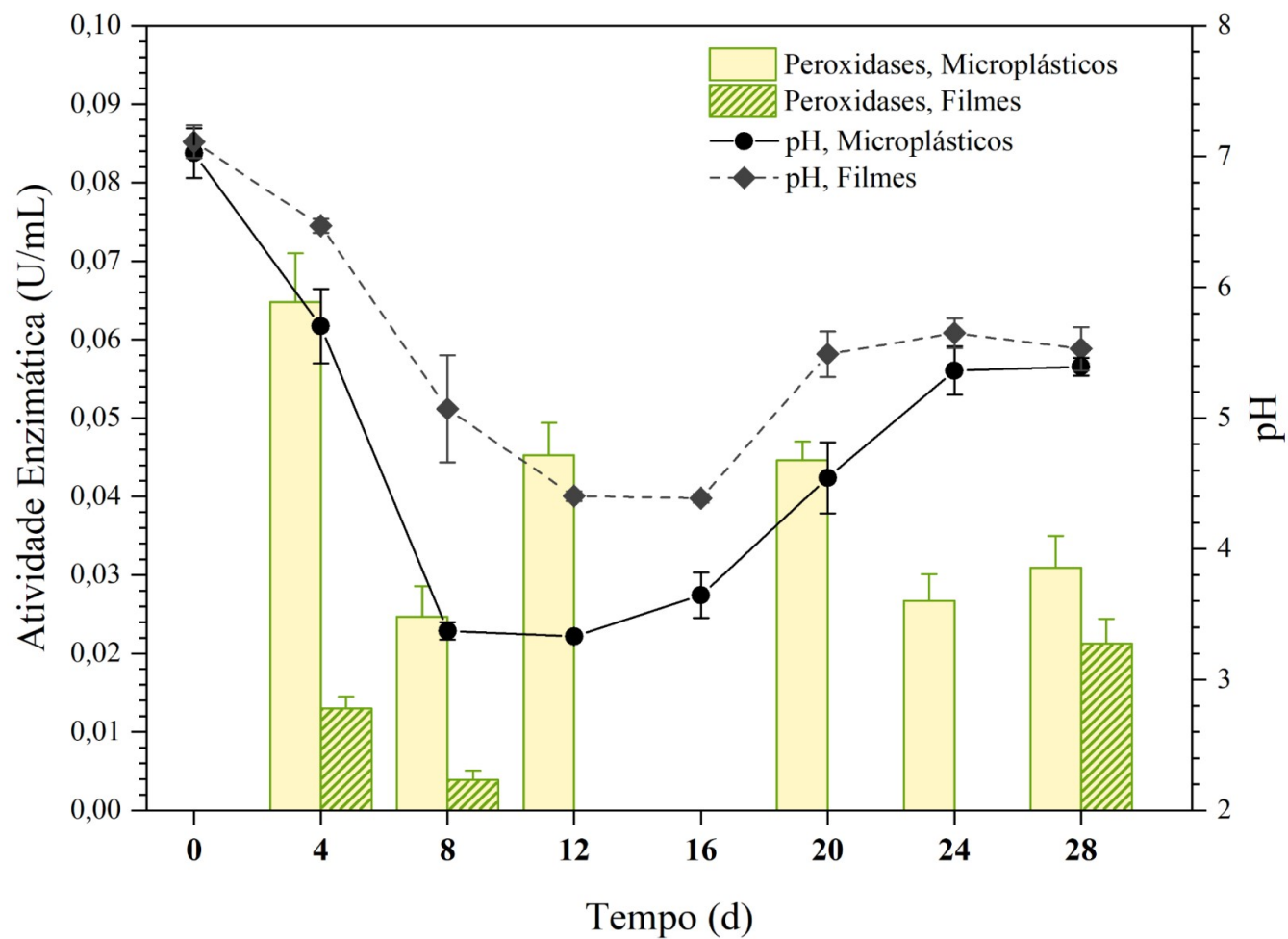
de degradação de polietilenos (Tabela 1). E ao compararmos essas atividades nos dois cultivos ambas apresentaram comportamentos significativamente diferentes (Fig. 9 e 10).

Figura 9 - Monitoramento da atividade enzimática para lacases em cultivos que utilizaram PEBD como substrato durante 28 dias, Ff RMP5.



Fonte: Autor (2026).

Figura 10 - Monitoramento da atividade enzimática para peroxidases totais em cultivos que utilizaram PEBD como substrato durante 28 dias, Ff RMP5.



Fonte: Autor (2026).

No cultivo contendo  $\mu\text{Ps}$ , a secreção de peroxidases apresentou um pico precoce nos primeiros 4 dias ( $0,0648 \pm 0,0062 \text{ U/mL}$ ). Essa atividade se manteve instável, porém, elevada, durante a maior parte do processo, com exceção do intervalo entre o 12° e o 16° dia. Neste período, ocorreu uma queda abrupta na atividade peroxidásica, coincidindo precisamente com a única detecção de lacases registrada para este substrato ( $0,0062 \pm 0,0024 \text{ U/mL}$ ), seguido de restabelecimento dos níveis de peroxidases no 20° dia.

Este perfil diverge do observado no cultivo que utilizou filmes de PEBD como substrato carbônico. Neste outro cenário, ambas as atividades enzimáticas manifestaram-se nos primeiros 8 dias de incubação embora em níveis consideravelmente inferiores. Posteriormente, o isolado RMP5 passou a secretar predominantemente lacases, atingindo a atividade máxima de  $0,0313 \pm 0,0023 \text{ U/mL}$  no 20° dia. O ciclo encerra-se no 28° dia com o reaparecimento de ambas as atividades, acompanhado por uma redução na produção de lacases.

Apesar das especificidades de cada cultivo fúngico, isto é, meio de cultura, isolado, condições e substrato, ainda assim, o presente trabalho consegue estabelecer paralelos com a literatura recente de degradação de polietilenos por Ffs, a qual relaciona atividade enzimática, especialmente oxirredutases com a degradação do substrato plástico (Perera *et al.* 2022; Omidoyin *et al.*, 2025). O aumento contínuo da atividade de lacases no cultivo com filmes, por exemplo, corrobora os achados de Yang *et al.* (2024). Da mesma forma, a literatura descreve sinergia entre lacases e peroxidases em cultivos de *Trichoderma harzianum*, cepas de *Fusarium* e *Penicillium* (Sownya *et al.*, 2014, 2015; Arshad *et al.*, 2025; Omidoyin *et al.*, 2025). Entretanto, tais autores relataram picos de atividade tardios, com valores inferiores a  $0,01 \text{ U/mL}$  após 12 semanas de cultivo. Em contraste, o fungo RMP5 demonstrou uma resposta metabólica significativamente mais rápida e vigorosa ao substrato polimérico.

A preferência pela via peroxidásica observada no cultivo contendo  $\mu\text{Ps}$  também encontra respaldo em Sathiyabama *et al.* (2024), que descreveram atividades de MnP e LiP dez vezes superiores à atividade para lacases em um cultivo de 7 dias. Além disso, os resultados apresentados por Perera *et al.* (2023) destacam a predominância da atividade peroxidásica após 45 dias em diversos fungos, encontrando valores de atividades próximos aos descritos neste trabalho.

Os resultados obtidos com o isolado RMP5 podem ser considerados notáveis quando relacionamos com a perda de material plástico. Pois, embora trabalhos como o de Khruengsai, Sripahco e Pripdeevech (2022) apresentem valores de atividade lacásica superiores a  $5 \text{ U/mL}$

em cultivos com Ff (*N. phangngaensis*), a perda de massa após 30 dias de cultivo ficou próxima a encontrada neste estudo. De maneira semelhante, podemos comparar com o trabalho de Perera *et al.* (2022) que relacionaram a redução de 15% da massa plástica a atividades hidrolíticas e oxidativas inferiores a 0,01 U/mL. Desse modo, reafirmamos a relevância da ação biológica precoce sobre o polímero como uma característica importante para a viabilidade de futuros bioprocessos industriais.

Quanto ao intervalo de supressão da atividade peroxidásica no cultivo microplástico, podemos relacionar com a acentuada acidificação do meio de cultivo, geralmente associada a ação de peroxidases e a formação de produtos da degradação, como ácidos orgânicos (Khan; Ali; Ali, 2021; Perera *et al.*, 2023; Jin *et al.*, 2023; Kong *et al.*, 2025). No cultivo utilizando  $\mu$ Ps, o pico de peroxidases ocorre nos primeiros quatro dias seguido pelo pico de tirosinases no oitavo dia, refletindo no pH que de neutro ( $7,02 \pm 0,19$ ) cai para ácido ( $5,70 \pm 0,28$ ). A acidificação do meio continua a acontecer em paralelo com a secreção de peroxidases/tirosinases até o 12º dia, quando atinge o pH extremo de  $3,33 \pm 0,01$ . Após o 12º dia, ocorre uma resposta lacásica e alterações no comportamento de tirosinases e proteases, as quais podem estar relacionadas à regulação metabólica forçada pelo pH extremo, visto que o pico de proteases coincide com os menores valores de pH para ambos os cultivos.

O cultivo com filmes de PEBD apresentou acidificação do meio de cultura nos primeiros 12 dias, refletindo a secreção de lacases e peroxidases pelo Ff. Embora com uma amplitude menor quando comparada com o cultivo com  $\mu$ Ps ( $4,40 \pm 0,038$ ). Essa amplitude reduzida pode ser explicada pela atividade de lacases e peroxidases secretadas pelo Ff ser consideravelmente menor que as encontradas durante o cultivo com  $\mu$ Ps.

Poderíamos, portanto, vir a inferir uma possível preferência metabólica do Ff causada pela geometria do substrato, isto é, o mecanismo oxidativo utilizado pelo fungo para degradar o material pode depender da razão entre a área superficial e o volume desse substrato. Entretanto, o comportamento metabólico que ocorre em ambos os cultivos, principalmente, entre o 4º e o 16º dia, tende a também sofrer influência do pH no meio. Por exemplo, alterando condições de funcionamento das enzimas, como na queda abrupta da atividade de peroxidases no cultivo ou contribuindo para alterações químicas no material plástico.

Além disso, convém refletir se a “janela de regulação metabólica” entre os 12 - 16 dias possuem o mesmo propósito dentro da dinâmica dos cultivos. Pois, enquanto no cultivo de  $\mu$ Ps, essa regulação parece ocorrer para reduzir o estresse causado pela acidificação extrema, presença de radicais livres e manter o mínimo da maquinaria de biodegradação ainda em

funcionamento, como apontam Arshad *et al.* (2025); a regulação do cultivo com filmes indicaria uma escolha metabólica, isto é, a secreção de lacases pelo Ff, a qual atinge o seu maior valor após essa série de alterações no meio de cultura no 20º dia.

Segundo Kong *et al.* (2025), a biodegradação do polietileno configura-se como um processo complexo, ao passo que Jin *et al.* (2023) afirmam que tal fenômeno ainda carece de informações detalhadas sobre a dinâmica enzimática que atua diretamente sobre o material polimérico e os subprodutos de degradação. Entretanto, ambos concordam com Han *et al.* (2024) que, embora os mecanismos de degradação sugeridos na literatura ainda sejam incompletos e insatisfatórios, a utilização recente das ciências ômicas tem auxiliado na confirmação da presença de diferentes enzimas no ambiente de degradação, além daquelas enzimas tradicionalmente descritas como participando diretamente do processo de degradação, como as alcano-monooxigenases, lacases e peroxidases (representantes das oxirredutases) e as cutinases, esterases e lipases (representantes das hidrolases). Exemplos disso são enzimas como as oxidases multicobre (LCMOs), oxigenases, fenolases e proteases, que atuam em conjunto com as outras oxirredutases e hidrolases. Ainda assim, tentativas de quantificação da atividade enzimática dessas enzimas ainda foram relatadas na literatura recente.

As tirosinases são enzimas da classe das oxidorredutases e incluídas no grupo das fenoloxidasas/polifenoloxidasas. E diferente das lacases que possuem um centro com três moléculas de cobre, catalisando reações menos específicas; as tirosinases possuem somente duas moléculas de cobre e atuam prioritariamente sobre estruturas fenólicas. Estes dois cobres destas monooxigenases estão envolvidos nas duas atividades dessas enzimas: monofenolase/cresolase (hidroxilação de monofenóis em difenóis) e dihidroxifenolase/catecolase (oxidação de difenóis em quinonas) (Maamoun *et al.*, 2021; Khan *et al.*, 2023). Apesar da dependência de substratos fenólicos, a proximidade de suas características com o grupo de enzimas estudado e o ensaio de quantificação relativamente simples e barato justificaram a sua escolha como uma representante para outras enzimas oxidativas auxiliares.

Dito isso, não foram encontrados trabalhos descrevendo experimentalmente a atividade de tirosinases ou proteases na literatura recente associadas à biodegradação bacteriana ou fúngica de polietilenos (Tabela 1 e outros trabalhos citados neste estudo). E por isso, o presente trabalho se insere em uma lacuna relevante no estado da técnica. Pois, a atividade das tirosinases, assim como, a atividade enzimática para proteases superou

significativamente as atividades encontradas para lacases e peroxidases, cerca de 100 e 200 vezes mais, respectivamente (Figuras 11 e 13).

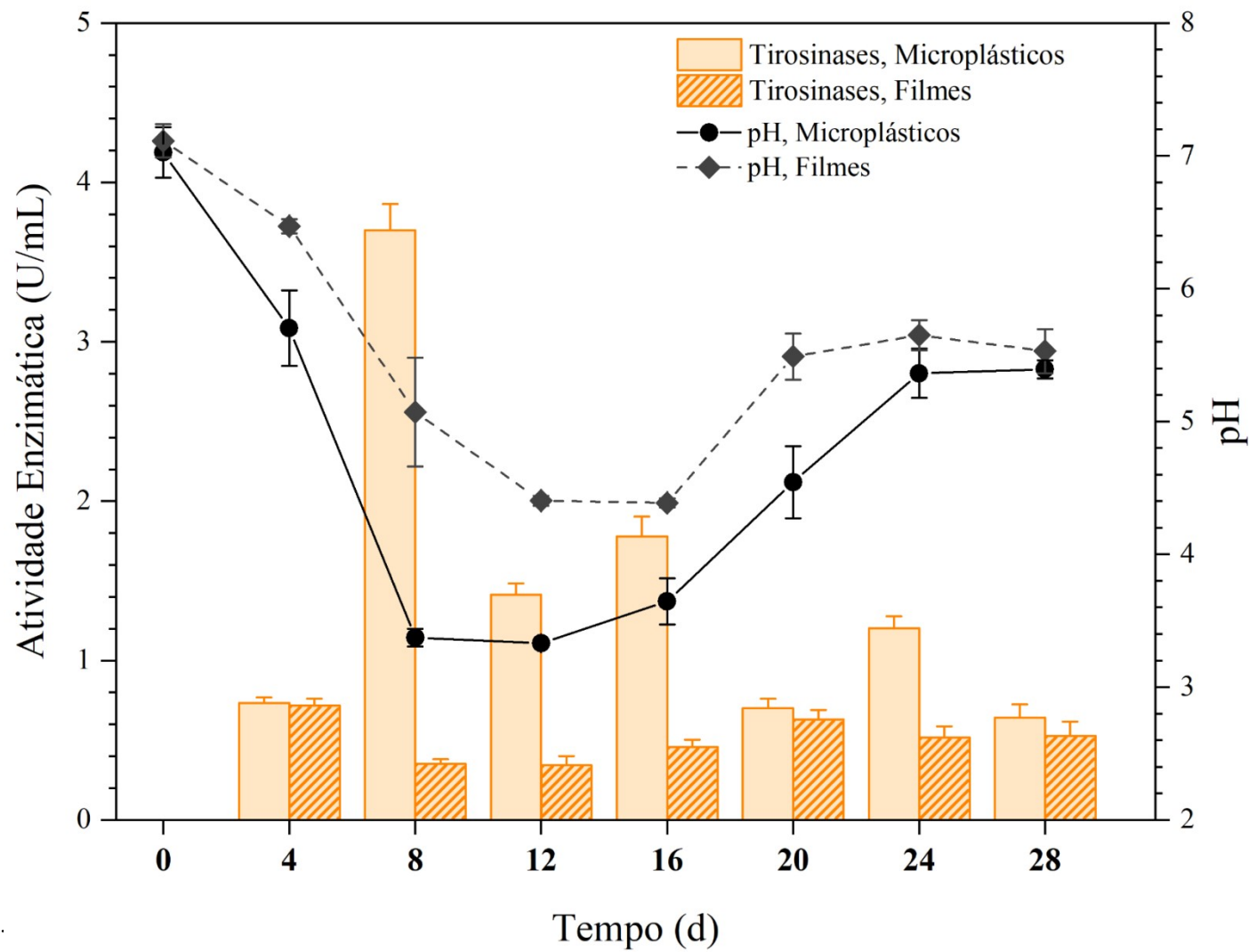
A atividade de tirosinases se manteve presente durante as duas cinéticas, no entanto, apresentou uma atividade média de  $0,5059 \pm 0,0565$  U/mL no cultivo com filmes de PEBD, enquanto no cultivo com  $\mu$ Ps atingiu uma atividade máxima de  $3,698 \pm 0,167$  U/mL após 8 dias de cultivo e uma atividade média de  $1,4526 \pm 0,0877$  U/mL durante todo esse cultivo. Esses resultados podem indicar que as tirosinases atuam expressivamente na degradação desse substrato, assim como, uma afinidade com a atividade das peroxidases e/ou sua secreção esteja relacionada ao estresse fúngico, pois, o pico de tirosinases sucedeu temporalmente o pico das peroxidases (8º dia), mas, retorna a média do cultivo após o 16º dia.

Vale ressaltar que enzimas de grupos análogos, como alceno hidroxilases e alceno monooxigenases, são descritas como essenciais no processo de mineralização. Por essa razão, a literatura recente tende a apontar semelhanças entre a decomposição de poliolefinas e de alcanos maiores; ou seja, seus produtos primários são geralmente alcanos menores que, sob oxidações sucessivas, originam aldeídos, álcoois, ácidos carboxílicos e cetonas. Posteriormente, esses compostos são encaminhados para a  $\beta$ -oxidação, gerando intermediários que se integram ao ciclo de Krebs (Lv *et al.*, 2024; Sridhar *et al.*, 2024; Khatua; Simal-Gandara; Acharya, 2024; Arshad *et al.*, 2025; Zhang *et al.*, 2026).

Além disso, a presença dessas enzimas pode ser inferida como uma das responsáveis pelo escurecimento do meio de cultivo (Fig. 12), pois, geralmente, as quinonas produzidas pela atividade das tirosinases são substrato para a síntese de melaninas (Vazquez-Lima *et al.*, 2025).

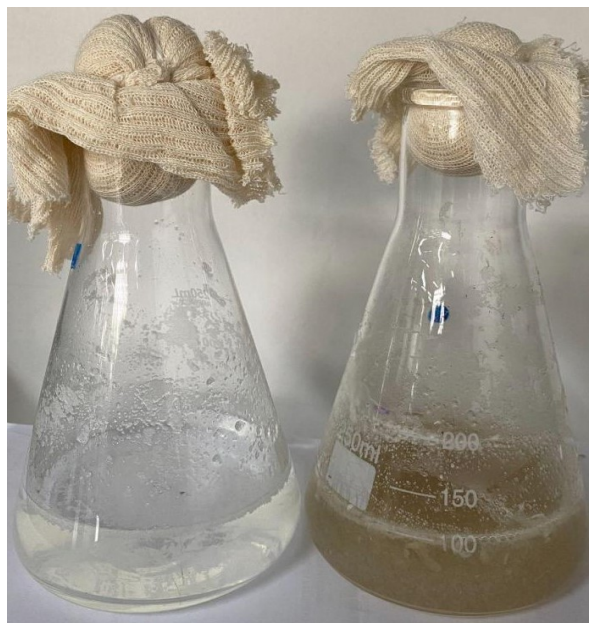
A literatura sobre o papel das proteases as associa a outras hidrolases na modificação da superfície polimérica e consequente redução da hidrofobicidade, o que facilita a adesão microbiana e a ação enzimática sobre as cadeias poliméricas (Othman *et al.*, 2021; Golmohammadi *et al.*, 2023). Porém, o procedimento utilizado para a quantificação neste trabalho seguiu uma variação de Sarath (1989) que avalia a atividade de endopeptidases. E por isso, os resultados apresentados na Figura 13, podem ser interpretados além da confirmação de enzimas semelhantes a essas na cascata de modificação da superfície polimérica e revelar mais informações sobre a dinâmica enzimática no processo de degradação plástica.

Figura 11 - Monitoramento da atividade enzimática para tirosinases em cultivos que utilizaram PEBD como substrato durante 28 dias.



Fonte: Autor (2026).

Figura 12 - Comparação entre o controle abiótico e frasco-amostra da cinética com  $\mu$ Ps.



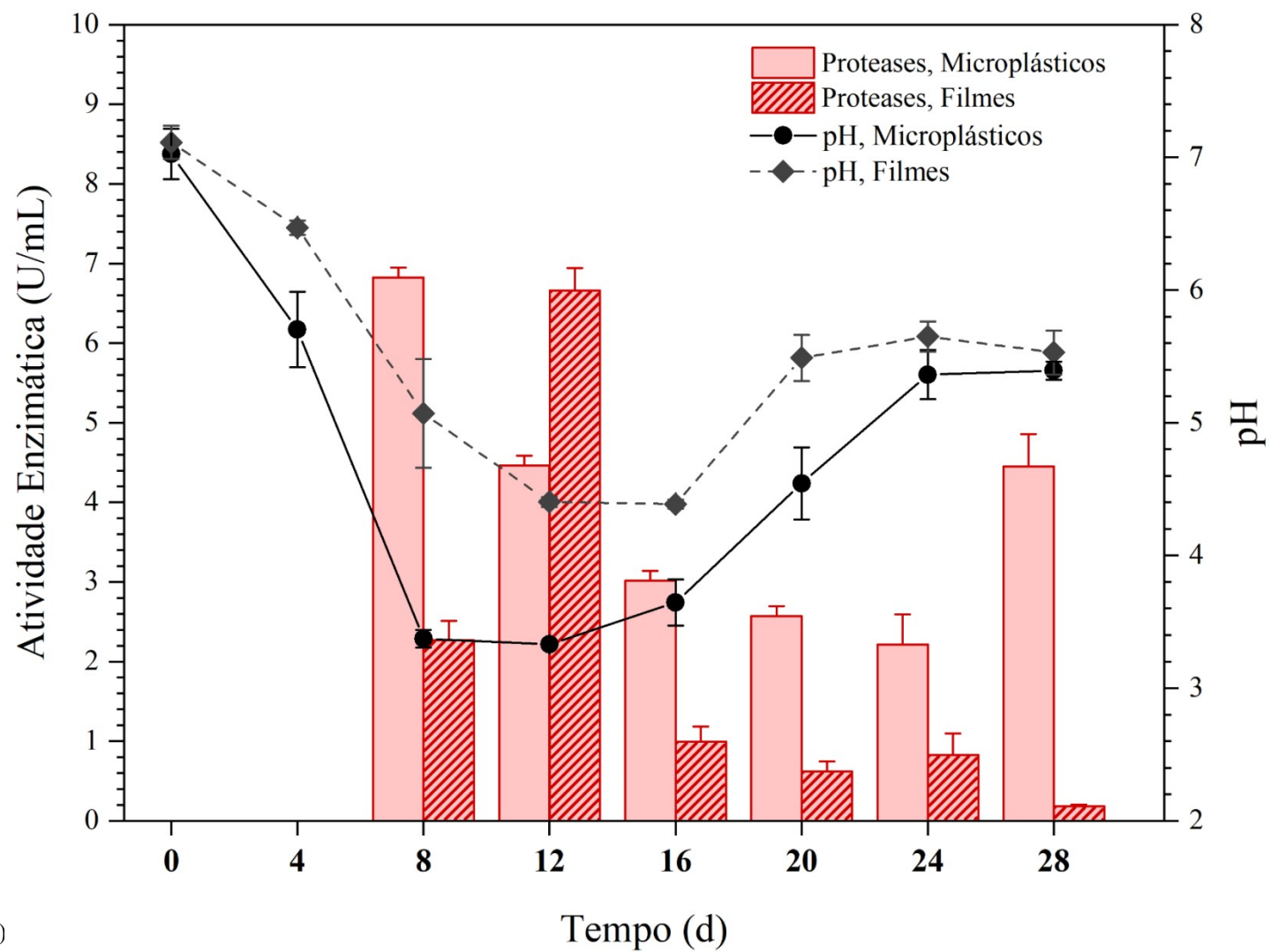
Fonte: Autor (2026).

Legenda: Aspecto visual dos frascos evidenciando (a) à direita, o controle abiótico e (b) à esquerda, o frasco-amostra após 28 dias de cultivo.

As atividades máximas medidas para endopeptidases durante as cinéticas foram muito próximas:  $6,826 \pm 0,125$  U/mL para  $\mu$ Ps e  $6,664 \pm 0,2803$  U/mL para os filmes. Dentre as enzimas analisadas, tais valores figuram como as maiores atividades enzimáticas dos cultivos de biodegradação de PEBD utilizando o Ff RMP5. Os picos de atividade ocorreram em momentos diferentes. Isto é, enquanto a secreção de proteases atingiu o valor máximo nos primeiros 8 dias do cultivo com  $\mu$ Ps, em sincronia com o pico de tirosinases, seguida de queda e retomada no 28º dia; no cultivo com filmes de PEBD, o ápice ocorreu por volta 12º dia, em paralelo à secreção de lacases, entrando em declínio pelo resto do cultivo.

Ao relacionarmos com a argumentação desenvolvida para as outras enzimas analisadas, as proteases secretadas pelo Ff podem estar relacionadas principalmente com a adaptação metabólica ao substrato recalcitrante, ou seja, atuando na reciclagem de nutrientes; tanto para elementos provenientes do meio de cultivo e biomassa, por exemplo, nitrogênio e fósforo de enzimas extracelulares, quanto do carbono obtido a partir da degradação do polietileno. Poderíamos, também, considerar a secreção de proteases pelo Ff como um mecanismo paralelo e integrado à secreção de oxirredutases, a fim contornar o ambiente estressante.

Figura 13 - Monitoramento da atividade enzimática para endoproteases em cultivos que utilizaram PEBD como substrato durante 28 dias.



Fonte: Autor (2026)

Quanto aos efeitos das enzimas sobre o substrato plástico, as Figuras 14 e 15 apresentam os espectros de absorção no infravermelho (FTIR) e os índices oxidativos obtidos a partir deles para o cultivo com  $\mu$ Ps de polietileno.

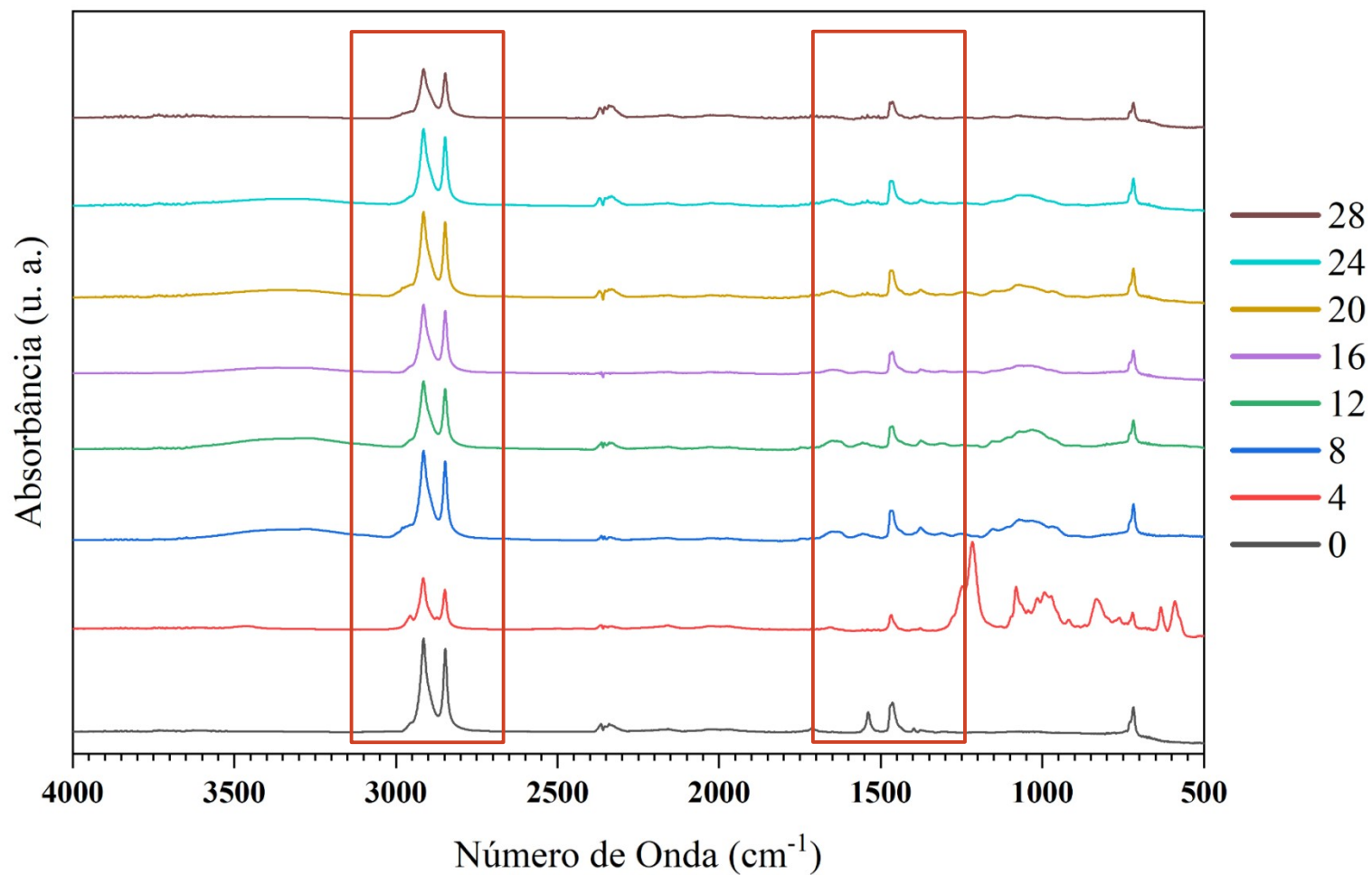
Observou-se alterações semelhantes às encontradas anteriormente nos diferentes tratamentos fúngicos em meio sólido (Tabela 5), entretanto, podemos observar o desenvolvimento dessas modificações no material polimérico. Por exemplo, a formação de bandas entre  $800 - 1400 \text{ cm}^{-1}$  nos primeiros dias do cultivo, região associada a éteres, ácidos carboxílicos e estruturas aromáticas; a formação de banda entre  $3000 - 3500 \text{ cm}^{-1}$  a partir do 8º dia, região associada a ácidos carboxílicos e hidroxilas; ambas, perdem intensidade ao longo do cultivo, indicando possível ação metabólica ao longo. Ao mesmo tempo, regiões que caracterizam estruturas químicas do PEBD, por exemplo, bandas entre  $2900 - 2800 \text{ cm}^{-1}$  que correspondem a vibrações assimétricas e simétricas do grupo C–H alifáticos ou, a região próxima a  $1500 \text{ cm}^{-1}$  que corresponde a deformações e/ou vibrações de  $\text{CH}_2$  apresentaram perda significativa de intensidade, indicando modificações e possíveis reorganizações na estrutura de hidrocarboneto, especialmente nos últimos 4 dias.

Aos espectros, associaram-se os índices de oxidação (Fig. 15), conforme realizado na etapa de seleção, visto que esses parâmetros permitem avaliar a atividade decompositora tanto pela magnitude dos valores quanto pelas estruturas químicas geradas. Para esse propósito, Ojha et al. (2017) e Khruengsai, Sripahco e Pripdeevech (2022) relataram valores elevados de índice de carbonila (IC) após 30 dias de cultivo, seguidos de redução aos 60 e 120 dias, optando-se, portanto, pelos isolados fúngicos que apresentaram atividades mais consistentes. Entretanto, utilizamos esses índices oxidativos com o propósito de monitorar e relacionar alterações no material polimérico com o metabolismo microbiano.

A partir dos resultados na Figura 15, observa-se que o índice de carbonos oxigenados simples (COI) acompanha diretamente o perfil da atividade das peroxidases nos primeiros 12 dias, sugerindo a formação de estruturas como éteres, ésteres e peróxidos. Paralelamente, os índices de carbonila (CI) e de hidroxilas (HI) manifestam-se desde os dias iniciais, embora com valores inferiores. Após a regulação metabólica evidenciada pelas atividades enzimáticas, todos os índices oxidativos declinam, tendendo a zero nos últimos quatro dias de cultivo.

Os resultados de espectroscopia e microscopia eletrônica de varredura para a caracterização dos filmes não serão descritos neste trabalho, visto que contratempos impediram a adição desses resultados e sua discussão em tempo hábil.

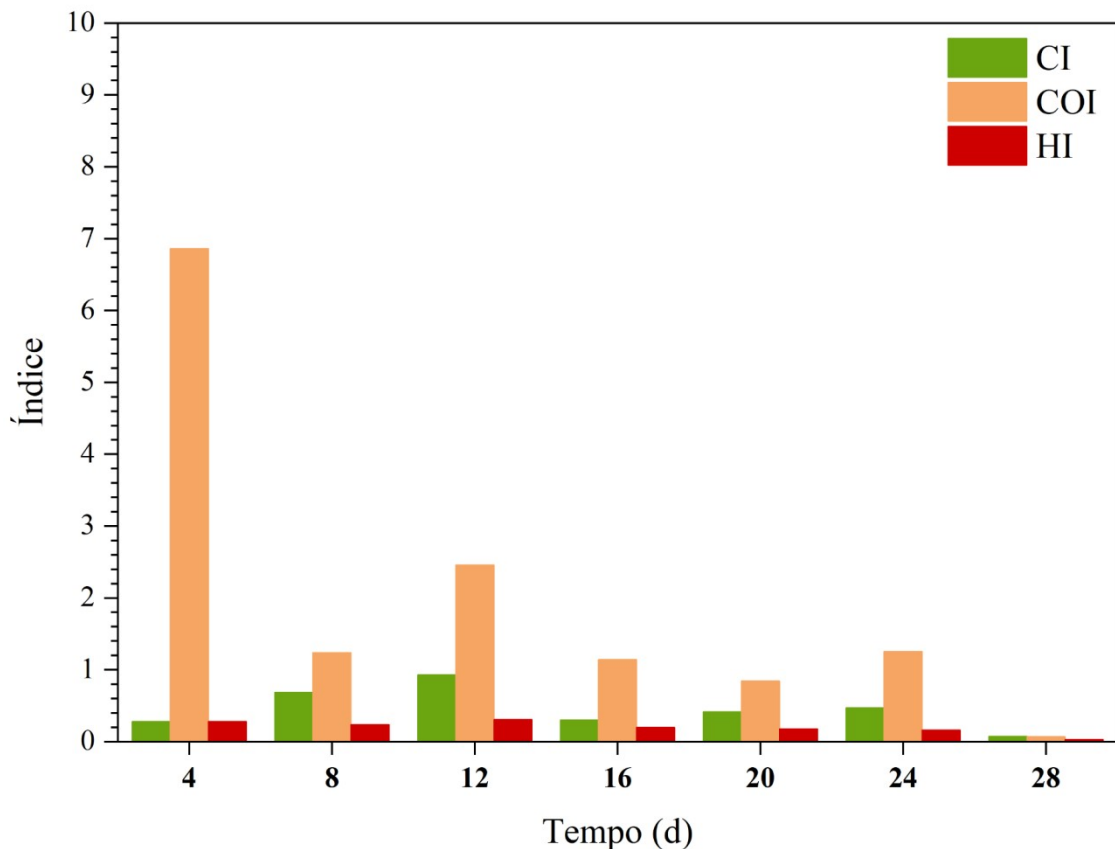
Figura 14 - Espectros de absorção no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) obtidos no intervalo de 4000–500  $\text{cm}^{-1}$  para cinética utilizando  $\mu\text{Ps}$  de PEBD como substrato.



Fonte: Autor (2026).

Legenda: Os destaques em caixas vermelhas são exemplos de alterações ao longo do cultivo fúngico em bandas específicas de PEBD.

Figura 15 - Evolução dos índices oxidativos (IO) obtidos por espectroscopia no infravermelho (FTIR) durante o cultivo de degradação de  $\mu$ Ps.



Fonte: Autor (2026).

Legenda: **CI** (índice de carbonilas), **COI** (índice de carbonos oxigenados simples) e **HI** (índice de hidroxilas).

A análise dos resultados indica que as duas cinéticas operam por mecanismos enzimáticos distintos, embora existam paralelos entre a secreção de enzimas e as alterações físico-químicas do material. Guardadas as devidas proporções e a necessidade de monitoramentos complementares de biomassa e massa plástica, observa-se que o cultivo com  $\mu$ Ps apresentou atividade decompositora em um período inferior a 30 dias quando integramos as atividades enzimáticas com as modificações no substrato polimérico.

Em contraste, o cultivo com filmes exibiu uma dinâmica diferente, possivelmente influenciada pela geometria e pela menor área superficial do polímero, fatores que induziram uma resposta de degradação mais lenta ou ainda em estágio inicial quando comparada com a cinética com  $\mu$ Ps.

## 7 CONCLUSÕES E SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Nove (ASP1, ASP4, ASP6, ASP7, ASP9, RMP5, AQ3A, IPT301 e BAC) dos 15 Ffs utilizados neste trabalho apresentaram interação com o meio salino sob o filme de polietileno após 15 dias. Enquanto todos os tratamentos apresentaram alterações químicas que indicam a ação enzimática do fungo sobre a cadeia polimérica.

Seis (ASP4, ASP9, RMP1, RMP5, BAC e CR04) dos 15 fungos apresentaram halos de coloração expressivos após 4 dias. Indicando o seu potencial como produtores de oxirredutases, principais agentes enzimáticos da despolimerização de polietilenos.

Desse modo, o presente trabalho selecionou o Ff RMP5 como potencial agente de decomposição de PEBD após essas etapas de seleção.

Em seguida, as duas cinéticas de 28 dias utilizando  $\mu$ Ps e filmes de PEBD validaram a ação decompositora do isolado RMP5. Pois, o Ff RMP5 conseguiu reduzir  $21,962 \pm 3,761$  % da massa de plástico para o cultivo que utilizou  $\mu$ Ps de PEBD e  $1,147 \pm 0,162$  % da massa plástica que utilizou filmes de PEBD como substrato.

Nestas cinéticas, o Ff RMP5 apresentou dinâmicas metabólicas diferentes de acordo com a geometria do substrato. Priorizando a secreção de peroxidases ( $0,0648 \pm 0,0062$  U/mL) no cultivo com  $\mu$ Ps e a secreção de lacases ( $0,0313 \pm 0,0023$  U/mL) no cultivo utilizando filmes de PEBD. Durante os dois processos, ocorreu a acidificação do meio de cultura, especialmente para o cultivo com  $\mu$ Ps (3,33). Assim como, a expressiva secreção de tirosinases ( $3,698 \pm 0,167$  U/mL para o cultivo com  $\mu$ Ps) e proteases ( $\sim 6,745$  U/mL). Ademais, as alterações químicas no material em conjunto com o monitoramento das atividades enzimáticas indicam que o Ff reduziu consideravelmente o substrato plástico em tempo inferior a 30 dias.

Desse modo, o presente trabalho contribui para o desenvolvimento de processos de remediação para a poluição plástica ao realizar a seleção de um fungo filamentoso através de etapas de biodegradação em meio sólido e validação de sua capacidade enzimática em cultivos líquidos, nos quais o Ff degradou cerca de  $\frac{1}{4}$  do substrato polimérico.

Ainda assim, o presente estudo reconhece que ainda existem lacunas importantes no estado da técnica e sugere: a otimização de condições ambientais (tempo, temperatura, agitação, pH e composição do meio de cultura), estratégias de recuperação e quantificação de  $\mu$ Ps e a definição de possíveis produtos de interesse a serem obtidos a partir da degradação como perspectivas interessantes para os próximos anos.

## REFERÊNCIAS

- ABID, Umer *et al.* Biorecycling of polyethylene (PE): an integrated effort in pretreatment, degradation, and upcycling. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 13, p. 1692651, 2025.
- <sup>21</sup>AGUIAR, Arthur *et al.* Bioprospecting of Mangrove Filamentous Fungi for the Biodegradation of Polyethylene Microplastics. **Journal of Marine Science and Engineering**, v. 12, n. 9, p. 1629, 2024.
- <sup>31</sup>AIDUANG, W. *et al.* Breaking down linear low-density polyethylene (LLDPE) using fungal mycelium (Part A): a path towards sustainable waste management and its possible economic impacts. **Life**, v. 15, n. 5, p. 755, 2025.
- ALMOND, JASMINE *et al.* Determination of the carbonyl index of polyethylene and polypropylene using specified area under band methodology with ATR-FTIR spectroscopy. **e-Polymers**, v. 20, n. 1, p. 369-381, 2020.
- AMOBONYE, AYODEJI *et al.* Plastic biodegradation: Frontline microbes and their enzymes. **Science of the Total Environment**, v. 759, p. 143536, 2021.
- ANJANA, K. *et al.* Review on plastic wastes in marine environment–Biodegradation and biotechnological solutions. **Marine Pollution Bulletin**, v. 150, p. 110733, 2020.
- AQUA. Barbie Girl. Intérprete: Aqua. In: **Aquarium**. Hamburgo: MCA Records, 1997.
- ARSHAD, Iqra *et al.* Elucidating polyethylene and polypropylene microplastics degradation mechanisms and metabolic pathways via pectin-biochar mediated fungal consortia. **Journal of Hazardous Materials**, p. 139217, 2025.
- AWASTHI, SHRADDHA *et al.* Biodegradation of thermally treated low density polyethylene by fungus *Rhizopus oryzae* NS 5. **3 Biotech**, v. 7, n. 1, p. 73, 2017.
- BAI, CUI-LAN *et al.* Microplastics: A review of analytical methods, occurrence and characteristics in food, and potential toxicities to biota. **Science of the Total Environment**, v. 806, p. 150263, 2022.
- BALASUBRAMANIAN, V. *et al.* Enhancement of in vitro high-density polyethylene (HDPE) degradation by physical, chemical, and biological treatments. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 21, n. 21, p. 12549-12562, 2014.
- BANDARA, THARANGA *et al.* Fate of nano/microplastics and associated toxic pollutants in paddy ecosystems: Current knowledge and future perspectives. **Earth Critical Zone**, v. 1, n. 1, p. 100013, 2024.
- BERNAT, PRZEMYSŁAW *et al.* Adaptation of the metolachlor-degrading fungus *Trichoderma harzianum* to the simultaneous presence of low-density polyethylene (LDPE) microplastics. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 267, p. 115656, 2023.

<sup>8</sup>BERTOLACCI, Laura *et al.* Biocatalytic oxidation of polyethylene by *Agrocybe aegerita* mycelium. **Polymer Degradation and Stability**, v. 199, p. 109911, 2022.

BHELOSE, DHANASHREE; MALIK, NAGESH. Application of laccase produced by marine actinomycetes in accelerating the rate of biodegradation of polyethylene. **The Holistic Approach to Environment**, v. 14, n. 1, p. 1-11, 2024.

BURELO, MANUEL *et al.* Recent developments in bio-based polyethylene: Degradation studies, waste management and recycling. **Heliyon**, v. 9, n. 11, 2023.

CAI, Z.; LI, M.; ZHU, Z.; WANG, X.; HUANG, Y.; LI, T.; GONG, H.; YAN, M. Biological degradation of plastics and microplastics: A recent perspective on associated mechanisms and influencing factors. **Microorganisms**, v. 11, p. 1661, 2023.  
<https://doi.org/10.3390/microorganisms11071661>

CARMEN, S. Capacidade microbiana para a degradação de aditivos químicos presentes em produtos plásticos derivados de petróleo: uma revisão sobre o estado atual e perspectivas. **Journal of Hazardous Materials**, v. 402, p. 123534, 2021.

CARSTENS, Lena *et al.* Biotransformation of phthalate plasticizers and bisphenol A by marine-derived, freshwater, and terrestrial fungi. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, p. 317, 2020.

CANEVAROLO JR, SEBASTIÃO V. **Ciência dos polímeros**. Artliber Editora, São Paulo, v. 24, p. 18, 2024.

CHA, Sangsub *et al.* Liming alters the soil microbial community and extracellular enzymatic activities in temperate coniferous forests. **Forests**, v. 12, n. 2, p. 190, 2021.

CHAMAS, ALI *et al.* Degradation rates of plastics in the environment. **ACS Sustainable Chemistry & Engineering**, v. 8, n. 9, p. 3494-3511, 2020.

CHATURVEDI, Mridula *et al.* Sustainable approach for degradation of low-density polyethylene plastic waste using ligninolytic white rot fungus. **Journal of Basic Microbiology**, p. e2400442, 2025.

<sup>2</sup>CHAUDHARY, Ashutosh Kr *et al.* Synergistic effect of UV, thermal, and chemical treatment on biological degradation of low-density polyethylene (LDPE) by *Thermomyces lanuginosus*. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 193, p. 1-11, 2021.

<sup>9</sup>CHAUDHARY, Ashutosh Kr; CHITRIV, Shubham P.; VIJAYAKUMAR, R. P. Influence of nitric acid on biodegradation of polystyrene and low-density polyethylene by *Cephalosporium* species. **Archives of Microbiology**, v. 204, n. 8, p. 489, 2022.

<sup>14</sup>CHAUDHARY, Ashutosh Kr *et al.* Influence of ultraviolet and chemical treatment on the biodegradation of low-density polyethylene and high-density polyethylene by *Cephalosporium* strain. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 195, n. 3, p. 395, 2023.

CHEVREUIL, Larissa Ramos *et al.* Screening of ligninolytic enzymes produced by *Ganoderma lucidum* in solid residues from the Amazon. **Research, Society and Development**, v. 11, n. 14, p. e243111436257, 2022.

COLL, PEDRO M. *et al.* Purification and characterization of a phenoloxidase (laccase) from the lignin-degrading basidiomycete PM1 (CECT 2971). **Applied and Environmental Microbiology**, v. 59, n. 8, p. 2607-2613, 1993.

DAS, MERINA PAUL; KUMAR, SANTOSH. Microbial deterioration of low density polyethylene by *Aspergillus* and *Fusarium sp.*. **International Journal of ChemTech Research**, v. 6, n. 1, p. 299-305, 2014.

DAS, Merina Paul; KUMAR, Santosh; DAS, Jayabrata. Fungal-mediated deterioration and biodegradation study of low-density polyethylene (LDPE) isolated from municipal dump yard in Chennai, India. **Energy, Ecology and Environment**, v. 3, n. 4, p. 229–236, 2018.

DE OLIVEIRA SIMAS, A. L.; DE ALENCAR GUIMARÃES, N. C.; GLIENKE, N. N. *et al.* Production of phytase, protease and xylanase by *Aspergillus niveus* with rice husk as a carbon source and application of the enzymes in animal feed. **Waste and Biomass Valorization**, v. 15, p. 3939–3951, 2024.

DEO, LOKNATH; BENJAMIN, LINCY KIRUBHADHARSINI; OSBORNE, JABEZ WILLIAM. Critical review on unveiling the toxic and recalcitrant effects of microplastics in aquatic ecosystems and their degradation by microbes. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 196, n. 10, p. 896, 2024.

DEVI, KAMINI *et al.* Current studies on the degradation of microplastics in the terrestrial and aquatic ecosystem. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 30, n. 46, p. 102010-102026, 2023.

<sup>15</sup>DI NAPOLI, Michela *et al.* High density polyethylene (HDPE) biodegradation by the fungus *Cladosporium halotolerans*. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 99, n. 2, fiac148, 2023.

DINAKARKUMAR, Yuvaraj *et al.* **Fungal bioremediation: An overview of the mechanisms, applications and future perspectives.** **Environmental Chemistry and Ecotoxicology**, v. 6, p. 293–302, 2024.

<sup>3</sup>DSOUZA, Glen Cletus *et al.* Fungal biodegradation of low-density polyethylene using consortium of *Aspergillus* species under controlled conditions. **Heliyon**, v. 7, n. 5, 2021.

EICHLEROVÁ, IVANA. The latest trends in cryopreservation of fungi. **Mycological Progress**, v. 24, n. 1, p. 1-18, 2025.

<sup>4</sup>EL-SAYED, Manal T.; RABIE, Gamal H.; HAMED, Esraa A. Biodegradation of low-density polyethylene (LDPE) using the mixed culture of *Aspergillus carbonarius* and *A. fumigates*. **Environment, Development and Sustainability**, v. 23, n. 10, p. 14556-14584, 2021.

EICHLEROVÁ, IVANA. The latest trends in cryopreservation of fungi. **Mycological Progress**, v. 24, n. 1, p. 1-18, 2025.

GAUR, NISHA; NARASIMHULU, KORRAPATI; PYDI SETTY, Y. Extraction of ligninolytic enzymes from novel *Klebsiella pneumoniae* strains and its application in wastewater treatment. **Applied Water Science**, v. 8, n. 4, p. 111, 2018.

GHATGE, SUNIL *et al.* Biodegradation of polyethylene: a brief review. **Applied Biological Chemistry**, v. 63, n. 1, p. 27, 2020.

GILANI, ISRA E. *et al.* Plastic waste impact and biotechnology: Exploring polymer degradation, microbial role, and sustainable development implications. **Bioresource Technology Reports**, v. 24, p. 101606, 2023.

<sup>16</sup>GONG, Zhu *et al.* Biodegradation of low density polyethylene by the fungus *Cladosporium* sp. recovered from a landfill site. **Journal of Fungi**, v. 9, n. 6, p. 605, 2023.

GÓMEZ-MÉNDEZ, Luis D. *et al.* Biodeterioration of plasma pretreated LDPE sheets by *Pleurotus ostreatus*. **PloS One**, v. 13, n. 9, p. e0203786, 2018.

HAN, Yang *et al.* Enzymatic degradation of synthetic plastics by hydrolases/oxidoreductases. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 189, p. 105746, 2024.

<sup>10</sup>HARRAT, Randa *et al.* In Vitro and Ex Situ Biodegradation of Low-Density Polyethylene by a *Rhizopus* sp. Strain Isolated from a Local Dumpsite in North-East Algeria. **Environment and Natural Resources Journal**, v. 20, n. 5, p. 465-474, 2022.

HARTMANN, Caroline *et al.* Fungal pretreatment of sugarcane bagasse: a green pathway to improve saccharification and ethanol production. **BioEnergy Research**, v. 15, n. 2, p. 1130-1143, 2022.

HEINZKILL, M.; BECH, L.; HALKIER, T. *et al.* Characterization of laccases and peroxidases from wood-rotting fungi (family Coprinaceae). **Applied and Environmental Microbiology**, v. 64, p. 1601–1606, 1998.

HOANG, HONG-GIANG *et al.* Investigating the polyethylene degradation mechanism using docking and molecular dynamics simulations. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 31, n. 56, p. 64857-64869, 2024.

HOSSHAIN, M.; ENGELHARDT, I. Global plastic footprint: unveiling property trends, environmental fate, and emerging threats of microplastic and nanoplastics pollution across ecosystems. **Energy, Ecology and Environment**, 2025. <https://doi.org/10.1007/s40974-025-00383-7>

<sup>22</sup>IBRAHIM, Sabreen S.; IONESCU, Danny; GROSSART, Hans-Peter. Tapping into fungal potential: Biodegradation of plastic and rubber by potent fungi. **Science of the Total Environment**, v. 934, p. 173188, 2024.

IHSANULLAH, IHSANULLAH *et al.* Eco-Friendly solutions to emerging contaminants: Unveiling the potential of bioremediation in tackling microplastic pollution in water. **Advanced Sustainable Systems**, v. 8, n. 11, p. 2400172, 2024.

JIN, Jin *et al.* Enzymatic polyethylene biorecycling: confronting challenges and shaping the future. **Journal of Hazardous Materials**, v. 460, p. 132449, 2023.

KHAN, AMNA KOMAL; MAJEED, TANVEER. Biodegradation of synthetic and natural plastics by microorganisms: a mini review. **Journal of Natural and Applied Sciences Pakistan**, v. 1, n. 2, p. 180-184, 2019.

KANG, Bo Ram *et al.* Accelerating the biodegradation of high-density polyethylene (HDPE) using *Bjerkandera adusta* TBB-03 and lignocellulose substrates. **Microorganisms**, v. 7, n. 9, p. 304, 2019.

KHAN, Mohd Faheem *et al.* Recent advances in fungal xenobiotic metabolism: enzymes and applications. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 39, n. 11, p. 296, 2023.

<sup>17</sup>KHAN, Shazia; ALI, Sharique A.; ALI, Ayesha S. Biodegradation of low density polyethylene (LDPE) by mesophilic fungus *Penicillium citrinum* isolated from soils of plastic waste dump yard, Bhopal, India. **Environmental Technology**, v. 44, n. 15, p. 2300-2314, 2023.

KHATUA, SOMANJANA; SIMAL-GANDARA, JESUS; ACHARYA, KRISHNENDU. Myco-remediation of plastic pollution: current knowledge and future prospects. **Biodegradation**, v. 35, n. 3, p. 249-279, 2024.

KHAMPRATUENG, PORNYA; RICE, DANIEL; ANAL, ANIL KUMAR. Biodegradation of low-density polyethylene by the bacterial strains isolated from the dumping site community. **Discover Applied Sciences**, v. 6, n. 7, p. 348, 2024.

<sup>5</sup>KHRUENGSAI, Sarunpron; SRIPAHCO, Teerapong; PRIPDEEVECH, Patcharee. Low-density polyethylene film biodegradation potential by fungal species from Thailand. **Journal of Fungi**, v. 7, n. 8, p. 594, 2021.

<sup>11</sup>KHRUENGSAI, Sarunpron; SRIPAHCO, Teerapong; PRIPDEEVECH, Patcharee. Microbial degradation of low-density polyethylene by *Neopestalotiopsis phangngaensis*. **The Journal of General and Applied Microbiology**, v. 68, n. 6, p. 287-294, 2022.

KONG, Yun *et al.* Recent progresses and perspectives of polyethylene biodegradation by bacteria and fungi: A review. **Journal of Contaminant Hydrology**, v. 269, p. 104499, 2025.

KIM, Jung In; YANG, Yerang; KANG, Hojeong. Fluorometric assay for phenol oxidase activity in soils and its controlling variables. **Applied Soil Ecology**, v. 195, p. 105240, 2024.

LALRINFELA, PACHUAU *et al.* Microplastics: Their effects on the environment, human health, and plant ecosystems. **Environmental Pollution and Management**, 2024.

- LEE, BYUNGTAE *et al.* Biodegradation of degradable plastic polyethylene by Phanerochaete and Streptomyces species. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 57, n. 3, p. 678-685, 1991.
- LI, KUI *et al.* Microplastic pollution as an environmental risk exacerbating the greenhouse effect and climate change: a review. **Carbon Research**, v. 3, n. 1, p. 9, 2024.
- LIU, LINGCHEN *et al.* On the degradation of (micro) plastics: Degradation methods, influencing factors, environmental impacts. **Science of the Total Environment**, v. 806, p. 151312, 2022.
- LV, Shiwei *et al.* Biodegradation of typical plastics: from microbial diversity to metabolic mechanisms. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 25, n. 1, p. 593, 2024.
- MAAMOUN, Hanaa Salah *et al.* Biochemical properties of tyrosinase from *Aspergillus terreus* and *Penicillium copticola*. **Molecules**, v. 26, n. 5, p. 1309, 2021.
- <sup>30</sup>MAISTO, Maria *et al.* Advances in plastic mycoremediation: Focus on the isoenzymes of the lignin degradation complex. **Science of the Total Environment**, v. 948, p. 174554, 2024.
- MANO, ELOISA BISASOTTO; MENDES, LUIS CLAUDIO. **Introdução a Polímeros – 2**, ed. ver. e ampl. Editora Edgard Blucher Ltda, São Paulo, 2004.
- MASON, H. S. The chemistry of melanin: III. Mechanism of the oxidation of dihydroxyphenylalanine by tyrosinase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 172, n. 1, p. 83–99, 1948.
- MOHAN, Priya; HAMID, Fauziah Shahul. Biodegradation of PET and PE by tropical landfill derived *Aspergillus fumigatus*. **Bioresource Technology Reports**, p. 102534, 2026.
- MONTAZER, ZAHRA; HABIBI NAJAFI, MOHAMMAD B.; LEVIN, DAVID B. Challenges with verifying microbial degradation of polyethylene. **Polymers**, v. 12, n. 1, p. 123, 2020.
- NABI, IQRA *et al.* Biodegradation of macro-and micro-plastics in environment: A review on mechanism, toxicity, and future perspectives. **Science of the Total Environment**, v. 858, p. 160108, 2023.
- <sup>23</sup>NAIR, S. *et al.* Degradation of high-density polyethylene mediated by Fungus *Talaromyces liani* JA2HS. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 60, n. 5, p. 880-888, 2024.
- NAYANATHARA THATHSARANI PILAPITIYA, P. G. C.; RATNAYAKE, AMILA SANDARUWAN. The world of plastic waste: A review. **Cleaner Materials**, v. 11, p. 100220, 2024.
- NATIONAL CENTERS FOR ENVIRONMENTAL INFORMATION. Marine Microplastics. **NOAA**, 2018.

- ONG, Ghim Hock *et al.* Screening of native fungi for biodegradation of high-density polyethylene (HDPE) plastic in mangroves ecosystem. **Malaysian Applied Biology**, v. 53, n. 6, p. 97-103, 2024.
- OJHA, Nupur *et al.* Evaluation of HDPE and LDPE degradation by fungus, implemented by statistical optimization. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 39515, 2017.
- OMIDOYIN, Kehinde Caleb *et al.* Biodegradation of low-density polyethylene microplastics by *Fusarium* and *Penicillium* strains. **Journal of Environmental Management**, v. 394, p. 127477, 2025.
- OTHMAN, Ahmad Razi *et al.* Microbial degradation of microplastics by enzymatic processes: a review. **Environmental Chemistry Letters**, v. 19, n. 4, p. 3057–3073, 2021.
- PANKE-BUISSSE, Kevin *et al.* Root fungal endophytes and microbial extracellular enzyme activities show patterned responses in tall fescues under drought conditions. **Agronomy**, v. 10, n. 8, p. 1076, 2020.
- PARVEZ, MD SOHEL *et al.* Role of microplastics in global warming and climate change: A review. **Water, Air, & Soil Pollution**, v. 235, n. 3, p. 201, 2024.
- PÉREZ-GARCÍA, Pablo *et al.* Microbial plastic degradation: enzymes, pathways, challenges, and perspectives. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 89, n. 4, p. e00087-24, 2025.
- <sup>12</sup>PERERA, T. W. N. K. *et al.* Biodeterioration of low-density polyethylene by mangrove-associated endolichenic fungi and their enzymatic regimes. **Letters in Applied Microbiology**, v. 75, n. 6, p. 1526-1537, 2022.
- <sup>18</sup>PERERA, Prameesha *et al.* Wood decay fungi show enhanced biodeterioration of low-density polyethylene in the absence of wood in culture media. **Plos One**, v. 18, n. 7, e0288133, 2023.
- POMERANTZ, S. H.; MURTHY, V. V. Purification and properties of tyrosinases from *Vibrio tyrosinaticus*. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 160, p. 73–82, 1974.
- PORTER, RACHEL *et al.* Degradation of polypropylene by fungi *Coniochaeta hoffmannii* and *Pleurostoma richardsiae*. **Microbiological Research**, v. 277, p. 127507, 2023.
- <sup>19</sup>PULIGA, Federico *et al.* *Cladosporium cladosporioides* (strain Clc/1): a candidate for low-density polyethylene degradation. **Chemical and Biological Technologies in Agriculture**, v. 10, n. 1, p. 50, 2023.
- RAKIB, MD REFAT JAHAN *et al.* Microplastic toxicity in aquatic organisms and aquatic ecosystems: a review. **Water, Air, & Soil Pollution**, v. 234, n. 1, p. 52, 2023.
- <sup>25</sup>RAMANAYAKE, Gimhani Dalpasari *et al.* Biodegradation potential of low-density polyethylene (LDPE) by soil-inhabiting ascomycetous microfungi isolated from urban dumpsites. **International Journal of Environmental Studies**, v. 81, n. 6, p. 2520-2539, 2024.

RAMOS, Jorge Guillermo Morales *et al.* Efficiency of microorganisms and effectiveness of biodegradation techniques on LDPE plastics. **F1000Research**, v. 13, p. 745, 2024.

REZAEI, ZEINAB; DINANI, AMIR SOLEIMANI; MOGHIMI, HAMID. Cutting-edge developments in plastic biodegradation and upcycling via engineering approaches. **Metabolic Engineering Communications**, p. e00256, 2024.

ROY, ARCHITA; CHAKRABORTY, SWATI. A comprehensive review on sustainable approach for microbial degradation of plastic and its challenges. **Sustainable Chemistry for the Environment**, v. 7, p. 100153, 2024.

ROJAS-VILLACORTA, Walter *et al.* Biodegradation of low-density polyethylene by native *Aspergillus* strains. **Sustainability**, v. 17, n. 20, p. 8983, 2025.

RUGINESCU, Robert; PURCAREA, Cristina. Plastic-degrading enzymes from marine microorganisms. **Marine Drugs**, v. 22, n. 10, p. 441, 2024.

<sup>13</sup>SAEED, Saira; IQBAL, Atia; DEEBA, Farah. Biodegradation study of Polyethylene and PVC using naturally occurring plastic degrading microbes. **Archives of Microbiology**, v. 204, n. 8, p. 497, 2022.

<sup>26</sup>SAFDAR, Ayesha *et al.* Determination of biodegradation potential of *Aspergillus niger*, *Candida albicans*, and *Acremonium sclerotigenum* on polyethylene, polyethylene terephthalate, and polystyrene microplastics. **International Journal of Microbiology**, v. 2024, n. 1, p. 7682762, 2024.

<sup>7</sup>SAIRA, *et al.* Biodegradation of Low-Density Polyethylene (LDPE) Bags by Fungi Isolated From Waste Disposal Soil. **Applied and Environmental Soil Science**, v. 2022, n. 1, p. 8286344, 2022.

SALAH MAAMOUN, Hanaa *et al.* Biochemical properties of tyrosinase from *Aspergillus terreus* and *Penicillium copiticola*; undecanoic acid from *Aspergillus flavus*, an endophyte of *Moringa oleifera*, is a novel potent tyrosinase inhibitor. **Molecules**, v. 26, n. 5, p. 1309, 2021.

<sup>27</sup>SALINAS, Jesús *et al.* Microbial consortia for multi-plastic waste biodegradation: Selection and validation. **Environmental Technology & Innovation**, v. 36, p. 103887, 2024.

SARATH, G.; DE LA MOTTE, R. S.; WAGNER, F. W. Protease assay methods. In: BEYNON, R. J.; BOND, J. S. (ed.). *Proteolytic enzymes: a practical approach*. **Oxford: IRL Press**, 1989. p. 25-56.

SINGH, POOJA *et al.* Microbial degradation of low-density polyethylene, polyethylene terephthalate, and polystyrene by novel isolates from plastic-polluted environment. **Archives of Microbiology**, v. 206, n. 4, p. 188, 2024.

SON, JIN-SOO *et al.* Enzymatic oxidation of polyethylene by *Galleria mellonella* intestinal cytochrome P450s. **Journal of Hazardous Materials**, v. 480, p. 136264, 2024.

- SOUZA, Paula Monteiro de *et al.* A biotechnology perspective of fungal proteases. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 46, p. 337–346, 2015.
- SOWMYA, H. V. *et al.* Degradation of polyethylene by *Trichoderma harzianum*. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 186, n. 10, p. 6577–6586, 2014.
- SOWMYA, H. V. *et al.* Degradation of polyethylene by *Penicillium simplicissimum*. **Environment, Development and Sustainability**, v. 17, n. 4, p. 731–745, 2015.
- <sup>6</sup>SPINA, F. *et al.* Low density polyethylene degradation by filamentous fungi. **Environmental Pollution**, v. 274, p. 116548, 2021. DOI: 10.1016/j.envpol.2021.116548.
- <sup>28</sup>SATHIYABAMA, M. *et al.* Mycodegradation of low-density polyethylene by *Cladosporium sphaerospermum*, isolated from platisphere. **Scientific Reports**, v. 14, n. 1, p. 8351, 2024.
- SCHNEIDER, W. D. H.; FONTANA, R. C.; MENDONÇA, S. *et al.* High level production of laccases and peroxidases from the newly isolated white-rot basidiomycete *Marasmiellus palmivorus* VE111 in a stirred-tank bioreactor in response to different carbon and nitrogen sources. **Process Biochemistry**, v. 69, p. 1–11, 2018.
- SOWJANYA, G.; GIRIJASANKAR, G. Production of L-tyrosinase from novel variants of *Streptomyces cellulosae*. **Indian Journal of Pharmaceutical Education and Research**, v. 57, n. 1s, p. s22-s31, 2023.
- TEMPORITI, MARTA ELISABETTA ELEONORA *et al.* Fungal enzymes involved in plastics biodegradation. **Microorganisms**, v. 10, n. 6, p. 1180, 2022.
- TSIGAIN, FABRICE TSIGAING *et al.* Enzymatic activities, characteristics of wood-decay and wood substrate specificity within genera of some wood-rotting basidiomycetes from Cameroon and Tropical Africa. **European Journal of Biology and Biotechnology**, v. 3, n. 1, p. 11-23, 2022.
- VAZQUEZ-LIMA, Cesar G. *et al.* Historical insights into the purification of polyphenol oxidase. **Food Science & Nutrition**, v. 13, n. 11, p. e71175, 2025.
- VETCHINKINA, Elena; MESHCHEROV, Azat; GORSHKOV, Vladimir. Differential activity of the extracellular phenoloxidases in different strains of the phytopathogenic fungus *Microdochium nivale*. **Journal of Fungi**, v. 8, n. 9, p. 918, 2022.
- VILLARRUBIA-GÓMEZ, PATRICIA *et al.* Plastics pollution exacerbates the impacts of all planetary boundaries. **One Earth**, v. 7, n. 12, p. 2119-2138, 2024.
- WOLFENDEN, Brian S.; WILLSON, Robin L. Radical-cations as reference chromogens in kinetic studies of one-electron transfer reactions: pulse radiolysis studies of 2,2'-azinobis-(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonate). **Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 2**, n. 7, p. 805-812, 1982.

<sup>20</sup>WRÓBEL, Mariusz *et al.* Selection of microorganisms capable of polyethylene (PE) and polypropylene (PP) degradation. **Microbiological Research**, v. 267, p. 127251, 2023.

YAMADA-ONODERA, KEIKO *et al.* Degradation of polyethylene by a fungus, *Penicillium simplicissimum* YK. **Polymer Degradation and Stability**, v. 72, n. 2, p. 323-327, 2001.

<sup>29</sup>YANG, Wei-Kang *et al.* Biodegradation of low-density polyethylene by mixed fungi composed of *Alternaria* sp. and *Trametes* sp. isolated from landfill sites. **BMC Microbiology**, v. 24, n. 1, p. 321, 2024.

ZAJC, JANJA *et al.* Stress-tolerant yeasts: opportunistic pathogenicity versus biocontrol potential. **Genes**, v. 10, n. 1, p. 42, 2019.

ZAHRA, SAHEBNAZAR *et al.* Biodegradation of low-density polyethylene (LDPE) by isolated fungi in solid waste medium. **Waste Management**, v. 30, n. 3, p. 396-401, 2010.

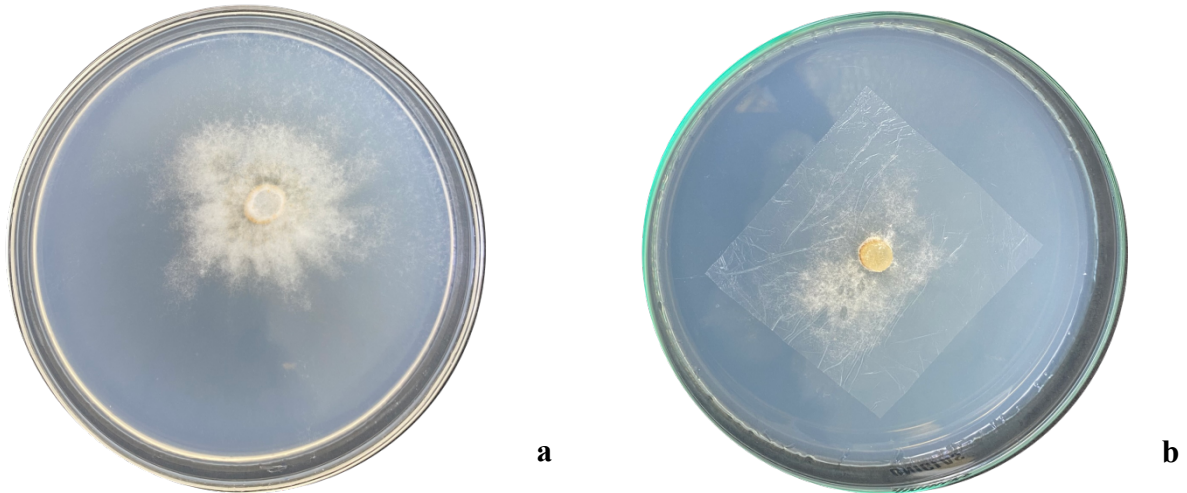
<sup>1</sup>ZHANG, Junqing *et al.* Biodegradation of polyethylene microplastic particles by the fungus *Aspergillus flavus* from the guts of wax moth *Galleria mellonella*. **Science of the Total Environment**, v. 704, p. 135931, 2020.

ZAINI, NURFADHILAH *et al.* Plastic pollution and degradation pathways: a review on the treatment technologies. **Heliyon**, v. 10, n. 7, 2024.

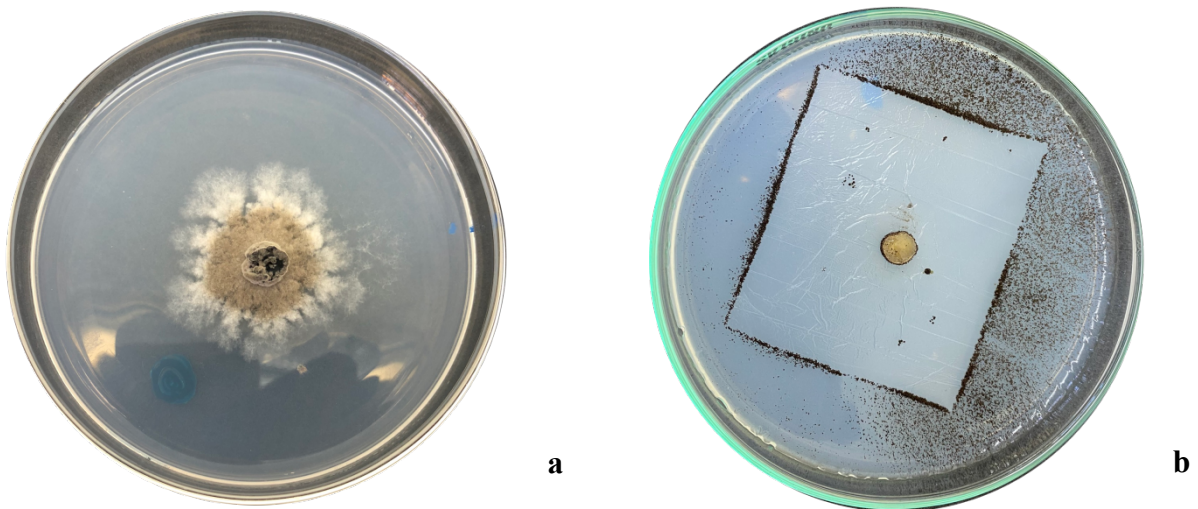
ZHANG, Yuan *et al.* Biodegradation characteristics and pathway elucidation of polyethylene combined pollution. **Biochemical Engineering Journal**, p. 110027, 2025.

**APÊNDICE A - FUNGOS CRESCIDOS NO MEIO SALINO (CONTROLE)<sup>a</sup> E SOBRE O FILME DE PEBD<sup>b</sup>**

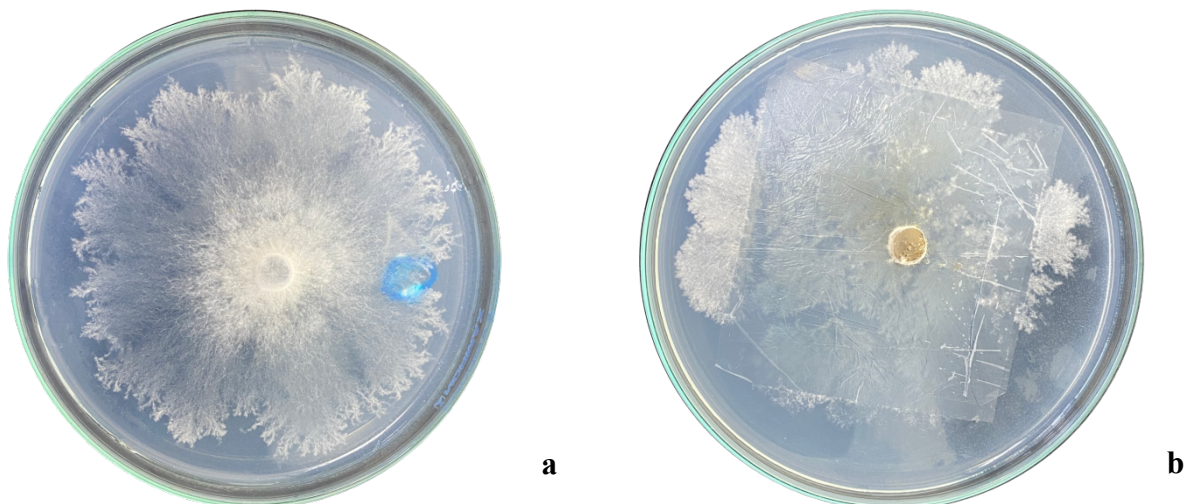
**Figura 1** - ASP1, *Colletotrichum sp.*



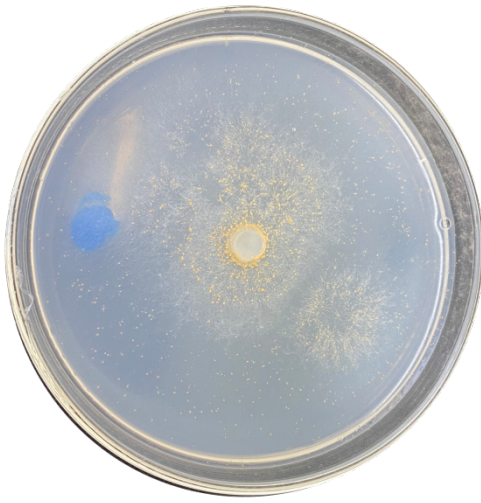
**Figura 2** - ASP2, *Diaporthe sp.*



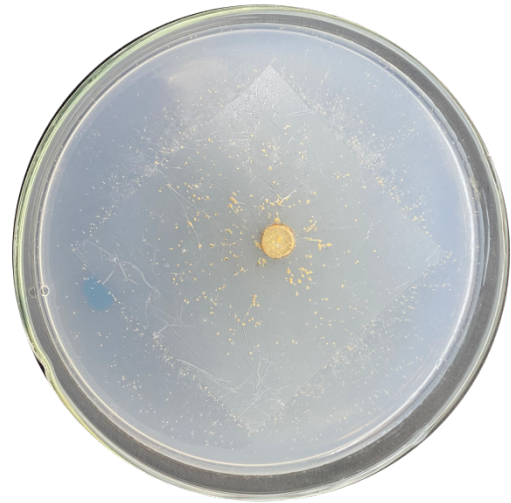
**Figura 3** - ASP4, Não identificado



**Figura 4 - ASP6, *Colletotrichum apelinum***

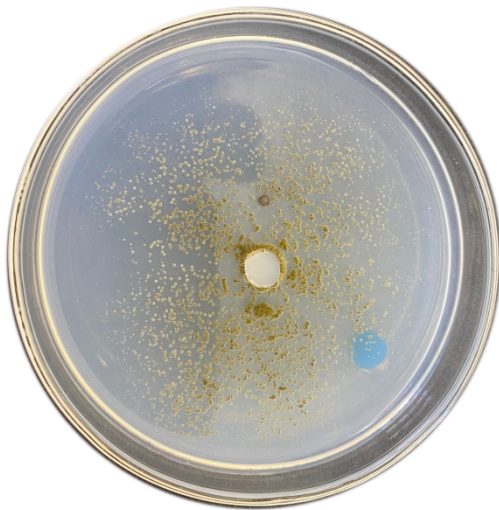


**a**

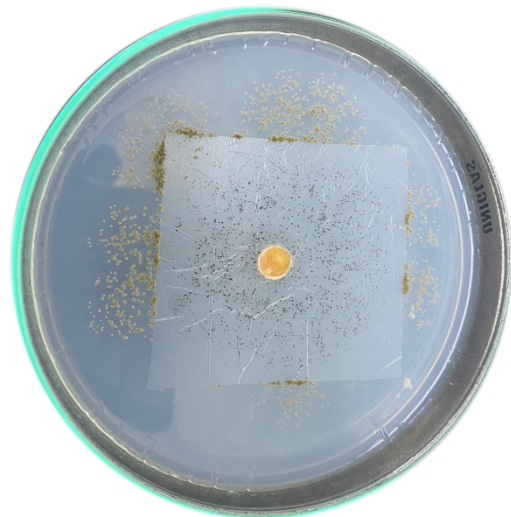


**b**

**Figura 5 - ASP7, Não identificado**

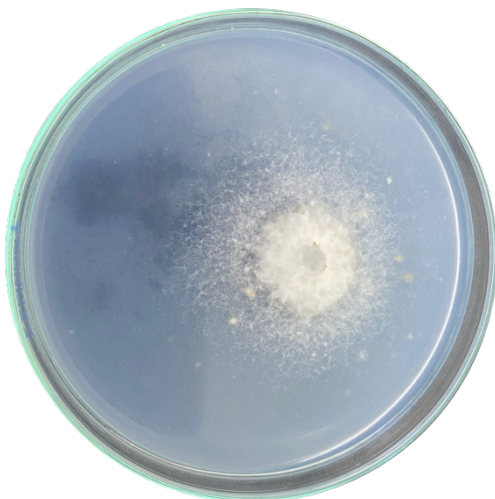


**a**

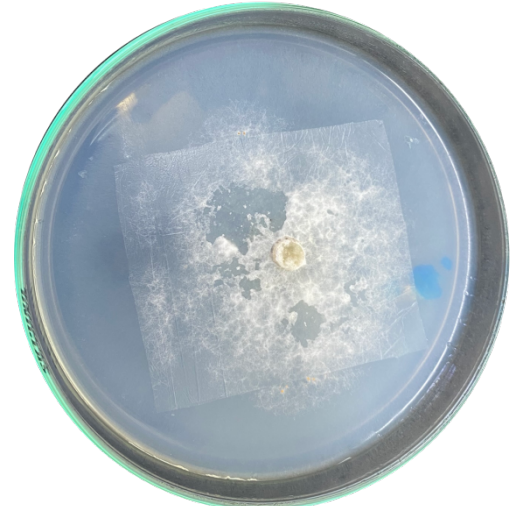


**b**

**Figura 6 - ASP9, Não identificado**



**a**

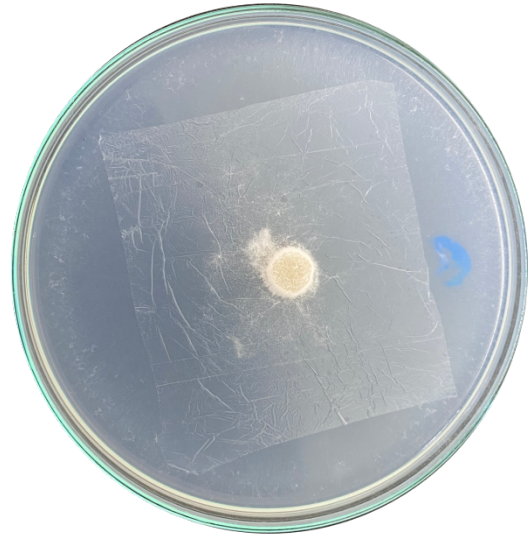


**b**

**Figura 7 - RMP1, Não identificado**



**a**

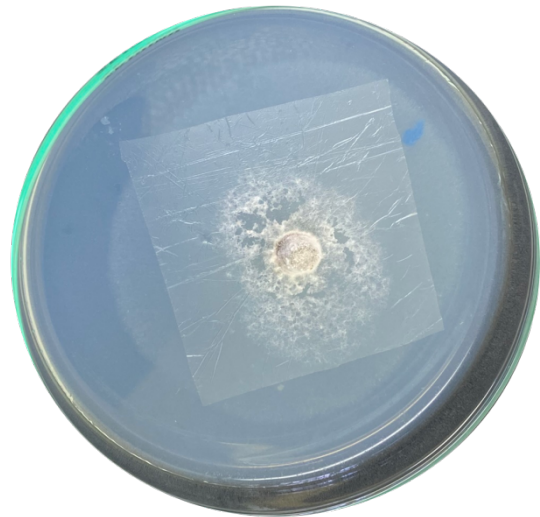


**b**

**Figura 8 - RMP3, Não identificado**

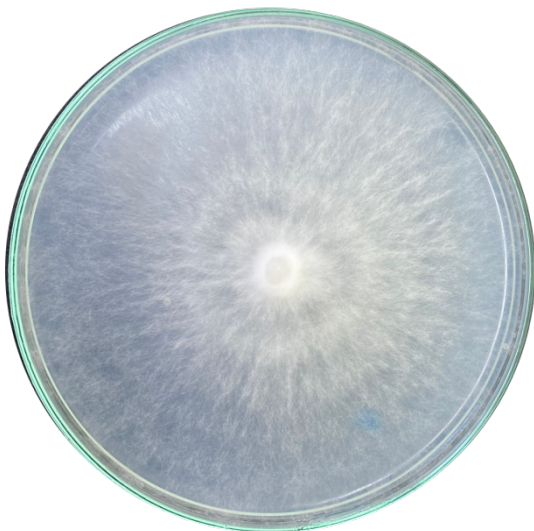


**a**

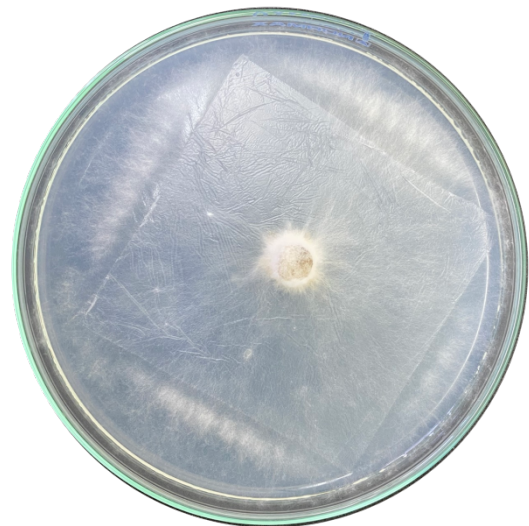


**b**

**Figura 9 - RMP5, Não identificado**

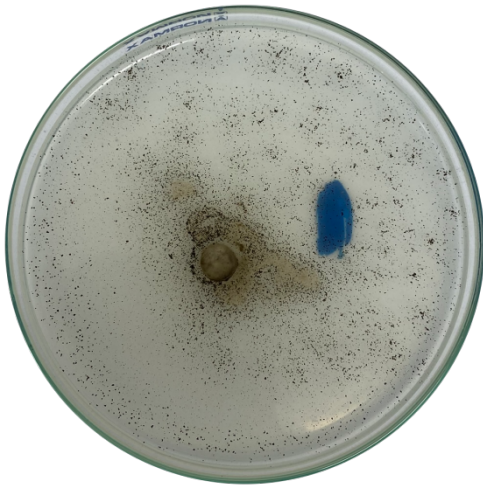


**a**

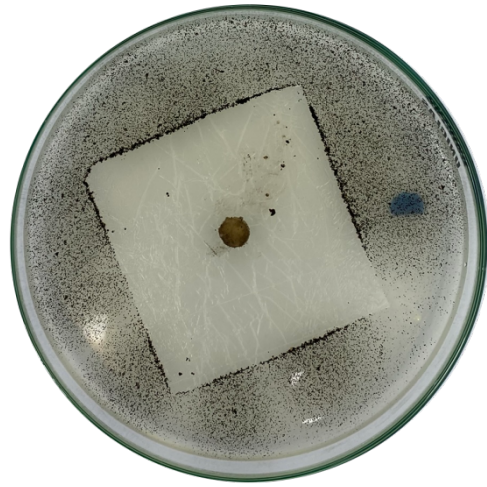


**b**

**Figura 10 - IBCLP20, *Aspergillus* sp.**

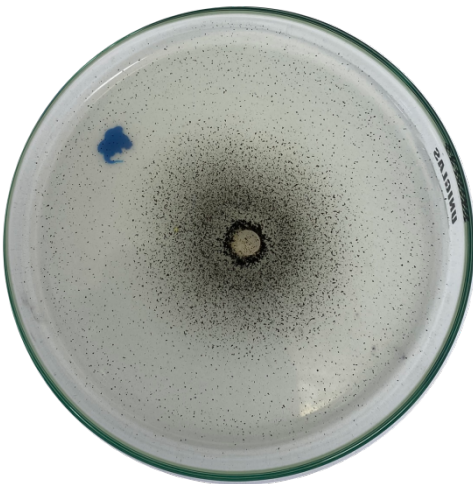


a

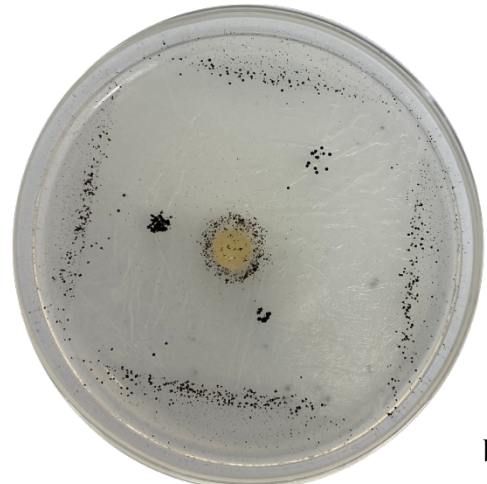


b

**Figura 11 - AQ2A, *Aspergillus* sp.**



a

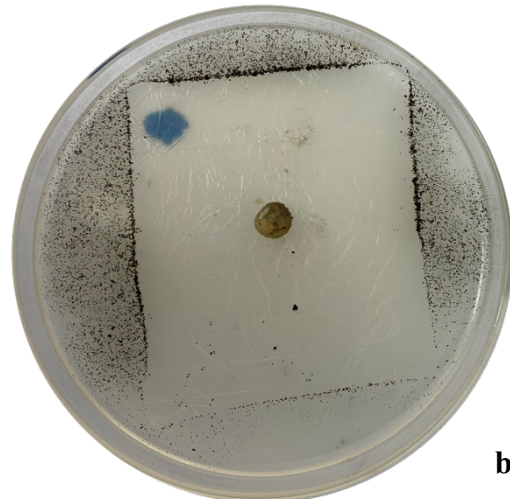


b

**Figura 12 - AQ3A, *Aspergillus* sp.**



a

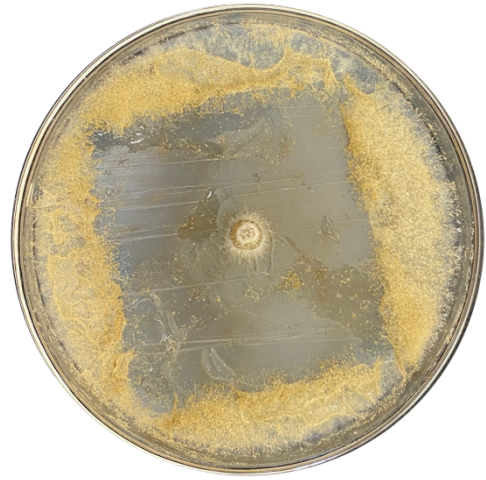


b

**Figura 13 - IPT301, *Aspergillus oryzae***



**a**

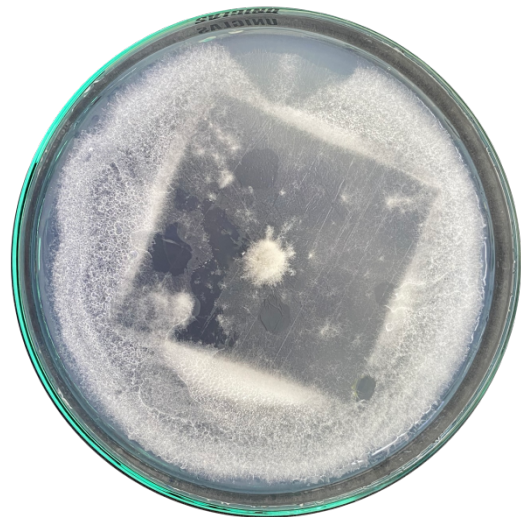


**b**

**Figura 14 - BAC, *Fusarium fujikuroi***

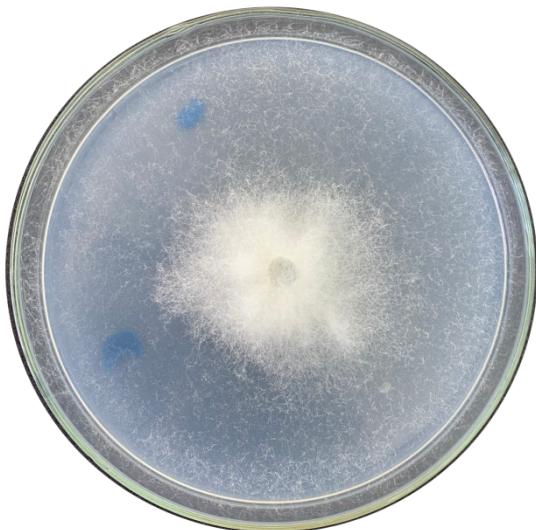


**a**

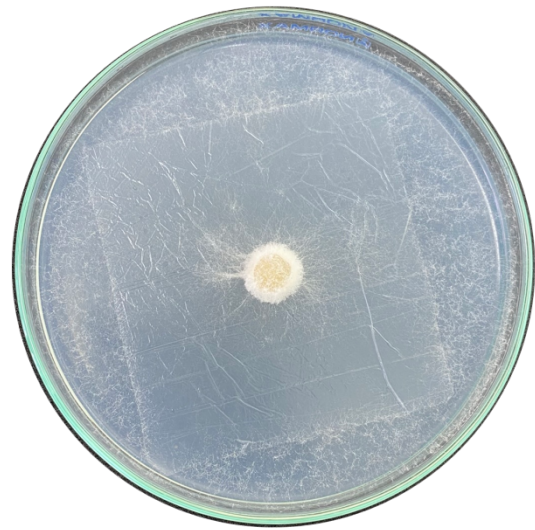


**b**

**Figura 15 - CR04, Não identificado**

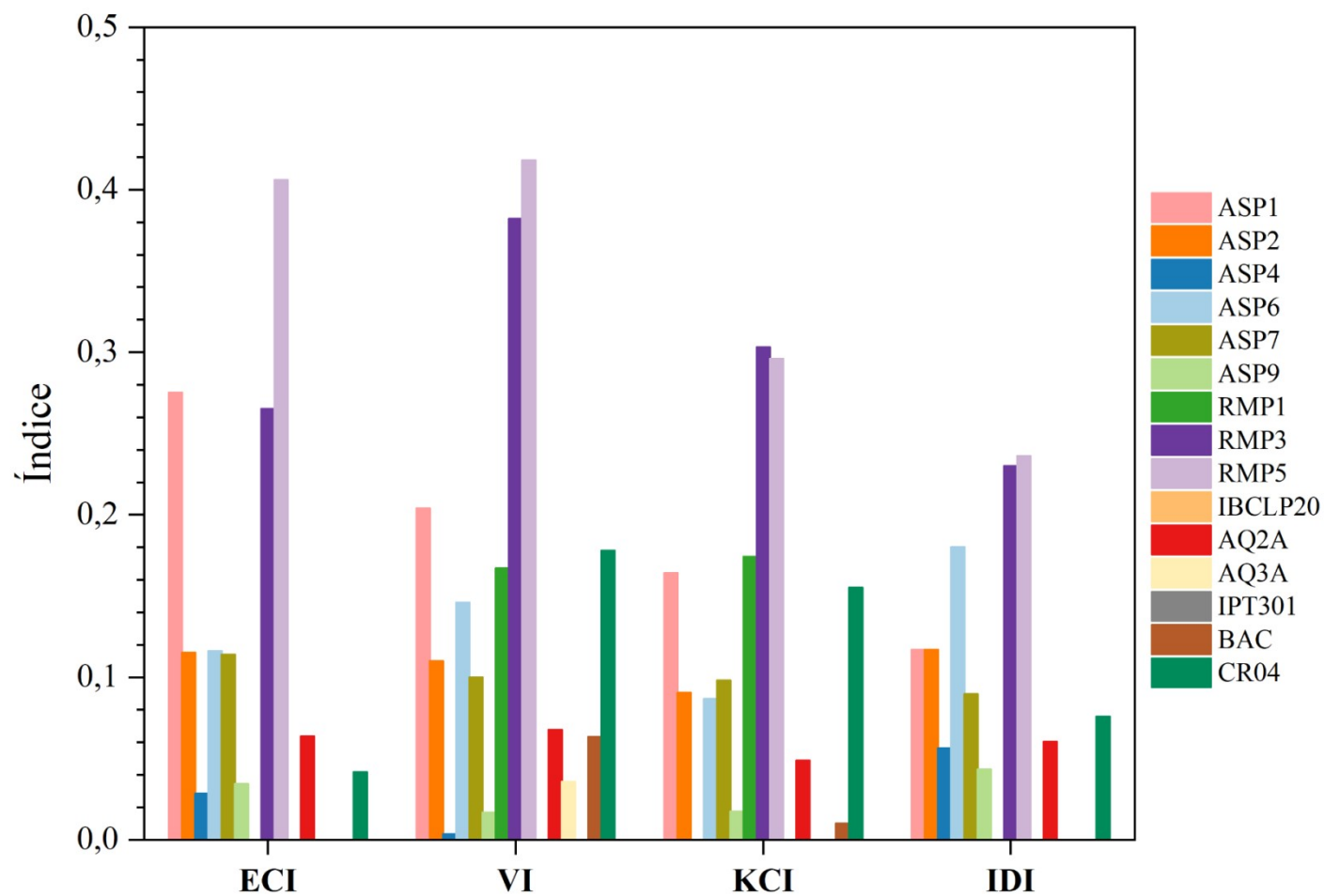


**a**



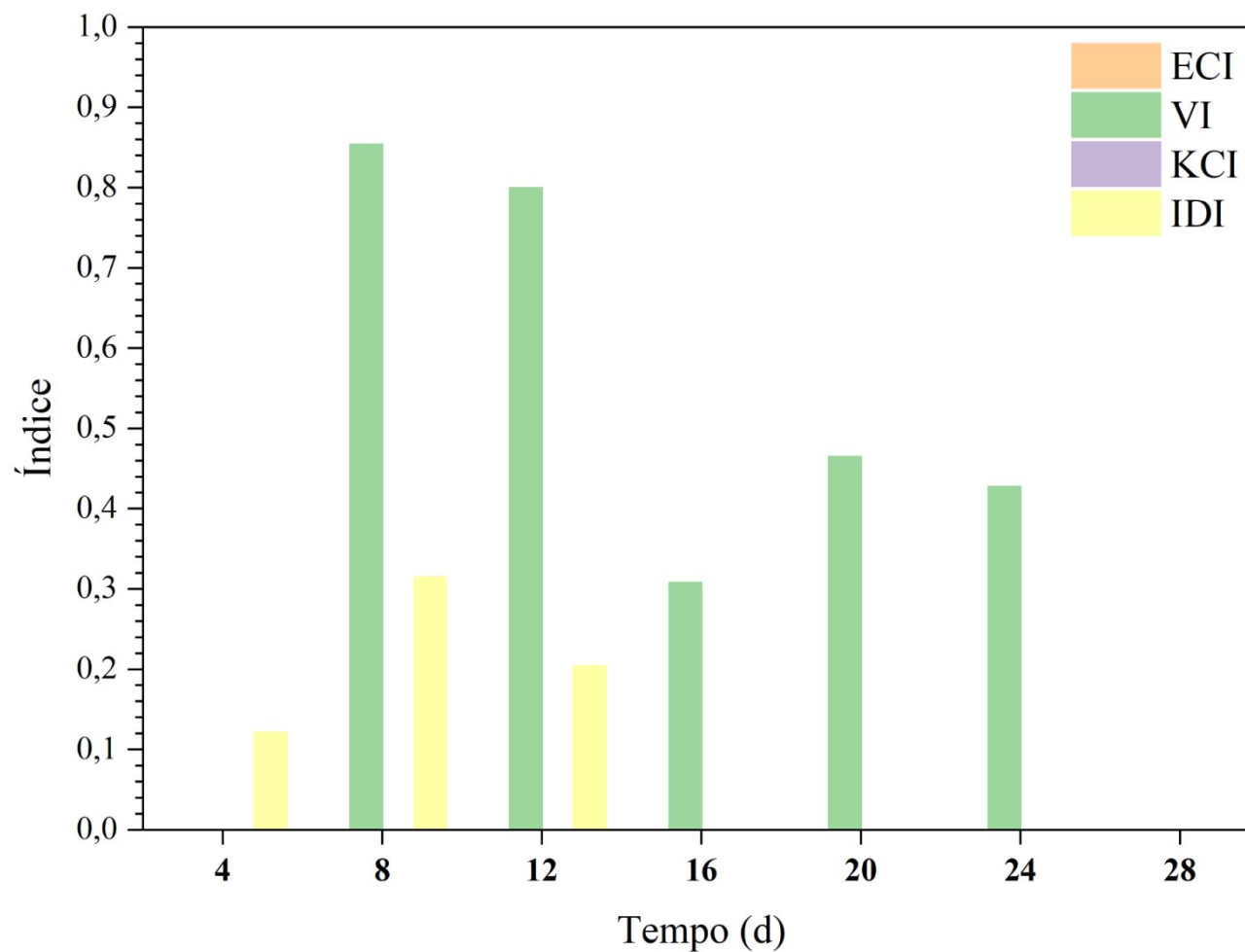
**b**

## APÊNDICE B - ÍNDICES OXIDATIVOS OBTIDOS SEM APLICAÇÃO DO MÉTODO SAUB PARA SELEÇÃO EM MEIO SÓLIDO



**Legenda:** KCI (índice de carbonilas de cetona); ECI (índice de carbonilas de ésteres); VI (índice de ligações vinílicas) e IDI (índice de duplas ligações internas).

## APÊNDICE C - ÍNDICES OXIDATIVOS OBTIDOS SEM APLICAÇÃO DO MÉTODO SAUB PARA MPS DE PEBD



**Legenda:** KCI (índice de carbonilas de cetona); ECI (índice de carbonilas de ésteres); VI (índice de ligações vinílicas) e IDI (índice de duplas ligações internas).

## APÊNDICE D - CURVA DE BIOMASSA DO FUNGO FILAMENTOSO RMP5 NO CULTIVO COM FILMES DE PEBD

