



UNIVERSIDADE  
E D U A R D O  
MONDLANE

Escola Superior de Ciências Marinhas e Costeiras

Monografia para obtenção do grau de Licenciatura em Biologia Marinha

**Avaliação da capacidade de *Aspergillus flavus* na biodegradação de plásticos do tipo Polietileno Tereftalato**

Autor:

Anderson Bernardo Machai

Quelimane, 2025

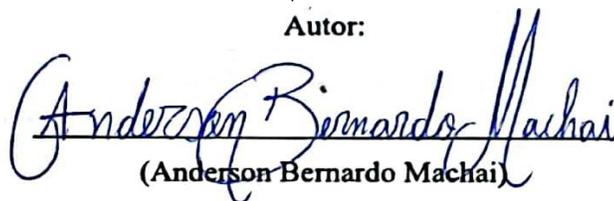


Escola Superior de Ciências Marinhas e Costeiras

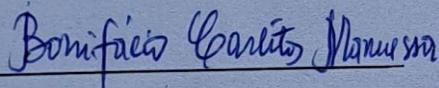
Monografia para obtenção do grau de licenciatura em Biologia Marinha

**Avaliação da capacidade de *Aspergillus flavus* na biodegradação de plásticos do tipo Polietileno Tereftalato**

Autor:

  
(Anderson Bernardo Machai)

Presidente do Júri



(MSc Bonifacio Manuessa)

Supervisora:



(MSc. Paula Milice)

Avalidora



(dra. Vanadia Massingue)

Co-supervisor:



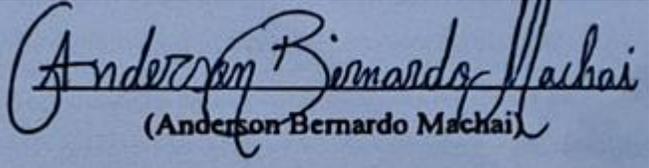
(dr. Edson Tembe)

Quelimane, 2025

## **Declaração de honra**

Declaro que esta monografia nunca foi apresentada para obtenção de qualquer grau e que ela constitui o resultado do meu labor individual. Esta monografia é apresentada em cumprimento parcial dos requisitos de obtenção do grau de licenciatura em Biologia Marinha, da Universidade Eduardo Mondlane.

Assinatura



(Anderson Bernardo Machai)

## **Dedicatória**

Dedico este trabalho aos meus pais e toda minha família em geral por ter me apoiado incansavelmente para a concretização de mais um sonho.

“Muito Obrigado”

## **Agradecimentos**

Agradeço a Deus, por ter-me concedido o dom da perseverança para atingir os meus objetivos; saúde, para realizar os trabalhos em campo; e por ter colocado em meu caminho pessoas especiais, que sem as quais seria mais difícil a conclusão desse trabalho.

Aos meus Supervisores Paula Milice e Edson Tembe, por terem acreditado em mim e sempre me acompanhado, aos mesmos agradeço pelos ensinamentos paciência e apoio durante a elaboração deste trabalho e ainda a toda equipe do INIP- Zambézia.

Ao corpo docente da ESCMC, pelas valiosas contribuições para o meu desenvolvimento académico.

Aos colegas e amigos, em particular a turma de Biologia Marinha 2020 e a família Pro-Article, cujas interações e conselhos foram fontes de inspiração, agradeço pela camaradagem ao longo desses anos. E a todos que, de alguma forma, contribuíram directa ou indirectamente para esta jornada.

“Meu Muito Obrigado”

## **Epigrafia**

“Se você escrever claro e especificamente um problema, você resolveu metade dele.”

(Kindle)

“Problemas infinitamente grandes serão resolvidos por seres infinitamente pequenos.”

(Luis Pasteur)

“Se você priorizar o conhecimento e o aprendizado, o dinheiro continuara vindo.”

“Quanto mais você teme que algo aconteça, mais provável é que ocorra.”

**(psicologia social)**

“Seja sempre melhor que há um segundo atrás!”

## Resumo

O presente trabalho teve como objectivo avaliar a capacidade do fungo *Aspergillus flavus* na biodegradação de plásticos do tipo Polietileno Tereftalato-. O microrganismo usado neste trabalho foi obtido em amostras de solo do mangal em duas áreas no estuário dos bons sinais. O estudo para obtenção de fungos potenciais na degradação de plásticos foi iniciado em laboratório do INIP. As amostras de solo foram medidas em uma balança analítica e pré-enriquecidas com o meio de cultura AP e pipetadas em placas após a homogeneização por 30 segundos e feito o cultivo de fungos em meio SDA durante 7 dias. Foi identificado o *A. flavus* que este apresentou um crescimento rápido após 7 dias da inoculação do isolado, este apresentou uma topografia rugosa, textura pulverulenta e uma coloração do micélio reprodutivo verde amarelado e branca nas bordas. Para o isolamento e monitoramento da colonização de *Aspergillus flavus* no Polietileno Tereftalato em condições controladas, em que o polietileno tereftalato (PET) foi o material testado e o *A. flavus* em que foram cultivados em meio AP e óleo de coco contendo 0.60g de PET em garrafas de vidro esterilizados a temperatura de 30°C durante 46 dias que, os resultados foram significativos, pois sugeriram a capacidade do *A. flavus* se adaptar, aderir e degradar o PET, com uma variação metabolita indicando um ambiente favorável para o crescimento e metabolismo do fungo. Na quantificação do grau de biodegradação de Polietileno Tereftalato por *Aspergillus flavus* foi mostrado após o período de incubação: em três médias de  $\Delta M\%$  pesados em balança analítica, em que o *A. flavus* reduziu o peso do PET em 15.06%, 23.77 % e 19.80% respectivamente após 46 dias, em uma média de três medições cada  $\Delta M\%$ . Em conclusão, o *A. flavus* demonstra sua importância nos processos de biodegradação, ou seja, este fungo tem a capacidade de degradar o PET.

**Palavras chave:** Fungo; *Aspergillus flavus*; biodegradação de plástico; PET;

## Lista de Abreviaturas.

<b>Siglas</b>	<b>Significado</b>
INIP	Instituto Nacional de Inspeção do Pescado
NaCl	Cloreto de Sódio
SDA/SDA	Sabouraud Dextrose Agar
AP	Água Peptonada
gv1A	Garrafa de vidro volumétrica 1 <sup>a</sup>
gv1B	Garrafa de vidro volumétrica 1B
gv1C	Garrafa de vidro volumétrica 1C
$\Delta M\%$	Variação da massa em percentagem
Mo e Mf	Massa inicial e final
PET	Polietileno Tereftalato
PE	Polietileno
PP	Polipropileno
UP	Resinas insaturadas de poliéster
PU	Poliuretano
PTFE	Politetrafluoro etileno
PF	Fenol formaldeído
PVC	Policloreto de vinilz
PC	Policarbonato
°	Graus
°C	Graus Celcius
ml	Mililitro
L	litro;
G	Gramas
g/L	Gramas por litro
$\mu\text{L}$	Microlitro
$\mu\text{m}$	Micrómetro
Mm	Milímetro
"	Segundo
'	Minuto

%	Porcentagem
Km	Quilómetro
pH	Potencial de hidrogenação

## Lista de Tabelas

Tabela 1: Lista de materiais. ....	14
Tabela 2: Lista de reagentes. ....	15
Tabela 3: Características macroscópicas das colônias pretendidas. ....	35
Tabela 4: Quantidade dos componentes do meio condicionado para a degradação do PET a 30°C. ....	36

## Lista de Figuras

Figura 1: Poluição costeira e marinha por plásticos. ....	6
Figura 2: fluxograma de impactos dos plásticos nas comunidades costeiras. ....	7
Figura 3: Principais representantes do genero <i>Aspergillus</i> . ....	9
Figura 4: Estrutura morfológica do <i>Aspergillus flavus</i> . ....	10
Figura 5: Forma estrutural em placas de <i>Aspergillus flavus</i> no meio SDA. ....	11
Figura 6: Localização geográfica da área de estudo. ....	13
Figura 7: Características de crescimento do fungo <i>Aspergillus flavus</i> cultivado em meio SDA, colônias isoladas do anexo I apresentando coloração do micélio verde e a textura pulverulenta devido a densa produção de conídios. ....	19
Figura 8: Processo de isolamento do PET com os fungos na garrafa de vidro. ....	20
Figura 9: Ilustração do ambiente criado em garrafas de vidro. ....	22
Figura 10: Monitoramento temporal da massa da garrafa de vidro com o isolado dado me massa em função do tempo. ....	23
Figura 11: Média de três medições para a figura 13A, 13B e 13C resultado da degradação do PET apos 46 dias. ....	24
Figura 12: Primeira inoculação para isolamento do <i>A. flavus</i> . ....	35
Figura 13: A pós retirada do PET das garrafas de vidro. ....	36
Figura 14: PET's a pós lavagem e secagem para a pesagem. ....	36
Figura 15 : Alguns materiais usados. ....	37
Figura 16: Materiais e reagentes usados na identificação e inoculação. ....	38
Figura 17: Ilustração microscópica de estruturas do <i>Aspergillus flavus</i> . ....	38
Figura 18: Isolados específicos de <i>A. flavus</i> . ....	39
Figura 19: Ilustração das garrafas apos 7 dias de incubação na primeira pesagem de controle. ....	39
Figura 20: $\Delta M$ da garrafa durante os 46 dias em medições semanais. ....	40
Figura 21: Poluição do Estuário dos bons sinais por resíduos plásticos e outros. ....	41

## Índice

CAPÍTULO I: INTRODUÇÃO E OBJECTIVOS.....	1
1. Introdução .....	1
1.1. Problematização.....	2
1.2. Justificativa.....	3
1.3. Objectivos.....	3
1.3.1. Geral .....	3
1.3.2. Específicos .....	3
CAPÍTULO II: REVISÃO .....	4
2. Revisão de Literatura .....	4
2.1. Plástico.....	4
2.1.1. Tipos de plástico.....	4
2.1.2. Fontes de resíduos de plástico.....	5
2.1.3. Poluição plástica.....	5
2.1.4. Impacto do descarte inadequado de plásticos na biodiversidade marinha .....	6
2.1.5. Importância do estudo de biodegradação de plásticos .....	7
2.2. Fungos .....	8
2.2.1. <i>Aspergillus spp</i> .....	8
2.2.2. <i>Aspergillus spp</i> vs. Saúde pública.....	9
2.2.3. Classificação Taxionómica do fungo <i>Aspergillus flavus</i> .....	10
2.3. Biorremediação.....	11
2.4. Biodegradação .....	12
2.5. Produção de enzimas por fungos .....	12
CAPÍTULO III: PROCEDIMENTOS METODOLOGICOS.....	13
3. Metodologia.....	13

3.1.	Área de estudo .....	13
3.2.	Material e Reagentes .....	14
3.3.	Amostragem.....	15
3.4.	Preparação dos meios de cultura. ....	16
3.4.1.	Preparação de Água Peptonada .....	16
3.4.2.	Preparação de Sabouraud Dextrose Agar.....	17
3.5.	Preparo das amostras de solo.....	17
3.5.1.	Inoculação .....	17
3.6.	Identificação da espécie.....	18
3.6.1.	Análise macroscópica e microscópica.....	18
3.6.2.	Inoculação de <i>Aspergillus flavus</i> apos a identificação. ....	18
3.7.	Isolamento e monitoramento da colonização de <i>Aspergillus flavus</i> no Polietileno Tereftalato em condições controladas .....	19
3.8.	Quantificação do grau de biodegradação de Polietileno Tereftalato por <i>Aspergillus flavus</i> ....	20
3.8.1.	Processamento dos Dados .....	21
CAPÍTULO IV: RESULTADOS E DISCUSSÃO .....		22
4.	Resultados .....	22
4.1.	Isolamento e monitorização da colonização de <i>Aspergillus flavus</i> no Polietileno Tereftalato em condições controladas .....	22
4.2.	Quantificação do grau de biodegradação de Polietileno Tereftalato por <i>Aspergillus flavus</i>	24
5.	Discussão dos resultados .....	25
5.1.	Isolamento e monitoramento da colonização de <i>Aspergillus flavus</i> no Polietileno Tereftalato em condições controladas .....	25
5.2.	Quantificação do grau de biodegradação de Polietileno Tereftalato por <i>Aspergillus flavus</i>	26
CAPÍTULO V: CONCLUSÃO E RECOMENDAÇÕES.....		28
6.	Conclusão.....	28
7.	Recomendações.....	28

CAPÍTULO VI: BIBLIOGRAFIA E ANEXOS.....	29
8. Referências Bibliográficas.....	29
9. Anexos.....	35

## CAPÍTULO I: INTRODUÇÃO E OBJECTIVOS

### 1. Introdução

O plástico, material abundante e versátil, é crucial no cotidiano, devido à sua durabilidade e estabilidade (Macedo, 2020). Os plásticos, inventados em meados de 1933 e popularizados após a Segunda Guerra Mundial beneficiando diversos sectores da economia como a medicina, transporte, tecnologia, agricultura, construção civil e exporte. Carvalho (2022) afirma que o mundo produziu 0.35 milhões de toneladas métricas em 1950 com um crescimento exponencial durante os anos subsequentes até o registro do ano 2020 com cerca de 367 milhões de toneladas métricas de plástico respectivamente. A produção de plástico actualmente pode ser biológica, usando compostos naturais como lignina e celulose, ou sintética, derivada do petróleo e geralmente não biodegradável, como o PE e PET, um termoplástico composto por carbono, hidrogénio e oxigénio (Ibrahim *et al.*, 2011). O acúmulo de plásticos causa sérios problemas ecológicos. e gera impactos ambientais adicionais, como o aquecimento global, perante tais problemas surge a necessidade de entender e mitigar os danos através da pesquisa de soluções, como o uso de fungos na biodegradação de plásticos (Piatti, 2005).

Para a biodegradação de plásticos, os fungos *Aspergillus*, *Fusarium* e *Penicillium* têm se destacado devido à sua capacidade de produção de enzimas como lignina peroxidase, manganês peroxidase e laccase, além da sua variabilidade metabólica, que lhes permite adaptar-se a condições ambientais e usar o plástico como fonte de nutrientes (Zipperer *et al.*, 2020). Entre os membros do género *Aspergillus* destacam-se *A. fumigatus*, *A. terreus*, *A. niger* e *A. flavus* com grande potencial para a biodegradação de plásticos. Em particular, o *A. flavus* produz enzimas como polyesterase, laccase, peroxidase, cutinase, amilase e lipase, que têm potencial para degradar plásticos como PET, PP e PE (Carvalho, 2023).

A ausência do uso sistemático da biorremediação e biodegradação com fungos, como o *Aspergillus flavus*, é motivo de preocupação no contexto da crise ambiental relacionada ao plástico. Estes fungos são fundamentais na decomposição de matéria orgânica e na biodegradação de plásticos através de processos enzimáticos. A utilização de *A. flavus* na biodegradação poderá representar uma solução inovadora e ecológica para mitigar a acumulação de plásticos nos ecossistemas, contribuindo significativamente para a preservação ambiental. Este estudo avalia a capacidade do fungo *Aspergillus flavus* na biodegradação de plásticos do tipo Polietileno Tereftalato (PET). O presente estudo contribui para o desenvolvimento de soluções sustentáveis na redução de impacto ambiental causado pelos plásticos, avanço no conhecimento científico e conservação de biodiversidade.

## 1.1. Problematização

O uso de plásticos, em especial o Polietileno Tereftalato (PET), têm gerado sérios problemas ambientais devido à sua durabilidade e resistência à degradação natural, que leva mais de 450 anos (Thompson *et al.*, 2009). Em Quelimane, a acumulação de resíduos plásticos, particularmente no Estuário dos Bons Sinais, tem levantado preocupações significativas sobre a poluição ambiental e seus efeitos adversos na fauna e flora locais (anexo X). O descarte inadequado de plásticos, especialmente no estuário e nas florestas que funcionam como berçários, tem ocasionado morte de espécies e comprometendo a integridade dos ecossistemas, ameaçando a biodiversidade e a saúde ambiental da região, afetando desta forma o desenvolvimento económico da população local, pois a maior parte vivem a base dos recursos pesqueiros e da flora.

Apesar dos esforços para promover a reciclagem e o descarte adequado de plásticos, a questão da degradação microbiana ainda é pouco explorada na região, especialmente em relação a fungos capazes de degradar esses materiais (Zanella, 2013). Diante da urgência em encontrar soluções eficazes para a crise ambiental do plástico, é essencial investigar o potencial dos fungos, especialmente o *Aspergillus flavus*, na biodegradação de materiais como o Polietileno Tereftalato.

Esses organismos têm a capacidade de decompor materiais orgânicos complexos, incluindo certos plásticos, por meio de processos enzimáticos especializados. No entanto, sua aplicação na biodegradação de resíduos plásticos do tipo PET, em condições controladas, ainda carece de uma atenção (Ivo, 2023).

Diante do exposto, surge a seguinte pergunta de estudo:

**Qual é a capacidade do *Aspergillus flavus* na biodegradação do Polietileno Tereftalato em condições controladas?**

## **1.2. Justificativa**

Estudos focados na capacidade do *Aspergillus flavus* para degradar PET podem revelar percepções valiosas sobre sua eficácia e os mecanismos envolvidos nesse processo. Ao explorar essa capacidade, podemos acelerar a decomposição do PET e de outros polímeros, reduzindo sua persistência no ambiente e minimizando os danos ambientais e riscos à vida marinha. É fundamental que essa abordagem promissora na luta contra a poluição plástica seja devidamente reconhecida e aplicada, aproveitando o potencial dos fungos como aliados na mitigação dos impactos ambientais.

Esses conhecimentos são fundamentais para ações concretas que visem à proteção da vida animal e dos ecossistemas, além de contribuir para a promoção da sustentabilidade ambiental. Ao reconhecer e explorar o papel dos fungos na biodegradação, não apenas amplia a compreensão científica sobre esses organismos, mas também contribui para a pavimentação de caminho para soluções eficazes contra a poluição plástica, assegurando um futuro mais saudável para as próximas gerações e incentivando a colaboração entre a comunidade científica e local.

## **1.3. Objectivos**

### **1.3.1. Geral**

- Avaliar a capacidade do fungo *Aspergillus flavus* na biodegradação de plásticos do tipo Polietileno Tereftalato

### **1.3.2. Específicos**

- Isolar e monitorar a colonização de *Aspergillus flavus* no Polietileno Tereftalato em condições controladas;
- Quantificar o grau de biodegradação de Polietileno Tereftalato por *Aspergillus flavus*.

## CAPÍTULO II: REVISÃO

### 2. Revisão de Literatura

#### 2.1. Plástico

O plástico ganhou grande espaço na sociedade ao longo dos anos, sendo a matéria prima mais utilizada na confecção de produtos. A palavra “plástico” vem do grego “plastikos” que significa “tudo aquilo que pode ser moldado”, ou seja, este é um material capaz de ser modificado e utilizado em variadas aplicações do nosso dia-a-dia. Devido a esta capacidade, este material tornou-se um dos mais importantes para a indústria, sendo considerado insubstituível no dia-a-dia, possuindo inúmeros benefícios que vão desde a sua utilização em materiais da área da saúde quanto da área da indústria de alimentos. Aliado à produção em massa destes materiais, seu descarte inadequado pode provocar consequências desastrosas para a saúde dos animais e da população (Martins, 2020).

O primeiro polímero sintético foi inventado em 1869 como uma alternativa à utilização de marfim no bilhar, desporto então com crescente popularidade. Esta invenção revolucionária feita com a combinação de cânfora com celulose, substituiu matérias naturais como o linho, chifre, marfim e casco de tartaruga. Pela primeira vez na história, a produção de um material não é limitada pela natureza, sendo a celulose mesmo aclamada por salvar o Elefante (Thompson, *et al.*, 2009; UNEP, 2018).

##### 2.1.1. Tipos de plástico

A produção de plástico começa com um processo de destilação. Este processo envolve a fragmentação do crude em grupos mais pequenos, constituídos por uma mistura de hidrocarbonetos. Os dois principais processos utilizados para a produção de plásticos são a polimerização e a policondensação. Num reactor de polimerização, monómeros como o etileno e o propileno são unidos de modo a formar longas cadeias poliméricas (Thompson, *et al.*, 2009). Em relação às suas propriedades físicas os plásticos podem ser classificados como:

- Termoendurecíveis – ganham a forma de produtos rígidos por acção do calor e de reacções químicas e não são susceptíveis de serem moldados novamente por acção do calor (Dias, 2013,). Exemplos: Poliuretano (PU), Resinas insaturadas de poliéster (UP), Politetrafluoro etileno (PTFE), Fenol formaldeído (PF).
- Termoplásticos - amolecem quando aquecidos e endurecem de novo quando arrefecem, o que permite moldá-los sucessivas vezes. Mais de 90% dos plásticos vulgarmente utilizados são

deste tipo. Exemplos: Policarbonato (PC), Polietileno (PE), Tereftalato de polietileno (PET), Policloreto de vinilz (PVC) (Piatti, 2005).

O polietileno tereftalato (PET) é produzido a partir de etileno glicol e ácido tereftálico. É um polímero incolor, rígido e cristalino, frequentemente utilizado para fabricação de garrafas e embalagens para alimentos.

### **2.1.2. Fontes de resíduos de plástico**

Uma ampla gama de detritos plásticos pode ser identificada como meso e microplásticos. Os resíduos plásticos são um dos maiores problemas ambientais gerados por diversas fontes, destacando se dentre eles os plásticos descartáveis como sacolas, redes de pesca abandonadas, garrafas e canudos, muitas das vezes descartados de forma inadequada. No ambiente marinho esse resíduo plástico vem a partir de uma diversidade de fontes, que são divididas em fontes terrestres e fontes marinhas. 80% do total de detritos de plástico têm origem em terra, enquanto o resto (20%) são de fonte marinhas (Zanella, 2013; Saad, *et al.*, 2015).

### **2.1.3. Poluição plástica**

A ameaça dos plásticos para o ambiente é conhecida há anos, mas foi ignorada durante muito tempo, e a sua gravidade só foi reconhecida recentemente. Uma vez que são flutuantes e leves, há uma quantidade crescente de detritos plásticos sendo dispersos por longas distâncias nos oceanos e, quando finalmente se estabelecem em sedimentos, podem demorar séculos para desaparecer segundo Gomes, 2023.

Quanto à localização e distribuição do lixo plástico nos oceanos, é de se esperar que as águas costeiras de muitas regiões possuam maiores concentrações de plásticos marinhos por ser o corpo receptor de plásticos terrestres e a zona onde se concentram a pesca, a aquicultura, a navegação comercial e outras actividades marítimas situações ilustradas pela figura 1 (Briosch, 2023; UNEP, 2016).



**Figura 1:** A representação da Poluição costeira e B da poluição marinha por plásticos.

**Fonte:** Antunes, 2023.

#### **2.1.4. Impacto do descarte inadequado de plásticos na biodiversidade marinha**

O plástico está associado a muitos benefícios sociais e promoveu uma série de avanços tecnológicos, entre outros, o isolamento térmico através de materiais de plástico permitiu uma redução do consumo de energia; a utilização de plástico permitiu à indústria automóvel a redução do peso e do custo destes; e na indústria alimentar, películas de plástico proporcionaram a melhor conservação de alimentos. No entanto, o aumento da utilização deste material e da degradação dos ecossistemas por uma inadequada gestão destes resíduos pode ter de igual forma impactos directos e indirectos negativos. Os potenciais impactos resultam posteriormente em muitos tipos de impactos sociais, económicos e ecológicos negativos, incluindo na indústria da água, turismo e pesca (Seyffert, 2020).

O principal problema do plástico é simultaneamente a vantagem da sua utilização e sua durabilidade. A sua produção é maioritariamente a base de combustíveis fósseis enriquecidos com químicos e aditivos durante o seu processamento. No caso de plásticos encontrados em corpos de água, a ação das correntes, da luz solar e do vento agrava a situação degradando mega e macro plásticos em detritos cada vez mais pequenos como micro plásticos e/ou nano plásticos, tornando virtualmente impossível a sua total remoção do ambiente. É importante frisar que todo plástico produzido até a data actual encontra-se presente no planeta, com provavelmente tamanhos e formatos diferentes resultado do reaproveitamento e deterioração (Geyer, 2017).

O plástico bem como o lixo em geral liberam substâncias tóxicas, que afectam a qualidade da água e prejudicando a vida marinha, essa poluição pode levar à morte de espécies sensíveis e ao deslocamento de outras, alterando o equilíbrio ecológico e ainda o Estuário como um berçário, os resíduos acumulados podem obstruir áreas importantes para a reprodução de peixes e outros organismos aquáticos. Os animais marinhos, como peixes e aves, podem ingerir plástico, o que pode ser fatal ou resultar em problemas de saúde. Essa contaminação afecta a cadeia alimentar, impactando não apenas a vida marinha, mas também as comunidades humanas que dependem desses recursos para sua subsistência (UNEP, 2021).



**Figura 2:** fluxograma de impactos dos plásticos nas comunidades costeiras.

**Fonte:** Martins, 2020.

### 2.1.5. Importância do estudo de biodegradação de plásticos

Os fungos são os organismos mais importantes na biodegradação de hidrocarbonetos presentes no ambiente. Desempenham um importante papel na manutenção ambiental, na natureza estão envolvidos no processo de biorremediação de vários poluentes como metais, pesticidas e organoclorados, hidrocarbonetos dentre outros. Estes organismos filamentosos ramificam-se rapidamente no substrato, digerindo-o através da secreção de enzimas extracelulares. Essas enzimas são indispensáveis na degradação dos componentes dos substratos. Estes microrganismos, em comparação com as bactérias e

leveduras, aparentemente, toleram maiores concentrações de produtos tóxicos, são capazes de crescer sob condições ambientais de estresse, como em meios com baixos valores de pH, com baixa actividade da água (Dores, 2021; Lucena, 2022).

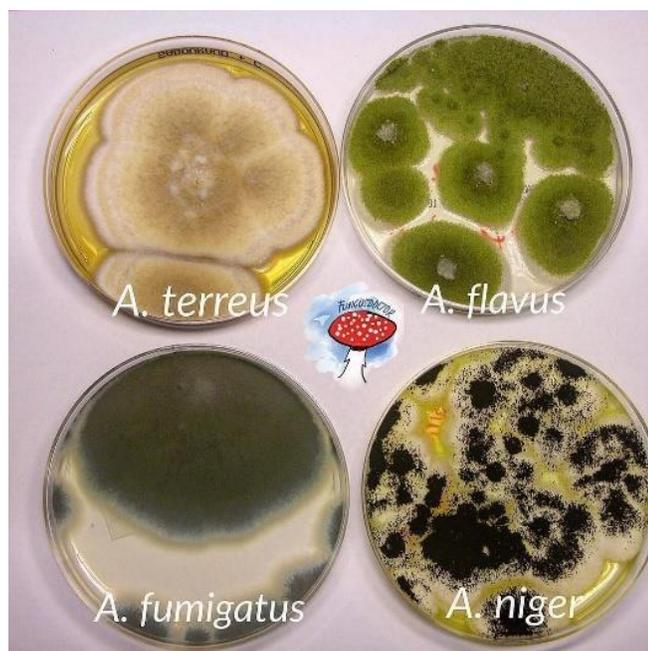
## **2.2. Fungos**

Os fungos são classificados como organismos eucariontes e heterotróficos, possuem uma grande variedade de formas, comportamentos e ciclos de vida. Estes organismos estão distribuídos na natureza em diferentes ambientes como, por exemplo, no solo, na água, no Ártico e como parasitas de plantas, insectos e animais. O número de espécies de fungos ultrapassa a 1,5 milhão em todo mundo, sendo que aproximadamente 100 mil destas espécies encontra-se descritas. Os fungos possuem características heterotróficas, não possuem clorofila, necessitando de material orgânico para sobreviverem, sendo sua nutrição feita por absorção de nutrientes, através da presença de enzimas. As enzimas produzidas auxiliam na degradação de todas as principais macromoléculas biológicas como as proteínas, carboidratos, lipídios e ácidos nucleicos, da mesma forma que de moléculas menores como aminoácidos e vitaminas (Lemos, 2001; Šimonoviřová, 2004).

Essas enzimas são importantes no metabolismo dos fungos em processos como ciclagem de nutrientes, decomposição, produção de metabolitos secundários. Em geral metabolismo é o conjunto de reacções químicas que acontece em cada célula de um organismo. O objectivo dessas reacções é aproveitar os nutrientes para satisfazer as exigências fundamentais da célula, bem como a biossíntese de substâncias essenciais a sua sobrevivência. Os compostos químicos formados, transformados ou degradados são chamados de metabólitos (Morreira, 2017).

### **2.2.1. *Aspergillus spp***

O género *Aspergillus* foi descrito pela primeira vez em 1729 e já foram estudados mais de 260 espécies que fazem parte dele, sendo os representantes desse género os *Aspergillus niger*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus terreus* e o *Aspergillus flavus* ilustrados na figura 3. Os fungos deste género são reconhecíveis pelos seus perfis de metabólitos secundários, coloração dos conídios e por sua taxa de crescimento em diferentes temperaturas e meios. Espécies de *Aspergillus* desempenham papéis ecológicos importantes, degradando amidos, hemiceluloses, celulosas e outros polissacarídeos, o género *Aspergillus* apresenta um amplo espectro de produção de enzimas de interesse biotecnológico (Costa, 2022).



**Figura 3:** Principais representantes do genero *Aspergillus*.

**Fonte:** Soares. 2013.

Contudo, apesar da grande utilização económica o género *Aspergillus* pode causar doenças respiratórias em seres humanos, pois produzem várias micotoxinas como aflatoxinas e ocratoxina A.

### **2.2.2. *Aspergillus spp* vs. Saúde pública**

A aspergilose é uma infecção fúngica oportunista das mais comuns em todo o mundo, provocada por algumas das espécies do género *Aspergillus*. A maioria das infecções em humanos é causada por *A. flavus*, *A. niger*, *A. nidulans*, *A. terreus* e como principal responsável temos o *A. fumigatus*. Estes fungos então distribuídos na natureza, encontram-se no solo, no material orgânico em decomposição e podem originar vários quadros clínicos (Iwen, *et. al.*, 1997). As inalações de esporos de fungos podem causar doenças pulmonares que vão desde a inflamação local das vias aéreas para infecções graves e com risco de vida do pulmão, tais como aspergilose broncopulmonar alérgica, aspergilose invasiva. A doença tem sido relatada por ocorrer principalmente como uma complicação em doentes com asma e fibrose cística (Ritter. 2007).

Embora *A. flavus* tenha a capacidade de infectar os seres humanos, a sua maior ameaça para a saúde humana é através da produção de aflatoxinas que contaminam as culturas alimentares, incluindo o milho, amendoim e nozes. O consumo de alimentos contaminados com essas micotoxinas potentes

pode levar à aflatoxicose aguda que resulta em morte ou à aflatoxicose crônica que resulta em situações patológicas mais prolongadas, incluindo cancro e imunossupressão. O fígado é o principal órgão alvo, e os danos hepáticos têm sido documentados em roedores, aves domésticas, após a ingestão da aflatoxina (Gonçalves, 2013).

### 2.2.3. Classificação Taxionômica do fungo *Aspergillus flavus*

*Aspergillus flavus* foi descrito pela primeira vez por Link em 1809 e caracteriza-se por ter o conidióforo com haste longa, grossa, vesícula globosa coberta com uma camada de fiálide seguida de conídios em cadeia que formam cabeças conidiais radiadas, com 300 µm a 400 µm de diâmetro e as fiálide são unisseriadas ou bisseriadas conforme ilustra a figura 2. Os conídios são globosos e equinulados, a figura 3 mostra a forma estrutural em placas de *Aspergillus flavus* no meio SDA (Oliveira et al., 2019).

Classificação

Reino: Fungi

Filo: Ascomycota

Subfilo: Pezizomycotina

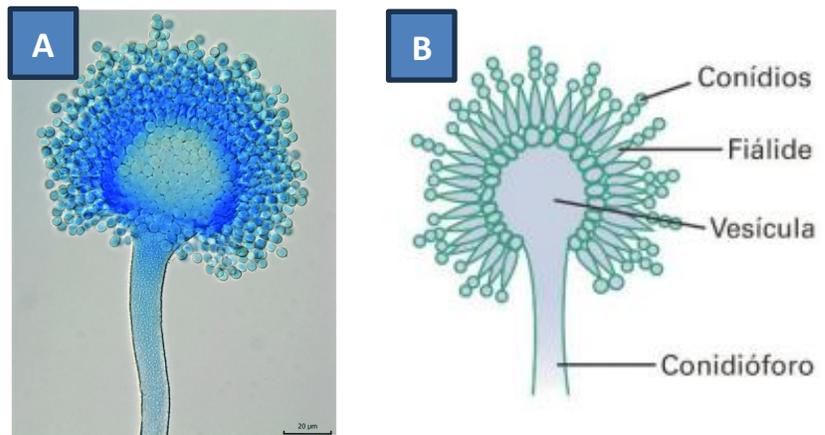
Classe: Eurotiomycetes

Ordem: Eurotiales

Família: Trichocomaceae

Gênero: *Aspergillus*

Espécie: *Aspergillus flavus*



**Figura 4:** A Estrutura e B morfologia do *Aspergillus flavus*.

**Fonte:** Silva, 2015.



**Figura 5:** Forma estrutural em placas de *Aspergillus flavus* no meio SDA.

**Fonte:** Oliveira *et al.*, 2019.

### **2.3. Biorremediação**

Existem vários tipos de tratamentos para ambientes contaminados, escolhidos com base no tipo de contaminação, nas características do local nos objetivos do tratamento, como tratamentos biológicos (biorremediação que utiliza microrganismos para degradar ou transformar contaminantes), físicos (incineração, lavagem com água para remover ou conter os poluentes), químicos (solidificação/estabilização, oxidação química), e físico-químicos combinados ampliam a eficiência na remediação do local.

A biorremediação é uma tecnologia baseada na utilização de microrganismos ou processos biológicos para transformar os poluentes em substâncias com pouca ou nenhuma toxicidade, quando comparada com processos químicos e físicos, é uma alternativa ecologicamente mais segura e eficiente para reduzir a poluição por contaminantes orgânicos. Nas últimas décadas esteve-se relatado que os fungos filamentosos possuem atributos que os distinguem das outras formas microbianas nos processos de degradação, como o crescimento micelial, o qual confere uma vantagem sobre as células unicelulares, bactérias e leveduras, especialmente no que concerne à colonização de substratos insolúveis (Zanin *et al.*, 2014; Pereira, 2014). A biorremediação pode utilizar três estratégias: utilizar o poluente como fonte de carbono; utilizar como estimulador de ataques enzimáticos, no caso de co metabolismo e; o bioacumulo onde o composto não é metabolizado, mas é incorporado ao organismo (Pereira, 2014).

## **2.4. Biodegradação**

É o processo natural de eliminação de materiais orgânicos e inorgânicos por meio de acção de microrganismos ou ainda pode ser dita como a quebra de compostos químicos, que quando é completa chama-se de mineralização, resultando como produtos CO<sub>2</sub> e água. Os fungos filamentosos ramificam-se rapidamente no substrato, digerindo-o através da secreção de enzimas extracelulares. Essas enzimas são indispensáveis na degradação dos componentes dos substratos, principalmente lignocelulose. A biodegradação desempenha um papel importante na manutenção do equilíbrio ambiental e na sustentabilidade (Ekanayaka, 2022).

## **2.5. Produção de enzimas por fungos**

Enzimas são biocatalizadores utilizados nas indústrias podendo ser empregado na biologia molecular e aplicações biomédicas, no desenvolvimento de metodologias analíticas, na fabricação de produtos tecnológicos e no tratamento de resíduos (Lira, 2022). Os microrganismos possuem um grande potencial de geração de produtos naturais e de transformações de substâncias, como nos processos de biodegradação. A pesquisa de enzimas extracelulares produzidas por fungos é muito importante, principalmente as do sistema ligninolítico, pois participam na recuperação ambiental, processo no qual os sistemas biológicos são utilizados para diminuir ou neutralizar poluentes como hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs), que representam risco à saúde por causa de seus efeitos biológicos prejudiciais (Leite, 2023).

## CAPÍTULO III: PROCEDIMENTOS METODOLOGICOS

### 3. Metodologia

#### 3.1. Área de estudo

O estudo decorreu no período de 11 de Março a 01 de Julho, no laboratório de microbiologia do Instituto Nacional de Inspeção do Pescado (INIP) em Quelimane. O presente estudo foi realizado no centro do país, na província da Zambézia, cidade de Quelimane, localiza-se a cerca de 20 Km do Oceano Indico, entre latitude  $17^{\circ}52'13''S$  e longitude  $36^{\circ}56'7.7''E$ . Apresenta uma taxa anual da precipitação com cerca de 860 a 2000 mm, uma temperatura média de  $28^{\circ}C$  e uma humidade de ar de cerca de 79% (figura 6). Apresenta um clima tropical húmido com estação seca no inverno (Júnior, 2019). Os pontos de amostragens do solo a  $E036^{\circ}51'38.9''$  a  $S17^{\circ}52'39.3''$  para a área A e  $E036^{\circ}51'14.0''$  a  $S17^{\circ}52'20.4''$  para a área B, para.

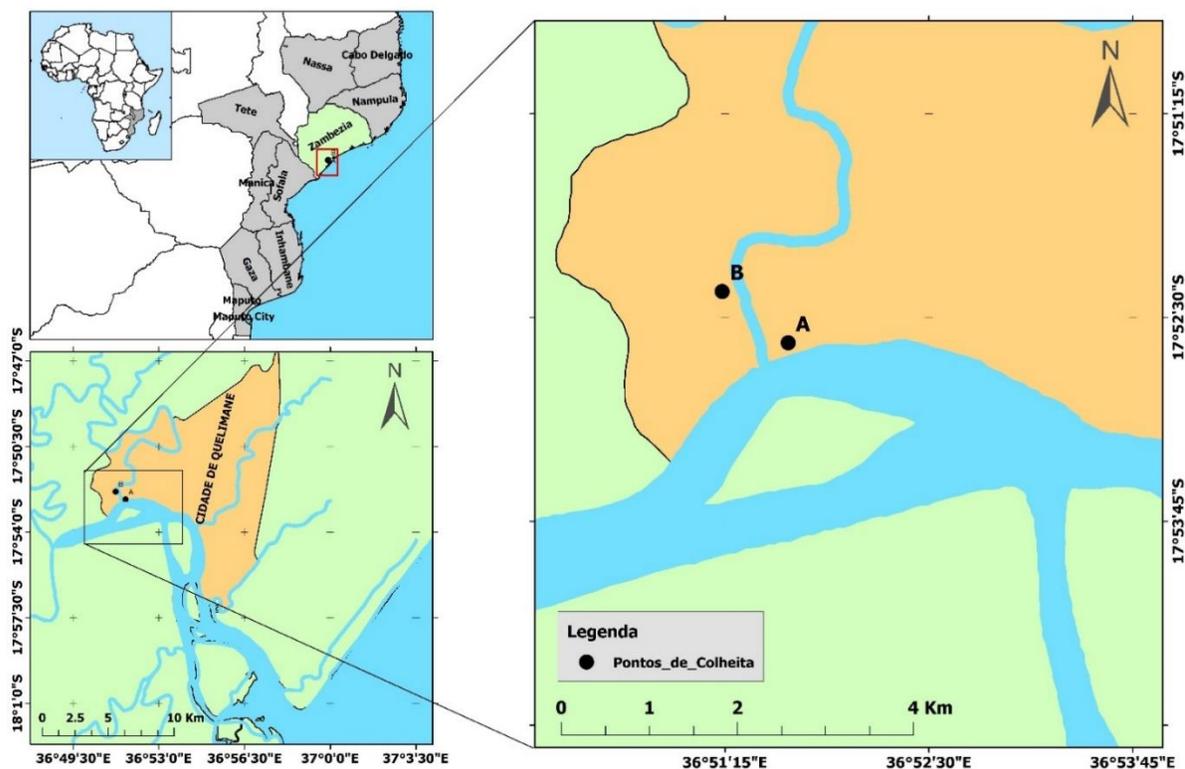


Figura 6: Localização geográfica da área de estudo.

### 3.2. Material e Reagentes

**Tabela 1:** Lista de materiais.

Material	Utilidade
Colher, faca, garfo e sacos plásticos estéreis	Usados na colecta de amostras
Luvas, mascara, bata e toca	Vestimenta laboratorial
Pinças estéreis	Para manipular objectos e substâncias
Bico de busen	assepsiar o local activo
Garrafas de vidro volumétricas de 250ml	Conservação de meios e usado na criação do ambiente de interacção
Incubadora de 37 +/- 30°C	Ambiente artificial para indução de crescimento de microrganismos
Autoclave a 121°C MLQ	Esterilização de meios de cultura talheres e destruição de culturas usadas com crescimento microbiano
Geleira a 5 +/- 3 °C e -18 °C	Conservar os meios e amostra
Erlenmeyer de 1000ml	Vidraça usada na preparação de meios
Agitador de tubos	Para uniformizar a distribuição dos esporos na suspensão
Tubo de ensaio	Usados na suspensão com o meio líquido
Microscópio electrónico	Lupas binocular Olympus SZ-ST
Placas de Petri	Cultivar microrganismos em meio de cultura solido
Alça de platina e alça de grigalsky	Para inocular e espalhar o inoculo
Barra magnética	Para agitar e homogeneizar os meios de cultura durante o preparo
Agitador Orbital Shaker	Fogão e orbital para aquecer e fazer circular a barra magnética
Proveta de 1000ml	Medir líquidos
Bolsa de estoma	Saco inocula
Becker	Para diluições
<b>Stomacher</b> <sup>®</sup> 400 circulator	Agitar para uniformizar o solo com o meio AP

	de pré-enriquecimento na bolsa de estoma
Balança analítica	Medir os componentes usados em gramas
pH metro	Medir o pH dos meios de cultura durante a preparação
Estufa +/- 70°C	Secagem de materiais
Pipetas de 100 µL e pipeta de Pasteur	Pipetar o inocula em placas e tubos

**Tabela 2:** Lista de reagentes.

Reagentes	Utilidade
Fuchsin Basic + Alcool a 99.9% (50%-50%)	usado na observação microscópica como corante.
Água destilada	produção de meios de cultura e lavagem de material
Etanol (70% e 99.9%)	usado para assepsia e produção de Fuchsin Basic
AP	Meio de cultura líquido a temperatura ambiente
SDA	Meio de cultura solido a temperatura ambiente
Óleo de coco	Aditivo para o estímulo de produção de certas enzimas por <i>A. Flavus</i>
NaCl	composto adicional para produção do meio de cultura AP
Óleo de imersão	corante para melhorar a nitidez no microscópio

### 3.3. Amostragem

Os microrganismos usados nesse estudo foram obtidos em amostras de solo, colectadas em ambientes naturais com solo húmido com decomposição activa, com restos orgânicos em decomposição (colectado em florestas de mangal Chuabo Dembe, onde se achou abundância de detritos orgânicos), no período da manha em Quelimane. A colecta foi realizada com auxilio do garfo para deixar o solo mais leve, faca para cortar raízes e galhos e uma colher para colectar porções de amostra, em uma

profundidade de 0 a 5 centímetros foram colectados cerca de 150 g (gramas) de solo em cada área e colocado em sacos plásticos esterilizados e transportados ao laboratório de Microbiologia no INIP da Zambézia- Cidade de Quelimane onde foram armazenados em uma Geleira a 5 +/-3 °C para reduzir a actividade dos microrganismos conservando os mesmos para a inoculação na manhã do dia seguinte. Na colecta do solo foi escolhida uma área de forma a limitar e proteger ecossistemas frágeis e garantir que a colecta não causasse danos significativos ao ambiente, preservação do ecossistema (ética e sustentabilidade).

### **3.4. Preparação dos meios de cultura.**

Na criação de ambientes de cultura dos fungos, foram levados em conta dois meios: o meio de cultura SDA (que serve para o cultivo e isolamento do fungo) e o meio AP que é um meio de pré-enriquecimento da amostra (serve para a suspensão salina e a criação do ambiente de interacção entre o fungo e PET). De esclarecer que os meios de cultivo devem ser ambientes otimizados em termos de nutrientes essenciais para o crescimento e actividade metabólica, ou seja, umidade, vitaminas, minerais, carbono, nitrogénio, ph, estabilidade e o oxigénio, devem ser favoráveis para o cultivo.

#### **3.4.1. Preparação de Água Peptonada**

AP= Água destilada + Peptona + NaCl

Água destilada = 1200ml

Peptona = 1g/L x 1200ml = 1.2g

Equação 1.

NaCl = 8.5g/L x 1200ml = 10.2g

1200ml de água destilada + 1.2g de Peptona + 10.2g de NaCl = 1200ml de AP.

Onde: NaCl – Cloreto de Sódio; AP – Água peptonada; g – gramas.

Segundo as instruções do fabricante adotadas para o preparo de AP, em que 1g de peptona esta para 1000ml mais 8.5g de cloreto de sódio, foi feita a medição da água destilada em 1200ml equivalente a 1.2g de peptona e 10.2g de cloreto de sódio, adicionados e misturados para homogeneizar e formar o meio AP, que de seguida foi na autoclave para a autoclavagem a vapor a uma temperatura de 121°C.

### 3.4.2. Preparação de Sabouraud Dextrose Agar.

Sabouraud Dextrose Agar (SDA) que foi o meio utilizado no cultivo das colônias, não é selectivo, é pobre em nutrientes, condição essa que é essencial para inibir o crescimento de bactérias, mas, permite o crescimento de fungos. O meio proporciona também um aumento da esporulação e uma morfologia colonial mais característica, facilitando o estudo. A seguir a fórmula de preparação.

SDA = Água destilada + SDA em pó.

Água destilada = 500ml

SDA = 65g x 500ml = 32.5g

Equação 2.

500ml de água destilada + 32.5g de SDA = 500ml de SDA

Onde: g – Gramas; ml – mililitros; g/L – gramas por litro; SDA – Sabouraud Dextrose Agar.

Para o preparo do SDA foram seguidas as instruções do fabricante adoptadas no laboratório do INIP, em que orientam o uso de 65g de SDA para 1000ml. Para o estudo foi feita a medição da água destilada em 500ml equivalente a 32.5g de SDA usando as proporções de equivalência adoptadas na instituição, adicionados e misturados os componentes medidos enquanto aquecidos para homogeneizar e formar o meio SDA, que de seguida foi na autoclave para a sua devida autoclavagem a vapor a uma temperatura de 121°C para esterilização do mesmo, após a autoclavagem arrefecido e conservados na geleira.

Em suma, dissolveu-se os componentes com agitação constante (na placa de agitação magnética) ajustou-se o Ph entre 6,5 a 7,5 usando pH metro, e foi colocado o meio SDA e o AP na autoclave a 121°C junto as bandejas e talheres para esterilização, depois resfriados e conservados devidamente.

### 3.5. Preparo das amostras de solo

Dos 150g de solo de cada ponto de colecta, foram separados e medidos +/-9,8 g de amostra para cada área replicada duas vezes, diluída a 88,2 g de AP/diluyente com mínimo de 86,4 g e máximo de 90,0 g de diluyente dentro das normas usadas na instituição no saco inoculo/bolsa de estoma medidos na balança analítica, colocados sob agitação por 30 segundos no Stomacher® 400 circulator.

#### 3.5.1. Inoculação

Usando o Método de Spread-plate (Antão, 2018) que consiste em derramar o meio de cultura em placas de Petri, e esperou-se o meio arrefecer e solidificar, e foi usada uma pipeta de 100 µL (microlitros), que

era a quantidade necessária do inóculo para cada uma das 3 placas de Petri, para cada área da amostragem totalizando 6 placas, foi usada a alça de grigalsky para espalhar o inóculo por cima do meio de cultura, de seguida incubou-se por 7 dias a uma temperatura de 30°C na incubadora.

### **3.6. Identificação da espécie**

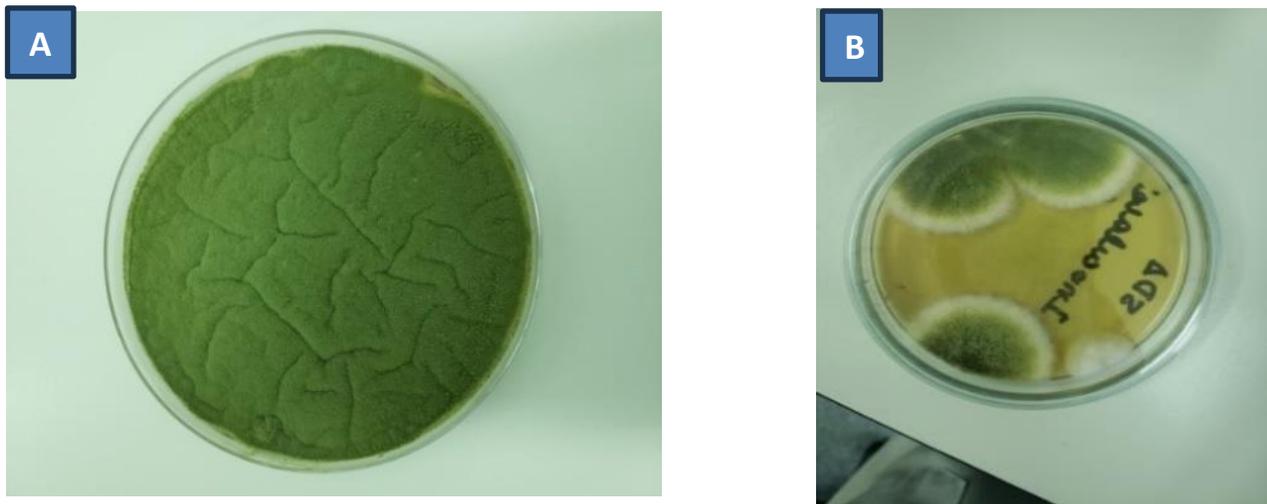
#### **3.6.1. Análise macroscópica e microscópica**

Apurou-se o género e a espécie das amostras incubadas nas placas de petri, por análises macroscópicas dos caracteres fenotípicas das colónias. Pode-se inferir dos resultados que as colónias pretendidas apresentaram as seguintes características macroscópicas: coloração das colónias, topografia, velocidade de crescimento, textura e borda das colónias, observações descritas e ilustradas no anexo I. Em análises microscópicas foram observadas as estruturas reprodutivas micélio ou esclerodios que germinam e produzem hifas e esporos conhecidos como conídios (conídios, fialide, vesícula, conidioforo) anexo VI.

#### **3.6.2. Inoculação de *Aspergillus flavus* após a identificação.**

Isolaram-se cepas específicas do fungo *Aspergillus flavus*, após a identificação dos fungos, a inoculação foi efectuada no meio de cultura estéril previamente preparado. Utilizou-se uma alça de inoculação estéril para retirar uma porção de micélio em crescimento activo e transferi-la para o meio de cultura AP (suspensão salina), que se encontrava em um tubo de ensaio. Nesse tubo de ensaio, transferiu-se uma porção de micélio colhido nas bordas da colónia e agitou-se no agitador de tubos para liberar os esporos.

Após a agitação, a suspensão foi inoculada em meios de cultura SDA utilizando micropipetas de 100 µL e espalhada com a alça de grigalsky. Os meios inoculados foram então incubados em condições adequadas para promover o melhor crescimento e desenvolvimento dos fungos antes da aplicação nos plásticos.



**Figura 7:** Características de crescimento do fungo *Aspergillus flavus* cultivado em meio SDA, colônias isoladas do anexo I apresentando coloração do micélio verde e a textura pulverulenta devido a densa produção de conídios.

Estes crescimentos evidenciam a importância que o meio SDA exerce sobre o isolado fúngico (*Aspergillus flavus*) em relação esporulação fúngica.

### **3.7. Isolamento e monitoramento da colonização de *Aspergillus flavus* no Polietileno Tereftalato em condições controladas**

#### **1) Preparação e esterilização dos substratos do plástico PET.**

Colectadas amostras de plástico, foram cuidadosamente esterilizados os substratos com Etanol a 70%, esse procedimento foi realizado para eliminar possíveis contaminantes externos antes da exposição aos fungos em garrafas de vidro com AP garantindo a integridade do experimento, a esterilização é uma etapa importante para evitar interferência de microrganismos indesejados que poderiam comprometer os resultados, em seguida os substratos foram transferidos para as garrafas de vidro contendo o meio de cultura AP.

#### **2) Inoculação e acompanhamento temporal**

Para o isolamento do fungo e o PET foi criado um ambiente controlado com o meio AP a temperatura ambiente e óleo de coco, com o auxílio de materiais devidamente esterilizados bem como praticas assépticas adoptadas, junto ao bico de busen, em 3 garrafas de vidro volumétricos e 2 garrafas replicas de cada garrafa original de forma rápida e directa para minimizar o tempo de exposição ao ambiente, foi colocado cerca de 91g do meio de cultura AP, de seguida usando pinças devidamente esterilizadas

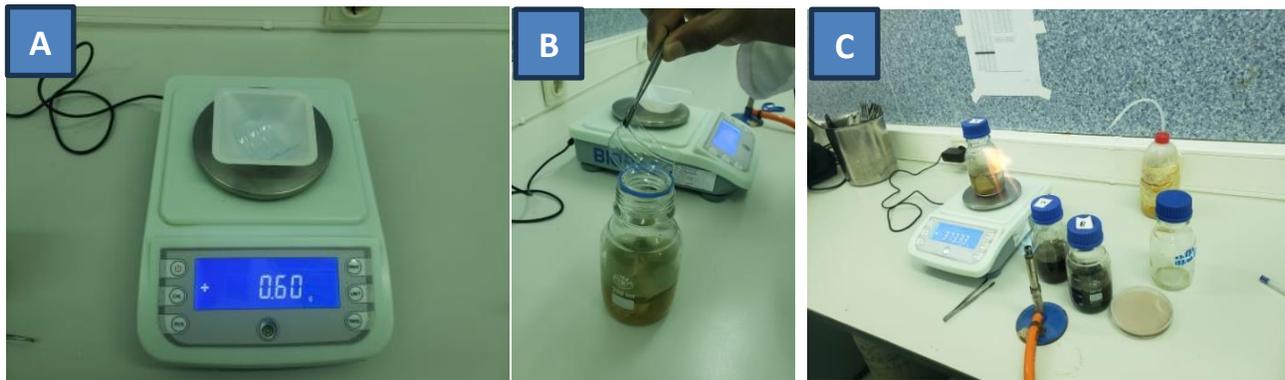
de forma precisa foram feitas as transferências das colônias para os recipientes contendo AP, após a transferência das colônias fúngicas e adição do óleo de coco 12g para cada garrafa de vidro volumétrico como nutriente, foi feita a introdução de 0,60g de PET nas garrafas de vidro volumétricas contendo as transferências previamente inseridas, por fim o fechamento imediato do recipiente para evitar contaminação, conforme ilustra a figura 8 e a Tabela no anexo III.

Para o monitoramento da actividade metabólica foi pesado em uma balança analítica de precisão antes do início do experimento para registrar a massa inicial do pote, submetidos os potes a condições controladas, em seguida após um determinado período foram feitas pesagens periódicas em intervalos de tempo regulares em que os potes foram retirados do ambiente controlado e pesados novamente para registrar a massa em cada ponto temporal.

$$\Delta M = M_o - M_f \quad \text{Equação 3}$$

Onde:

$M_o$  – massa inicial;  $M_f$  – massa final;  $\Delta M$  - variação da massa.



**Figura 8:** Processo de isolamento do PET com os fungos na garrafa de vidro.

### 3.8. Quantificação do grau de biodegradação de Polietileno Tereftalato por *Aspergillus flavus*

Depois do tempo de incubação de 46 dias fez se a retirada e lavagem do PET com álcool a 70% durante 05 minutos, retirado todo material junto ao PET e secagem por 20 minutos na estufa de secagem conforme as figuras 13 e 14 anexo II, para que fosse possível quantificar a degradação com o cálculo de  $\Delta M\%$ . A biodegradação de plásticos foi avaliada através da variação de massa em percentagem ( $\Delta M\%$ ), sendo as amostras pesadas em balança analítica antes ( $M_o$ ) e após ( $M_f$ ) a biodegradação

usando o Teste de Sturn, para quantificar no fim da incubação a Mf do PET de acordo com a equação abaixo. Método de quantificação de biodegradação de plástico por perda de massa estabelecida pela ISO 14855-1: 2012. Para o calculo da variação da massa em percentagem foi usada a formula abaixo conforme recomendado por Provinciatto (2012).

$$\Delta M\% = \frac{M_o - M_f}{M_o} \times 100\% \quad . \quad \text{Equação 4.}$$

Onde:

Mo – massa inicial; Mf – massa final;  $\Delta M\%$  - variação da massa em percentagem.

### **3.8.1. Processamento dos Dados**

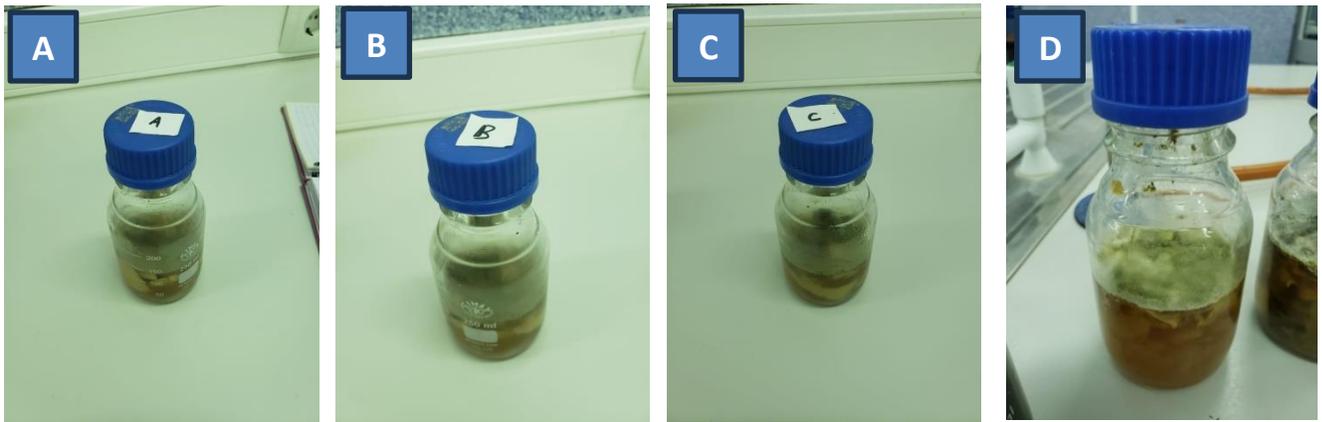
Após a aquisição dos dados, foi utilizado o software Microsoft Excel versão 2010 para processa-los, manipula-los e gerar resultados em forma de ilustrações gráficas. Os dados foram organizados em uma tabela dinâmica para facilitar a manipulação e as análises da  $\Delta M\%$ . Produzindo-se no final os gráficos ilustrativos das  $\Delta M\%$  dos PET's apos 46 dias.

## CAPÍTULO IV: RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4. Resultados

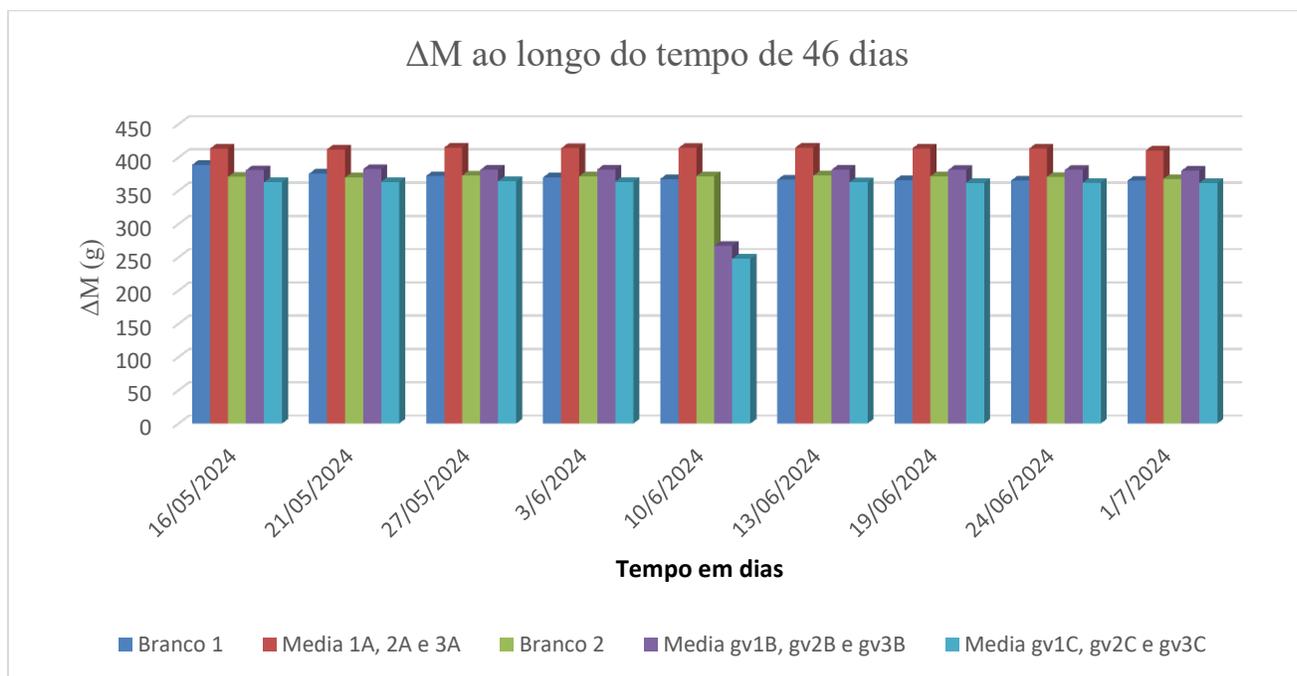
#### 4.1. Isolamento e monitorização da colonização de *Aspergillus flavus* no Polietileno Tereftalato em condições controladas

O crescimento do fungo *Aspergillus flavus* no meio de cultura confirma a viabilidade do fungo nas condições impostas e o crescimento na superfície do PET sugere uma possível interacção com o plástico indicando uma colonização ou início de biodegradação como ilustra a figura 9, foi possível observar uma turbidez no meio de cultura



**Figura 9:** Ilustração do ambiente criado em garrafas de vidro.

O *A. flavus* conforme descrito acima foi testado quanto à sua capacidade de degradar o PET. O PET foi colocado no isolado de pré-cultura em meio AP. A figura 9 mostra o crescimento do isolado após 46 dias de incubação em temperatura de  $(30 \pm 2^\circ\text{C})$ . O mesmo crescimento foi observado muito mais lentamente do que quando o fungo cresceu em SDA, a observação macroscópica conforme mostrado na mesma figura, o isolado colonizando e cobrindo a superfície do PET. Os resultados revelaram-se positivos e significativos, pois indicam a capacidade do *A. flavus* de se adaptar e degradar compostos complexos como o PET imposto ao mesmo.



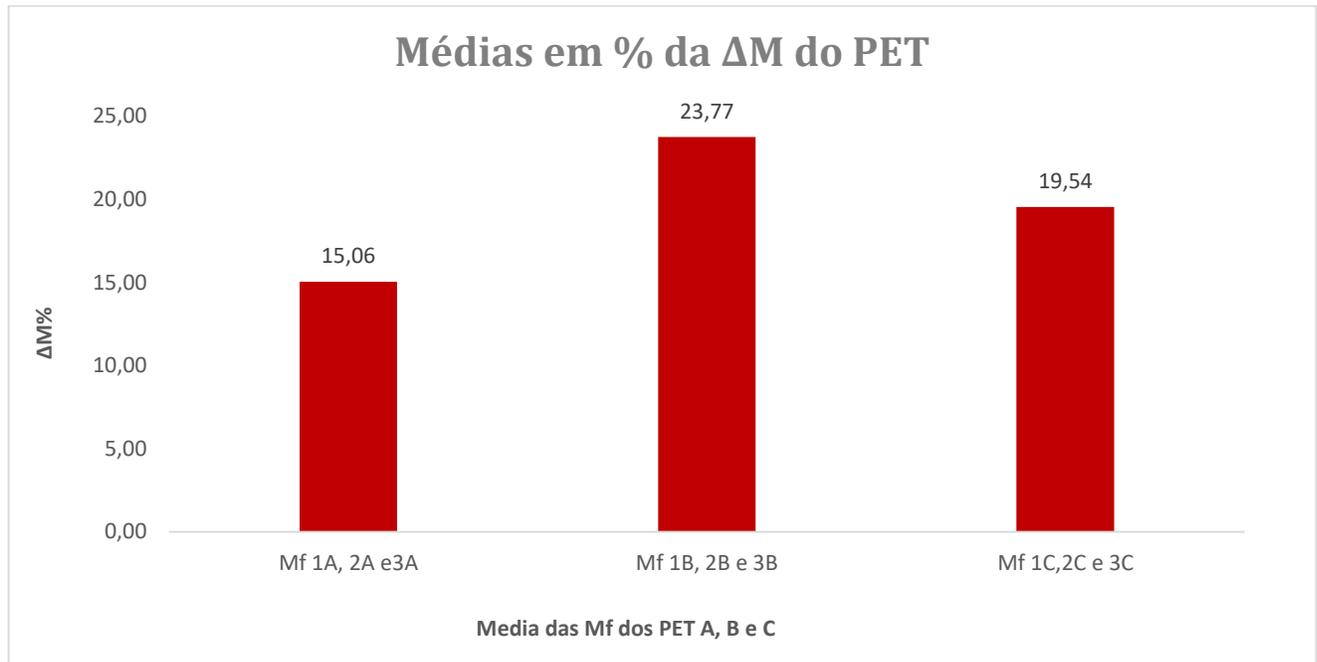
**Figura 10:** Monitoramento temporal da massa da garrafa de vidro com o isolado dado me massa em função do tempo.

Na figura 10 foi observado nos primeiros dias de monitoramento, que as médias das actividades metabólicas dos fungos mostraram valores estáveis e elevados, indicando um ambiente favorável para o crescimento e metabolismo dos fungos. No entanto ao longo do período de monitoramento observou-se uma queda significativa nas médias das amostras de gv1B, gv2B e gv3B, gv1C, gv2C e gv3C com valores reduzidos significativamente.

Após a queda, mostram uma leve recuperação nas semanas seguintes, embora ainda permaneçam abaixo dos níveis iniciais, o que indica que, apesar do stress, os fungos conseguem se adaptar e recuperar parcialmente sua actividade metabólica, sugerindo uma adaptação dos fungos e interação com o PET. As medições do branco 1 e branco 2 mantêm-se constantes ao longo do tempo, o que sugere que as variações observadas nas amostras experimentais são de fato relacionadas à actividade dos fungos e interação com o PET e não a factores externos.

#### 4.2. Quantificação do grau de biodegradação de Polietileno Tereftalato por *Aspergillus flavus*

A figura 11 representa o resultado obtido após 46 dias de experimento, onde as barras indicam a variação do peso nesse período, evidenciando uma redução percentual no peso do material PET, com uma perda de peso total de 15.06%, 23.77% e 19.80% (os valores são média de três medições cada). Esses dados indicam que o processo levou a uma biodegradação significativa do PET.



**Figura 11:** Média de três medições para a figura 11 do resultado da degradação do PET após 46 dias.

Avaliada biodegradação do PET com base na perda de peso em comparação com o peso inicial, conforme mostrado na Figura 11 acima, os isolados colonizaram e cobriram a superfície do PET; assumimos que os fungos modificaram o PET secretando enzimas degradativas e utilizaram os componentes do polietileno como fonte de carbono para o seu crescimento. A hidrofobicidade e o grupo funcional limitado do PET, limitaram a fixação de *A. flavus* à superfície do PET, o crescimento fúngico também foi muito mais lento possivelmente devido as características físicas e químicas do PET. Os resultados das análises de biodegradação neste estudo, confirmaram que o isolado testado têm a capacidade de degradar o plástico (PET), embora em ritmo reduzido.

## 5. Discussão dos resultados

### 5.1. Isolamento e monitoramento da colonização de *Aspergillus flavus* no Polietileno Tereftalato em condições controladas

As colónias cultivadas em meio SDA, durante sete dias a temperatura de  $30 \pm 2^\circ\text{C}$ , apresentaram uma textura que variava de cotonosa a lanosa, com uma aparência pulverulenta e a presença de sulcos radiais. A coloração das colónias foi verde-amarelado e branco nas bordas nas garrafas de vidro em que foram isolados com o PET para a degradação, a adaptação do fungo e sua aderência a superfície e interação com o PET em meio controlado, e esses resultados foram também observados por Corrêa, (2003) e Carvalho, (2013). M

As amostras de *A. flavus* inoculadas em garrafas de vidro volumétricas, contendo meio de cultura AP e incubadas a  $30^\circ\text{C}$  durante 46 dias. Aproximadamente 20g de fungo colocadas na superfície do meio de cultura AP As garrafas foram pesadas semanalmente ao longo dos 46 dias de incubação para monitorar a perda de peso. Os resultados indicaram uma perda de peso nas garrafas de vidro, essa queda acentuada pode sugerir que os fungos enfrentaram condições adversas, como falta de nutrientes, mudanças no pH que afectaram negativamente seu crescimento e actividade metabólica (secreção de gases). o que também pode indicar que a glicose do meio de cultura estava a ser consumida pelos fungos. Consequentemente, a actividade metabólica dos fungos variou, conforme ilustrado na Figura 10.

Esta figura demonstra claramente que o SDA, AP e o óleo de coco foram absorvidos pelo micélio fúngico, sugerindo fortemente que substâncias exopoliméricas presentes nos fungos podem estar envolvidas no processo de absorção e degradação. Estes resultados são semelhantes aos obtidos por Imamura *et al.* (2021) e Munir (2018), que usaram uma placa de ágar com meio de sal mineral. A comparação dos resultados sugere que o *A. flavus* possui mecanismos eficientes para a utilização de diferentes fontes de nutrientes, evidenciando o seu potencial na biodegradação de substâncias complexas, um resultado positivo foi obtido por Ibrahim *et al.* (2011) ao criar um ambiente de interação entre o fungo e o polímero usando um meio diferente que foi o meio basal de ágar.

A metodologia adoptada neste estudo permitiu observar de forma precisa as alterações no peso das garrafas, reflectindo directamente na actividade metabólica dos fungos. O ambiente controlado da incubadora a  $30^\circ\text{C}$  favoreceu o crescimento e a actividade do *A. flavus*, enquanto o monitoramento

semanal forneceu dados consistentes sobre a dinâmica de consumo de nutrientes e a subsequente variação da actividade fúngica, que pode ter favorecido a interacção com o PET.

O isolamento das colónias e a análise da sua velocidade de crescimento são etapas significativas para entender a dinâmica de biodegradação do PET por *A. flavus*. A observação directa da interacção entre o fungo e o PET proporciona uma compreensão detalhada do comportamento do fungo em condições de cultivo controladas, permitindo uma sugestão de optimização dos parâmetros experimentais para maximizar a biodegradação.

## **5.2. Quantificação do grau de biodegradação de Polietileno Tereftalato por *Aspergillus flavus***

Estes resultados destacam a eficácia do isolado na degradação do PET, embora ainda haja espaço para melhorias. A análise detalhada das percentagens de perda de peso da figura 11 demonstra que o processo de biodegradação foi bem-sucedido, mas também sugere que ajustes adicionais podem ser necessários para otimizar ainda mais o processo da biodegradação do PET. Embora a perda de peso observada neste estudo tenha sido relativamente menor do que a registrada por Singh (2014), que obteve uma média de 30%, foi superior à degradação de polímero relatada por Munir, (2018), que variou entre 5,13% e 6,30%.

As diferenças nas percentagens de perda de peso observadas no presente estudo, em comparação com os trabalhos anteriores, estão fortemente relacionadas com a Mo do polímero utilizado. No estudo de Singh (2014), a Mo do polímero não foi especificada, enquanto que no trabalho de Munir (2018), foi utilizada uma Mo de 3 g/L. Em contraste, o presente estudo utilizou uma Mo de 0,60 g. Esta variação na Mo pode ter influenciado significativamente as diferenças nas percentagens de perda de peso registadas.

A massa do polímero é um factor determinante na biodegradação, uma vez que afecta directamente a facilidade com que os microrganismos podem degradar o material. Polímeros com uma massa maior possuem cadeias poliméricas mais longas e complexas, o que dificulta a acção enzimática dos microrganismos e, conseqüentemente, reduz a taxa de degradação. Isto ocorre porque as enzimas precisam quebrar estas cadeias longas em fragmentos menores para que possam ser metabolizadas.

Córdoba, (2024) relatou uma degradação de PET por *A. flavus* de aproximadamente 16,45% de 25mm do polímero em um período de 60 dias, sublinhando a importância do tamanho das partículas a serem degradadas. Este factor é crucial, pois a forma como os microrganismos interagem com o espaço e a

dimensão das partículas de PET influencia a obtenção da sua fonte de carbono. O desempenho satisfatório, deve-se à sua capacidade de produzir enzimas que degradam o plástico, utilizando-o como fonte de energia e carbono. Estes resultados são semelhantes aos obtidos no presente estudo, reforçando a capacidade de *A. flavus* na biodegradação de plásticos.

## CAPÍTULO V: CONCLUSÃO E RECOMENDAÇÕES

### 6. Conclusão

De acordo com os objectivos traçados e os resultados chegou-se as seguintes conclusões:

- O ambiente de cultivo controlado para a interacção entre *A. flavus* e o PET mostrou-se positivo, e sugeriu a capacidade do *A. flavus* de se adaptar, aderir e degradar o PET durante a monitorização do isolado.
- O fungo utilizado no trabalho demonstra sua importância nos processos de degradação. O *A. flavus* tem a capacidade de degradar o PET. Tendo diminuído o peso deste polímero após o tempo de incubação provando se eficiente.

### 7. Recomendações

Com a conclusão do presente estudo recomenda-se:

- A realização de análise de subprodutos através da cromatografia e ensaios enzimáticos para confirmar as enzimas que degradam o PET;
- Que se faça em estudos futuros uma avaliação de viabilidade para tratar grandes volumes de resíduos PET adoptando processos da trangenina;
- A realização de estudos similares com outras espécies com diferentes tipos de polímero em diferentes condições e tratamentos.

## CAPÍTULO VI: BIBLIOGRAFIA E ANEXOS

### 8. Referências Bibliográficas

- Abrantes, K. G., Barnett, A., Marwick, T. R., & Bouillon, S. (2013). Importance of terrestrial subsidies for estuarine food webs in contrasting East African catchments. *Ecosphere*, 4(1), 1-33.
- Antão, C. (2018). Acreditação Flexível Global. Norma Portuguesa. Requisitos gerais de competências para laboratórios de ensaio e calibração. NP. EN ISO/IEC 170525.
- Antunes, T. M. L. (2023). Poluição no mar: Análise e monitorização utilizando veículos na tripulados. Escola naval. Alfeite.
- Araujo, B. R. C.; Borges, F. F. e Duda, R. M. (2023). Influencia dos Microplasticos e Nanoplasticos no meio ambiente e na Saude Humana. Anais do Simpósio de Tecnologia Fatec Jaboticabal (SITEC-JB).
- Briosch, L. e Pedra, A. S. (2023). O Dever das Empresas e a Poluição Marinha Plástica. Volume 14 | Número 1 | Jan/jun.
- Carvalho, C. M. B. (2022). Corais e Poluição por Plásticos. O Desafio da Economia Circular na China e Indonésia. Universidade do Porto. Faculdade de Economa, Economia e gestaodo Ambiente 2º ciclo.
- Carvalho, J. M. (2023). Biorremédia cao Fungica dos Microplasticos no Oceano. Instituto federal Sul de minas Gerais. Josif.
- Carvalho, L. I. C. (2013). Aspergillus e Aspergilose – Desafios no Combate da Doença. Universidade Fernando Pessoa. Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas. Porto.
- Colen, G. (2006). Isolamento e seleção de fungos filamentosos produtores de lípases. Faculdade de Farmácia da UFMG. Belo Horizonte, MG.
- Córdoba, M. F.; Álvarez, M. C.; López, S. H.; Ramírez, F. G.; e Bedoya, L. O. (2024). Biodegradação de polietileno de baixa densidade em solo com fungos do gênero *Aspergillus* spp. *Cien .Ing .Neogranadina*, vol. 34, nº 1, pp. 57–66.
- Corrêa, W. R. (2003). Isolamento e identificação de fungos Filamentosos encontradas em peças anatómicas conservadas em solução de formol a 10%. Universidade do Vale Paraiba, Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento. São José dos Campus, SP.

- Costa, M. V. D. (2022). Produção de L-asparaginase de *Aspergillus spp* da seção terri procedentes da micoteca URM da UFPE. Universidade federal de Pernambuco, Centro de Biociências. Recife. 27 : il., tab.
- Dores, M. M. (2021). O lixo plástico marinho nos fundos oceânicos e os seus efeitos para a economia do mar da UE. Nova School of Law. Outubro.
- Geyer R., Jambeck, J. R., e Law, K. L. (2017) Production, use, and fate all plastics ever made. *Science advances*, 3 <https://doi.org/10.1126/sciadv.1700782>.
- Gomes, A. H. C. (2023). O Combate à Poluição por Plástico nos oceanos: Da formação de agenda às negociações para a construção de um acordo Internacional. João Pessoa.
- Gonçalves, A. N. (2013). Estudos bioquímicos e determinação da especificidade da peptidase produzida pelo fungo *Aspergillus flavu*. São José do Rio Preto. UNESP.
- Ekanayaka, A. H.; Suwannarach, N.; Stephenson, S. L.; Dão, C.; Karunarathna, S. C. A. (2022). Uma Revisão dos fungos que degradam Plástico. *J. Fungi*, 8, 772.
- Ibrahim, I. N.; Maraqa, A.; Hameed, K. M.; Saadoun, I. M.; e Maswadeh, H. M. (2011). "Avaliação de fungos potencialmente degradadores de plástico em habitats jordanianos," *urco Diario de Biologia*: vol. 35: Nº 5, Artigo 3.
- Imamura, R. Y. C.; Alberghini, L. F.; Oliveira, M. S. C.; e Colombo, T. E. (2021). Isolamento e identificação de fungos filamentosos em slimes. Curso de Biomedicina da Universidade Paulista, São José do Rio Preto-SP, Brasil. *Health Sci Inst.*;39(1):13-7.
- ISO 14855-1 (2012). Determinação da biodegradabilidade aeróbica final de materiais plásticos sob condições controladas de compostagem — Método por análise do dióxido de carbono libertado — Parte 1: Método geral. Internacional Padrão. Segunda edição
- Ivo, Valeria de Souza (2023), Indução Halofica de Comunidade MICROBIANA Para Biodegradação de Microplásticos em Ambientes Marinhos, Universidade Federal de São Carlos, Setembro.
- Iwen, P. C. et. al. (1997). *Aspergilose pulmonar invasiva devido a Aspergillus terreus: e Revisão da Literatura.1998* pela Universidade de Chicago. Todos os direitos reservados. 1058–4838/98/2605–0013\$03,00.

- Júnior, H. I. T. (2019). Estudo da variação Multi-Temporal da temperatura, precipitação e humidade relativa do ar na cidade de Quelimane e sua relação com os índices oceânico (1981 - 2016). Escola Superior de Ciências Marinhas e Costeiras. Monografia para Obtenção do Grau de Licenciatura em Oceanografia. Quelimane, Março.
- Leite, Bruno Souza Moreira (2023). Aplicação de técnicas de conservação convencionais e inovadoras em algas marinhas da costa Portuguesa. Ficogastronomia. Universidade NOVA de Lisboa, Faculdade de Ciências e Tecnologia Setembro.
- Lemos, J. Á.; Costa, M.; Lemos, A. A.; e Silva, M. R. R. (2001). Isolamento e Identificação de fungos em farinhas de milho e mandioca em Goiânia. Departamento de Microbiologia, Imunologia, Parasitologia e Patologia do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, Universidade Federal de Goiás. Vol. 30 ([ ]). 31-36. jan.-jun.
- Lira, D. N. O., (2022). Produção de extrato enzimático do fungo *Aspergillus flavus* com atividade amiloítica. Universidade Federal do Maranhão, Centro de ciências exatas e tecnológicas. São Luís- MA.
- Lucena, Ednete Maria Lima (2022). O papel da gestão publica municipal diante da poluição causada pelo plástico nas praias da cidade de João Pessoa. Universidade Federal da Paraíba; Curso de Gestão Publica. João Pessoa/PB.
- Martins, Marta Filipa Santos (2020). Poluição por plástico. A crise ambiental e as políticas europeias e nacionais. Dissertação de Mestrado em Gestão do Território, Área de Especialização em Ambiente e Recursos Naturais. Junho.
- Macedo, Indira Maria Estolano (2020). Reciclagem do Polietileno Tereftalato (PET) no Fomento da Economia Circular. Braz. J. of Develop., Curitiba, v. 6, n. 8, p.57704-57723 aug.
- Munir. E; Harefa. RSM; Priyani. N; e Suryanto. D. (2018): Fungos de degradação de plástico *Trichoderma viride* e *Aspergillus nomius* isolados do solo do aterro local em Medan. Departamento de Biologia, Faculdade de Matemática e Ciências Naturais. Universitas Sumatra Utara, Jl. Bioteknologi No. 1 Medan 20155.
- Morreira, L. M. O. (2017). Estudos de compostos produzidos pelo fungo *Aspergillus terreus* isolado do solo do Cerrado Goiano. Universidade Estadual de Goiás, Campus Anápolis de ciências exatas e tecnologias. Anápolis-GO

- Oliveira, L.A., Jesus, M.A., Jackisch-Matsuura, A.B., Gasparotto, L., Oliveira, J.G.S, Lima-Neto, R.G., Rocha, L.C. (2019). Conhecimento, conservação e uso de Fungos. Editora INPA. Manaus.
- Pereira, F. C.2014. Microplasticos no ambiente marinho mapeamento de fontes e identificação de mecanismos de gestão para a minimização da perda de pellets plásticos. Universidade de São Paulo, Instituto Oceanografico.
- Piatti, Tania Maria; Rodrigues, Reinaldo Augusto Ferreira (2005). Plásticos: características, usos, produção e impactos ambientais. Série: Conversando sobre Ciências em Alagoas. Maceió/AL.
- Pinheiro, Maria dos Reis Rodrigues (2003). Estudo da Variabilidade Genetica dos *Aspergillus flavus* como Base do Desenvolvimento de PCR Multiplex para Deteccao de Fungos Produtores de Aflatoxinas em Castanha-do-Brasil e Castanha de Caju. Universidade Catolica de Brasilia. Brasilia, Marco.
- Provinciatto, Leticia Antonia e Jacob, Ricardo Francischetti (2012), Sacolas em Polietileno de Alta Densidade (PEAD): um Estudo sobre sua Biodegradacao. RETEC, Ourinhos, v. 05, n. 01, p. 93-101, jan/jun.
- Ritter, A. C. (2007). Potencial toxigémico de *Aspergillus flavus* testado em diferentes meios e condições. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Agronoia. Porto Alegre, RS, Brasil.
- Saad, G. A., Bedeer, A. H., & Radwan, E. H. (2015). Measurement of heavy metals accumulation in ctendia of *Anadara ehrenbergi* (Dunker, 1868) using energy dispersive x-ray fluorescence (EDXRF). *Journal of Oceanography and Marine Science*.
- Seneviratne G., Tennakoon NS, Weerasekara MLMAW e Nanadasena (2006). Biodegradação do LDPE por um desenvolvido. *Biofilme de Penicillium Bacillus* , *Curr. Ciências*, 90, 20 21.
- Seyffert, Pâmela Amaro (2020). Crise da poluição plástica; Estrategias de Comunicacao e Responsabilidade Social Corporativa. Dissertação de Mestrado em Ciências da Comunicação, Comunicação Estratégica. Setembro.
- Silva, F. C.; Chalfoun, S. M.; Batista, L. R.; Santos, C.; e Lima, N. (2015). Taxonomia polifásica para identificação de *Aspergillus secção flavi* uma revisão. Instituto Federal do Espírito Santo. *Revista Ifes Ciência*, nº 1, V.1.

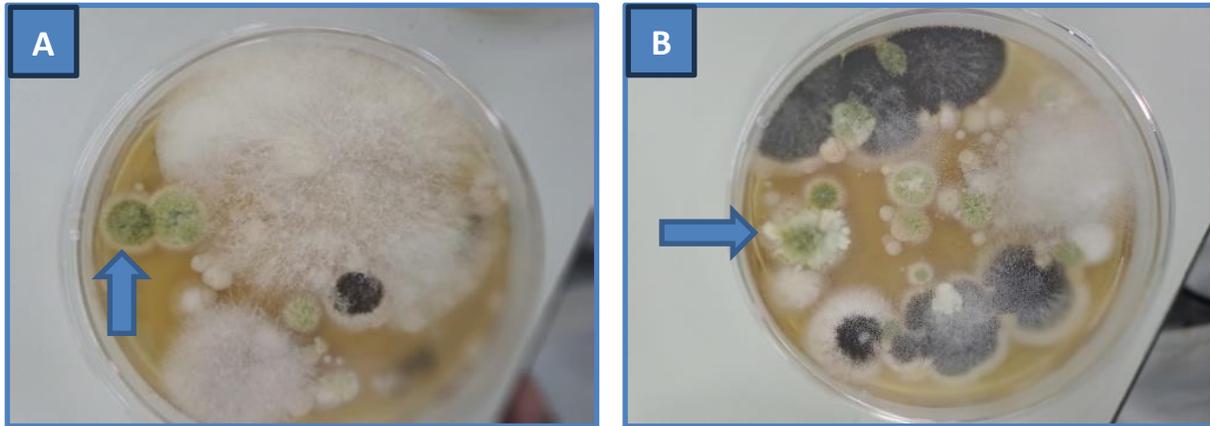
- Silveira, T. M. G., (2017). Desenvolvimento de filmes biodegradáveis a partir do resíduo da extração de corante de urucum. Universidade de São Paulo, Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto. São Paulo.
- Šimonoviřová, A.; Gódyová, M.;e Kunert, J. (2004). *Álbun Engyodontium*, uma nova espécie de fungo microscópico para a Eslováquia e a sua atividade queratinolítica. . *Biologia*, Bratislava, 59: 17-18; ISSN0006-3088.
- Soares C, Abrunhosa L, Venâncio A. (2013). Fungos produtores de micotoxinas: impacto na segurança alimentar. *Portuguese Society for Microbiology Magazine*. Cmanaia.
- Singh, Jyoti e Gupta, K. C. (2014) Triagem e identificação de fungos de solo degradadores de polietileno de baixa densidade (LDPE) isolados de locais poluídos com polietileno ao redor da cidade de Gwalior (MP). *Artigo Original de Pesquisa*. ISSN: 2319-7706 Volume 3 Número 6.
- Thompson, R. C., Swan, S. H., Moore, C. J., & vom Saal, F. S. (2009). Our plastic age. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, p. 1973.; <https://doi.org/10.1098/rstb.2009.0054>. nr.364.
- UNEP (2016). *Marine plastic debris and microplastics – Global lessons and research to inspire action and guide policy change*. United Nations Environment Programme.
- UNEP (United Nations Environment Programme) (2018). *Single-use plastics. A Roadmap for Sustainability*.
- UNEP (United Nations Environment Programme) (2021). *From pollution in Solution: A global assesment of marine litter and plastic pollution*.
- Zanella, T. V. 2013. *Poluição marinha por plástico e o direito internacional do meio ambiente*. Faculdade de Direito da Universidade de Lisboa. Ano 2, nº 12, 14473-14500 / <http://www.idb-fdul.com/> ISSN: 2182-7567
- Zanin, E. et. al. (2014). Estudo da degradação de compostos fenólicos presente em águas residuárias de postos de combustíveis utilizando fungos filamentosos (*Aspergillus Flavus*). *Revista do Centro do Ciências Naturais e Exatas - UFSM, Santa Maria*. e-ISSN 2236 1170 - V. 18 n. 1º de abril, p.279-287.

Zipperer, M.; Minotto, E.; Gelinski, J. M. L. N.; Barato, C. M.; e Geremias, R. (2020). Isolamento e seleção de Fungos de solo de cultivo de videiras contaminado com dicarbamato para biorremediação. Anuário Pesquisa e Extensão UNOESC Videira. Artigo.

## 9. Anexos

### Anexo I

#### Cultivo do *A. flavus* no meio de cultura SDA

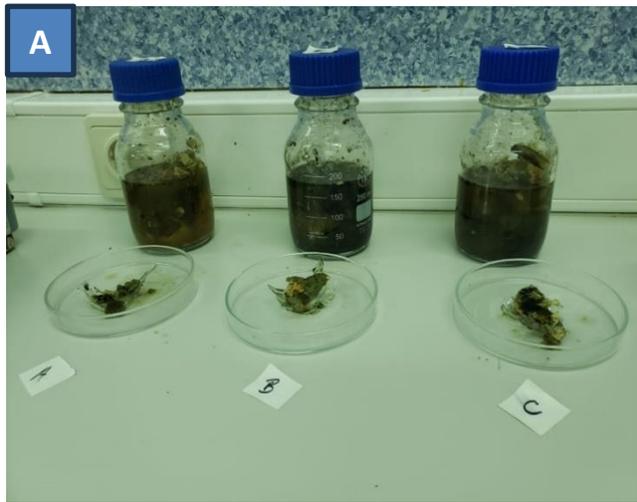


**Figura 12:** Primeira inoculação para isolamento do *A. flavus*.

**Tabela 3:** Características macroscópicas das colônias pretendidas.

Características mensuradas	Características fenotípicas
<b>Velocidade de crescimento</b>	Rápido
<b>Coloração do micélio reprodutivo</b>	Verde-amarelada branca nas bordas no meio SDA
<b>Topografia</b>	Rugosa
<b>Textura</b>	Pulverulenta

### Anexo II



**Figura 13:** A pós retirada do PET das garrafas de vidro.



**Figura 14:** PET's a pós lavagem e secagem para a pesagem.

**Anexo III**

**Tabela 4:** Quantidade dos componentes do meio condicionado para a degradação do PET a 30°C.

Compon entes	Data 1	Bran co 1	1 <sup>a</sup>	2A	3 <sup>a</sup>	Data 2	Bran co2	1B	2B	3B	1C	2C	3C
Peso da garrafa de vidro	(16/ 05)	243. 36 g	243. 36 g	243. 36 g	243. 36 g	(17/ 05)	243.3 6 g	243. 36 g					
Peso do meio AP		92.7 1 g	91.3 6 g	93.1 7 g	93.4 7 g		89.03 g	91.5 0 g	90.1 8 g	90.5 4 g	90.2 7 g	89.1 9 g	91.7 0 g
Peso de		15.6	39.8	32.1	37.2		13.02	17.0	18.3	20.0	8.75	7.20	10.2

fungo	0 g	0 g	3 g	3 g	g	2 g	6 g	1 g	g	g	0 g
Peso do meio SDA	25.2	25.7	29.0	30.3	13.66	14.3	15.4	17.9	8.22	8.04	6.81
	0 g	7 g	2 g	3 g	g	1 g	1 g	1 g	g	g	g
Peso do óleo	12.0	12.0	11.9	12.1	11.97	12.0	12.0	11.9	12.1	12.0	12.1
	1 g	3 g	8 g	0 g	g	3 g	1 g	9 g	2 g	0 g	0 g
Peso do PET	0.0	0.60	0.60	0.59	0.0	0.61	0.60	0.60	0.60	0.60	0.62
		g	g	g		g	g	g	g	g	g
Total	388.	412.	410.	417.	371.0	378.	379.	384.	363.	360.	364.
	88 g	91 g	26 g	08 g	4 g	83 g	92 g	36 g	32 g	36 g	77 g

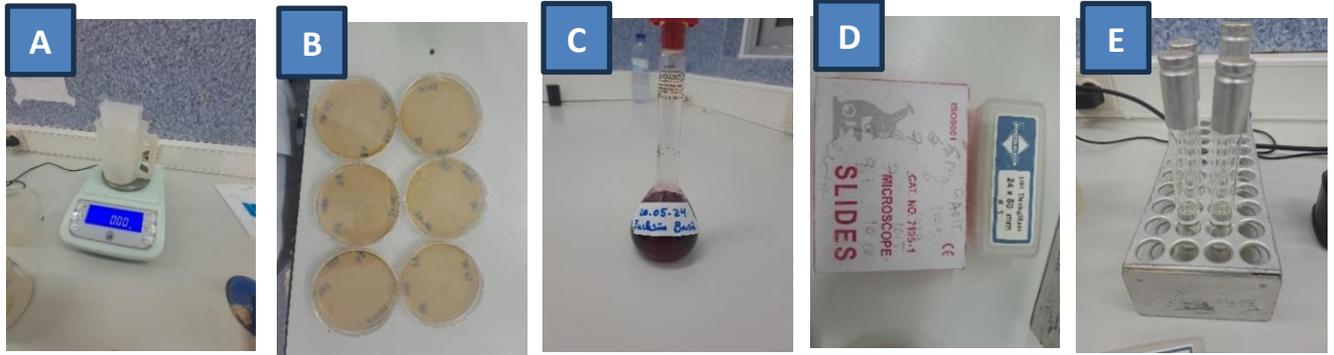
Onde: gv1A – garrafa de vidro volumétrica 1A; gv2A – garrafa de vidro volumétrica 2A; gv3A – garrafa de vidro volumétrica 3A; gv1B – garrafa de vidro volumétrica 1B; gv2B – garrafa de vidro volumétrica 2B; gv3B – garrafa de vidro volumétrica 3B; gv1C – garrafa de vidro volumétrica 1C; gv2C – garrafa de vidro volumétrica 2C; gv3C – garrafa de vidro volumétrica 3C.

#### Anexo IV



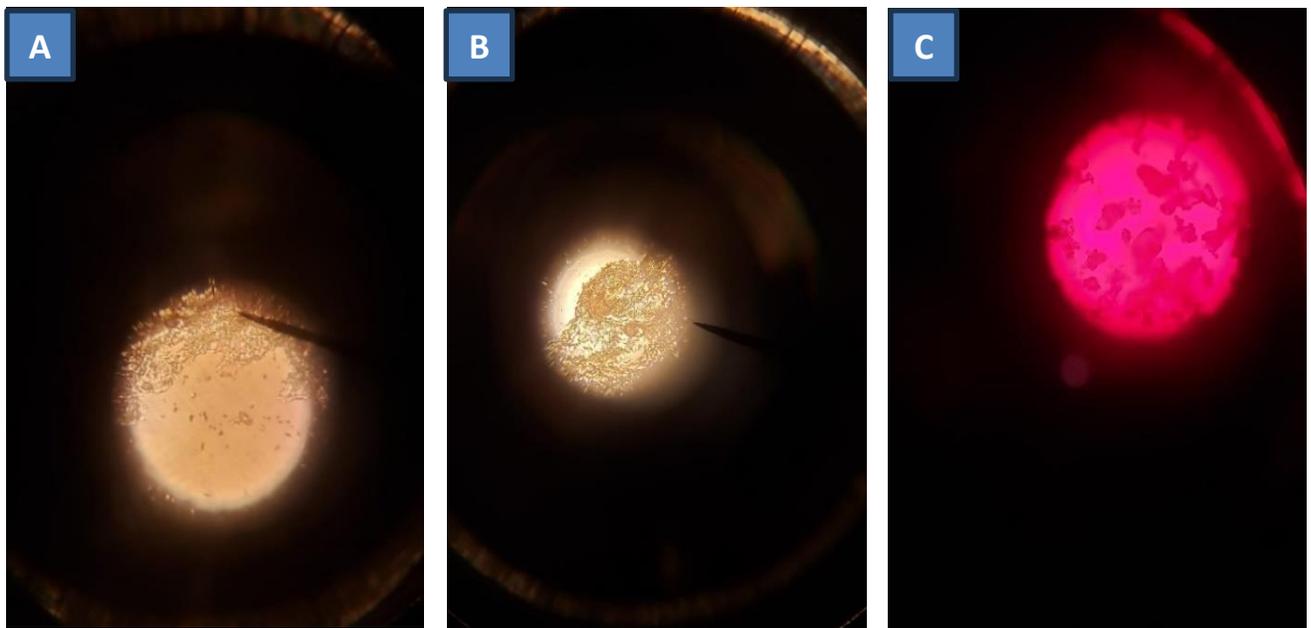
**Figura 15** : Alguns materiais usados.

#### Anexo V



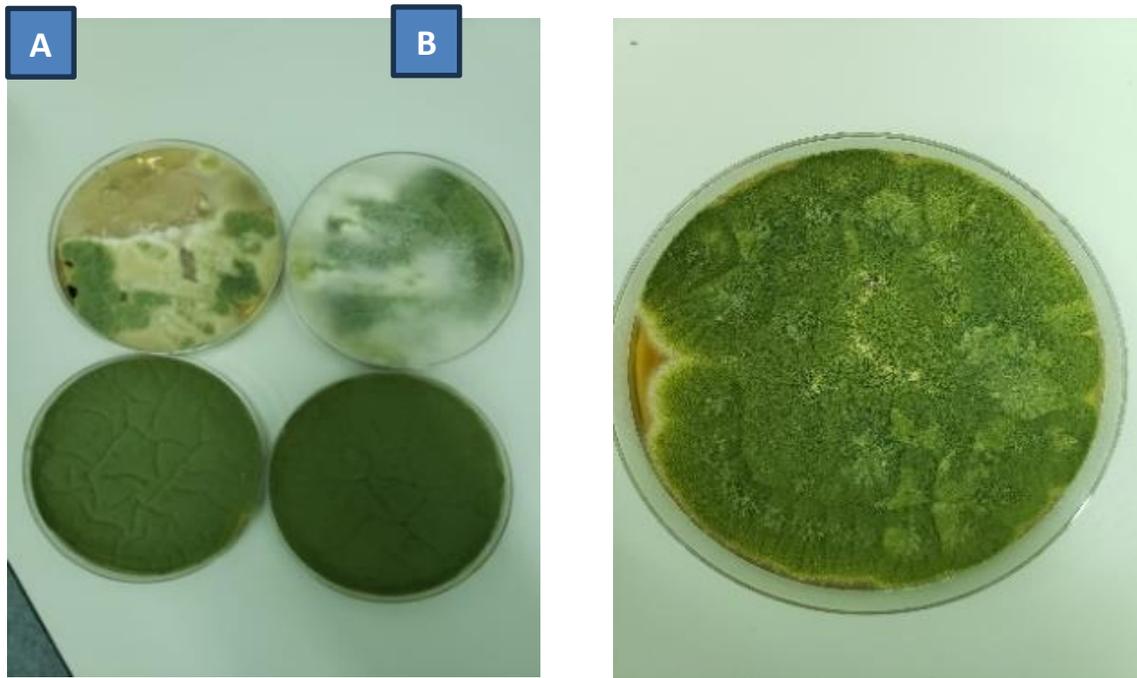
**Figura 16:** Materiais e reagentes usados na identificação e inoculação.

#### Anexo VI



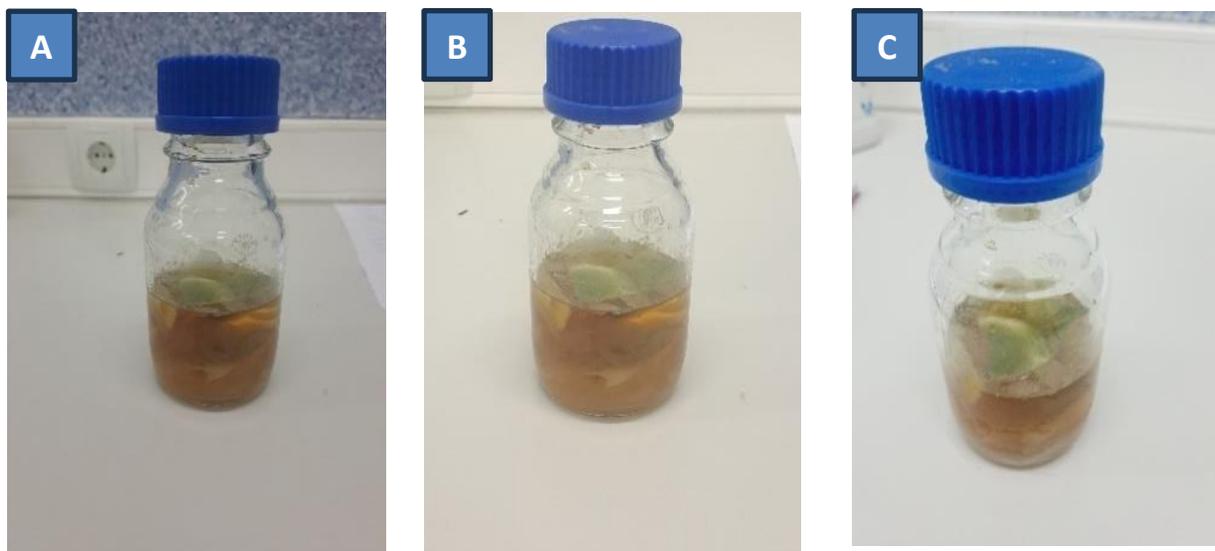
**Figura 17:** Ilustração microscópica de estruturas do *Aspergillus flavus*.

#### Anexo VII



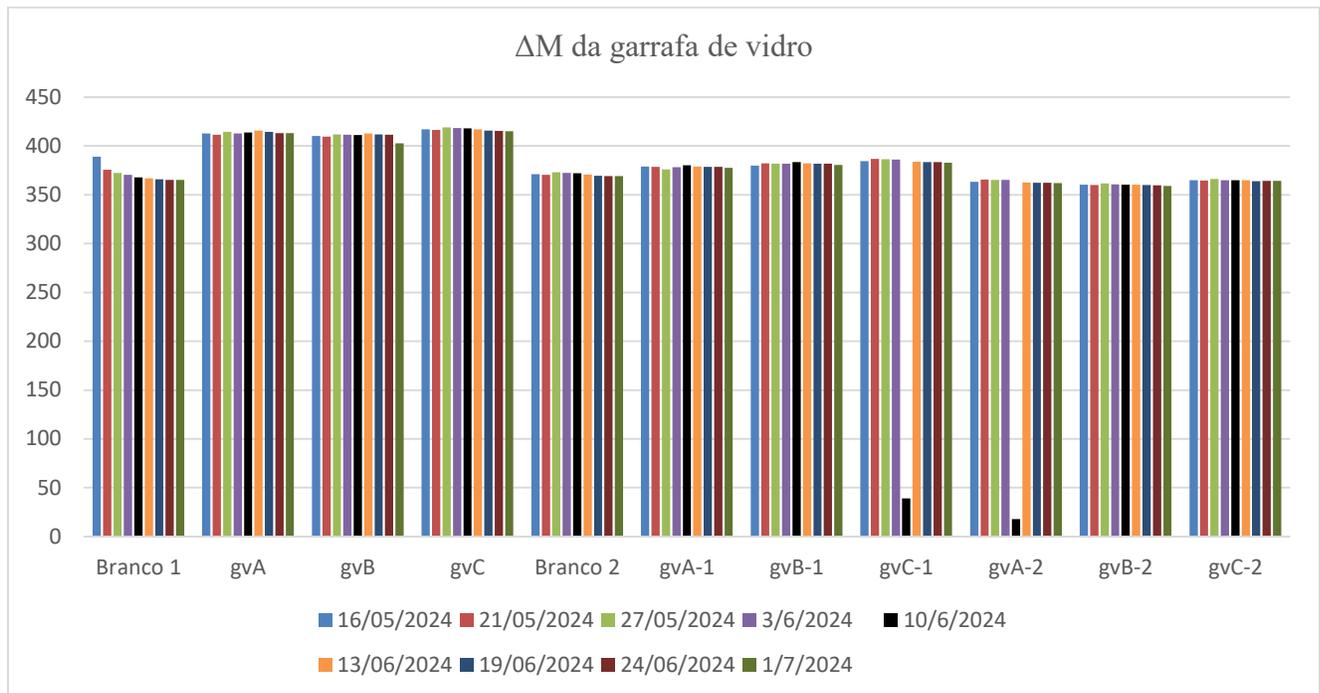
**Figura 18:** Isolados específicos de *A. flavus*.

### Anexo VIII



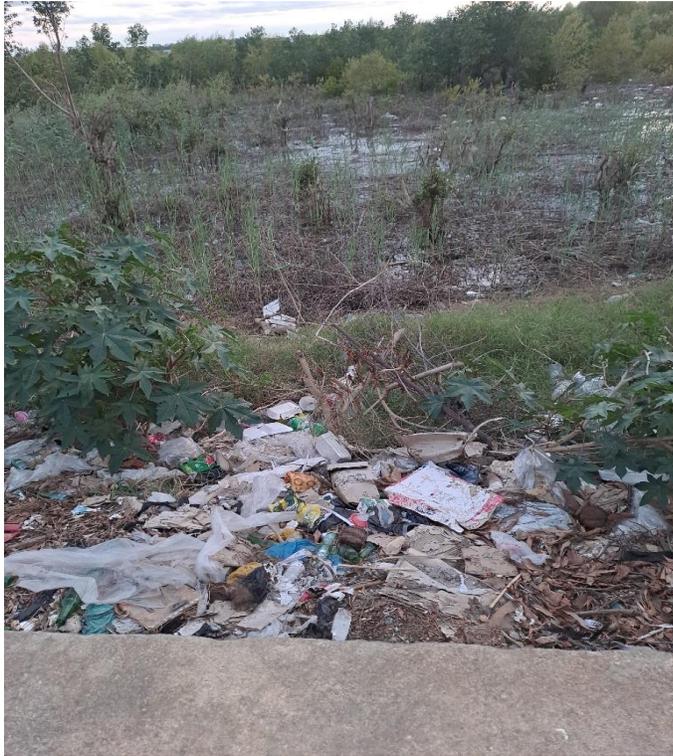
**Figura 19:** Ilustração das garrafas após 7 dias de incubação na primeira pesagem de controle.

## Anexo IX



**Figura 20:**  $\Delta M$  da garrafa durante os 46 dias em medições semanais.

## Anexo X



**Figura 21:** Poluição do Estuário dos bons sinais por resíduos plásticos e outros.