



Biodegradação de poli(ácido láctico) em tempos inferiores aos convencionais pela ação de fungos basideomicetos

Morgana Menegotto^{1, 2}, Micael Montemezzo², Letícia Osório da Rosa²,
Marli Camassola², Rosmary N. Brandalise¹

¹ Universidade de Caxias do Sul/ Laboratório de Polímeros
(mmenegotto1@ucs.br, rnbranda@ucs.br)

² Universidade de Caxias do Sul/ Instituto de Biotecnologia – Laboratório de Enzimas e
Biomassa (mmontemezzo@ucs.br, ticiaor@gmail.com, mcamasso@ucs.br)

Resumo

Resíduos poliméricos quando destinados de forma inadequada, associado a sua resistência à degradação podem promover poluição ambiental. Desta forma, estudos que possibilitam favorecer a degradação de alguns polímeros vêm crescendo e são considerados como alternativa para os atuais problemas de poluição ambiental. Os polímeros biodegradáveis despertam interesse, pois podem substituir os sintéticos, porém possuem aplicação limitada pelo seu custo, propriedades e processamento. O poli(ácido láctico) (PLA), polímero biodegradável deste estudo, é amplamente utilizado em embalagens e tem sua degradação entre 6 meses há dois anos após exposição em ambientes com condições de degradação (nutrientes, umidade, temperatura entre outros). Neste sentido, no presente trabalho foi avaliado o potencial de degradação biológica de filmes de poli(ácido láctico) pela ação de 11 diferentes isolados de fungos coletados nos biomas mata atlântica e pampa, com o objetivo de identificar fungos capazes de degradar o PLA em menores tempos que os convencionais. A análise da degradação foi realizada por análise gravimétrica pela massa residual e microscopia eletrônica de varredura (MEV). A perda de massa dos filmes de PLA nos fungos *Oudemansiella* cf. *canarii* (Jungh), *Trametes* sp. Fr., *Aurantioporus pulcherrimus* e *Macrolepiota* sp., após 14 dias de exposição, indicam a possibilidade de utilização dos macrofungos na biodegradação do biopolímero. Como principal resultado destaca-se o isolado do fungo *Ganoderma resinaceum* Boud. que provocou alterações na superfície do poli(ácido láctico), indícios de degradação biológica, em tempo inferior ao indicado na literatura para este polímero.

Palavras-chave: Poli(ácido láctico), Degradação biológica, Fungos.

Área Temática: Resíduos sólidos.

Biodegradation of polylactic acid in shorter times than conventional by action of basidiomycete fungi

Abstract

Polymeric wastes when intended improperly, associated with its resistance to degradation may promote environmental pollution. Therefore, studies involving the degradation of some polymers are considered as an alternative to current environmental pollution problems. Biodegradable polymers arouse interest because they can replace the synthetic, but have limited application due the cost and processing properties. Polylactic acid (PLA), biodegradable polymer employed in this study, is widely used in packaging and degrades



*from 6 months to 2 years after exposure in environments with degradation conditions (nutrients, humidity, temperature, etc.). In this sense, the present study evaluated the potential for biodegradation of poly (lactic acid) by the action of 11 different fungal isolates collected in atlantic and pampa biomes, with the goal of identifying fungi capable of PLA degrading in lower times than conventional ones. The degradation was evaluated by gravimetric analysis using the residual mass and scanning electron microscopy (SEM). The weight loss of PLA films in fungi *Oudemansiella cf. canarii* (Jungh), *Trametes sp. Fr.*, *Aurantioporus pulcherrimus* e *Macrolepiota sp.*, after 14 days of exposure, indicate the possibility of using these macrofungi in biodegradation of biopolymers. The main result stands out the isolated fungus *Ganoderma resinaceum* Boud., which caused changes in the surface of polylactic acid, evidence of biological degradation, times lower than that indicated in the literature for this polymer.*

Key words: Polylactic acid, Biological degradation, Fungi.

Theme Area: Solid waste.



1 Introdução

Resíduos poliméricos quando depositados em ambientes inadequados, aliado a sua resistência à degradação podem comprometer este ambiente, seja pela poluição visual que causam ou pelo fato de serem leves e flutuarem, muitas vezes entupindo bueiros e córregos. Dentro de um sistema integrado de resíduos, o aterro sanitário não é a forma indicada para destino final deste tipo de resíduo. Uma alternativa para a recuperação de resíduos poliméricos seria a incineração, contudo, esta é uma tecnologia não totalmente livre de emissões de dioxinas e o percentual de reciclagem de resíduos poliméricos não é elevada o suficiente para abastecer este tipo de recuperação. Desta forma, estudos que possibilitam favorecer a degradação de alguns polímeros vêm crescendo e são considerados como alternativa para os atuais problemas de poluição ambiental (ACHILIAS *et al.*, 2007; LAZAREVIC *et al.*, 2010).

O processo de degradação, o qual ocorre em materiais poliméricos, pode ser dito como qualquer mudança física ou química na estrutura dos polímeros, podendo ser resultado de fatores ambientais (luz, calor, umidade ou atividade biológica) e de processamento, induzindo mudanças nas propriedades dos mesmos (deterioração de funcionalidades), conduzindo à degradação (WILES & SCOTT, 2006; SHAH *et al.*, 2008).

O processo de degradação biológica, conhecido como biodegradação, é decorrente da ação de microrganismos tais como bactérias, fungos e algas que, em determinadas condições, colonizam a superfície do material, formando biofilmes. Estes biofilmes são constituídos por microrganismos que em contato com os polímeros, causam mudanças químicas e/ou morfológicas nos polímeros, segundo norma ASTM D883-12 (FLEMMING, 1998).

O PLA, polímero biodegradável, é um poliéster linear, alifático, originário de fontes renováveis, tais como o milho e a cana-de-açúcar. Este polímero é amplamente utilizado em embalagens, tendo ampliado sua aplicação nas indústrias alimentícia, automotiva, química, cosméticos, hospitalar e de utensílios domésticos, principalmente os descartáveis (FORTUNATI *et al.*, 2010; QIN *et al.*, 2010). O PLA sofre degradação por reação de hidrólise (DRUMRIGHT *et al.*, 2000; YEW *et al.*, 2005; NAMPOOTHIRI *et al.*, 2010). De acordo com Bostman (1991), o subproduto formado do processo de degradação é o ácido láctico, sendo este incorporado ao ciclo dos ácidos carboxílicos, dióxido de carbono e água, sendo dessa forma, degradado por microrganismos (LUCAS *et al.*, 2008).

Neste contexto, este trabalho busca avaliar a degradação do PLA pela exposição de 11 fungos isolados dos biomas mata atlântica e pampa, visando verificar a eficiência destes na degradação do PLA em menores tempos de degradação.

2 Material e métodos

Para a realização do estudo foi utilizado o poli(ácido láctico) Ingeo™ Biopolymer 3251D, da Cargill, com índice de fluidez de 30-40 g.10min⁻¹ segundo norma ASTM D1238-10. Como reagentes para a elaboração do meio de cultivo foram utilizados fosfato de potássio monobásico (KH₂PO₄) e sulfato de zinco heptahidratado (ZnSO₄.7H₂O) da Nuclear; sulfato de amônio ((NH₄)₂SO₄), cianato de amônio (CO(NH₂)₂) (ureia), cloreto de cálcio (CaCl₂) e agar bacteriológico da Vetec; sulfato de magnésio heptahidratado (MgSO₄.7H₂O), sulfato de ferro heptahidratado (FeSO₄.7H₂O) e sulfato de manganês hidratado (MnSO₄.H₂O) da Synth e Cloreto de cobalto II hexahidratado (CoCl₂.6H₂O) da Life Technologies.

Como material biológico foram empregados os fungos descritos no Quadro 1. Estes fungos pertencem à coleção de microrganismos do Laboratório de Enzimas e Biomassa do Instituto de Biotecnologia da Universidade de Caxias do Sul/RS/Brasil.



Quadro 1 – Microrganismos utilizados no estudo de degradação biológica do poli(ácido láctico).

Fungo	Substrato	Local da coleta	Imagem
<i>Trametes villosa</i> (Sw.) Kreisel (82I-6)	Madeira	Pedra do Segredo/ Caçapava do Sul/ RS (outono)	
<i>Trametes</i> sp. Fr. (87I-15A)	Madeira	Pedra do Segredo/ Caçapava do Sul/ RS (outono)	
<i>Schizophyllum</i> cf. <i>commune</i> (Fr.) (85E-16)	Madeira	Tuiuti/ São Marcos/ RS (inverno)	
<i>Pycnoporus sanguineus</i> (L.) Munill (14-G)	Madeira	Fazenda dos Novilhos/ São Francisco de Paula/ RS (verão)	
<i>Lepiota</i> sp. (78I-4)	Solo	Pedra do Segredo/ Caçapava do Sul/ RS (outono)	Sem imagem
<i>Macrolepiota</i> sp. (43I-1)	Solo	Faxinal dos Pelúcios/ São Francisco de Paula/ RS (verão)	
<i>Auricularia bull.</i> Ex Juss. (551-9B)	Madeira	RPPN/ Santa Tereza/ (verão)	
<i>Aurantioporus pulcherrimus</i> (44I-A)	Madeira	Faxinal dos Pelúcios/ São Francisco de Paula/ RS (verão)	
<i>Pleurotus</i> cf. <i>pulmonarius</i> (Fr.) (40-D)	Madeira	Parque Aldeia do Imigrante/ Nova Petrópolis/ RS (inverno)	
<i>Oudemansiella</i> cf. <i>canarii</i> (Jung) (141-1A)	Madeira	Jardim Botânico/ Caxias do Sul/ RS (outono)	Sem imagem
<i>Ganoderma resinaceum</i> Boud. (69I-24)	Madeira	RPPN/ Santa Tereza/ (verão)	

O ensaio para avaliar a biodegradação foi realizado empregando o meio de cultivo formulado com 2,5% (v/v) da solução de sais minerais, 100% (v/v) de água destilada e 2% (m/v) de Agar, Figura 1 (A). A solução de sais minerais, adaptada de Mandels & Reese (1957), consiste em (g.L⁻¹): KH₂PO₄ (5), (NH₄)₂SO₄ (14), MgSO₄.7H₂O (6), CO(NH₂)₂ (6),



CaCl₂ (6), FeSO₄.7H₂O (0,1), MnSO₄.H₂O (0,0312), ZnSO₄.7H₂O (0,028), e CoCl₂.6H₂O (0,04).

Os filmes de PLA foram preparados em prensa Schulz modelo PHS 15t na temperatura de 170 °C, com pressão de 10 t, por 5 minutos, temperatura utilizada em estudos de degradação por Reddy *et al.* (2008). Os filmes foram produzidos nas dimensões: de 3 cm de largura, 3 cm de altura e 1 mm de espessura, Figura 1 (B). Em seguida os filmes poliméricos foram desinfetados, permanecendo em solução de etanol 70% (v/v), por 2 minutos. Após, os filmes foram distribuídos sobre placas esterilizadas até a completa evaporação de etanol.

Posteriormente, os filmes, das amostras poliméricas, foram dispostos sobre os meios de cultivo em placa de Petri e sobre eles foi inoculado um disco de 0,5 cm de diâmetro do isolado de cada fungo, Figura 1 (C). Estes procedimentos foram realizados em câmara de fluxo laminar Filterflux[®]. O processo foi realizado em triplicata e as placas com filme e inóculo foram incubadas em estufa Quimis[®] modelo 0315M25 a 25 °C por 14 dias.

A avaliação do processo de degradação biológica dos filmes de PLA foi identificada pela massa residual das amostras calculada pela Equação 1.

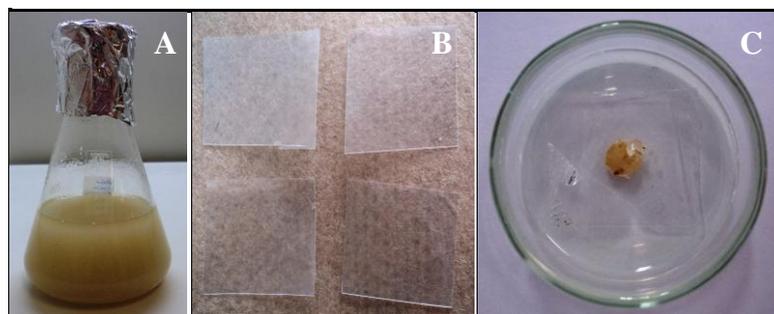
$$\text{Mr (\%)} = \frac{(\text{mf}/\text{mi}) \times 100}{\text{Equação 1}}$$

Sendo Mr a massa residual em (%), mf a massa final em (g) após 14 dias de exposição e mi a massa inicial em (g).

O crescimento de cada espécie do fungo inoculado sobre o filme polimérico foi verificado macroscopicamente e a morfologia dos filmes foi avaliada por microscopia eletrônica de varredura em um equipamento Shimadzu modelo SSX-55, com cobertura de ouro, na superfície exposta aos microrganismos na placa.

Figura 1 – Etapas do processo de degradação biológica do poli(ácido láctico).

A) Meio de cultura, B) Filme polimérico e C) Placa de Petri com PLA e inóculo fúngico.



3 Resultados e Discussão

A massa residual dos filmes poliméricos após 14 dias de exposição aos 11 isolados dos fungos é apresentada na Tabela 1. Verifica-se que durante os 14 dias de exposição constatou-se que alguns filmes de PLA apresentaram redução de massa onde foram inoculados os fungos *O. cf. canarii* (Jung), *Trametes* sp. Fr., *A. pulcherrimus* e *Macrolepiota* sp. Um aumento de massa foi observado na presença dos fungos *Auricularia bull.* Ex Juss., *P. cf. pulmonarius*, *S. cf. commune* (Fr.), *P. sanguineus* (L.) Munill e *Lepiota* sp. O aumento pode ser atribuído ao crescimento dos fungos (Figura 2), tendo restado micélio sobre o filme, mesmo após a lavagem.

Na literatura é relatado que os microrganismos bem como suas enzimas, interagem com as regiões amorfas do PLA, levando a redução da massa. Teores da ordem de 5% foram constatados para o PLA em estudos de degradação enzimática, empregando lipases, esterase, Proteinase K e proteases comerciais em 15 dias de exposição (ZENKIEWICZ *et al.*, 2013).



Tabela 1 – Massa residual em percentagem dos filmes de poli(ácido láctico) após 14 dias de exposição aos fungos. O percentual foi calculado em relação à massa inicial.

Fungo	Massa residual	Fungo	Massa residual
<i>T. villosa</i> (Sw.) Kreisel	99,3%	<i>A. bull.</i> Ex Juss.	113,8%
<i>Trametes</i> sp. Fr.	98,7%	<i>A. pulcherrimus</i>	98,8%
<i>S. cf. commune</i> (Fr.)	102,4%	<i>P. cf. pulmonarius</i> (Fr.)	101,4%
<i>P. sanguineus</i> (L.) Munill	100,9%	<i>O.cf. canarii</i> (Jungh)	97,6%
<i>Lepiota</i> sp.	116,8%	<i>G. resinaceum</i> Boud.	108,19%
<i>Macrolepiota</i> sp.	97,5%		

Figura 2 – Crescimento fúngico sobre o poli(ácido láctico): 82I-6 *T. villosa* (Sw.) Kreisel; 87I-15A *Trametes* sp.Fr.; 85E-16 *S. cf. commune* (Fr.); 14-G *P. sanguineus* (L.) Munill; 78I-4 *Lepiota* sp.; 43I-1 *Macrolepiota* sp.; 55I-9B *A. bull.* Ex Juss; 44I-A *A. pulcherrimus*; 40-D *P. cf. pulmonarius* (Fr.); 14I-1A *O. cf. canarii* (Jungh); 69I-24 *G. resinaceum* Boud.

Nas micrografias obtidas por MEV dos filmes inoculados com os fungos (Figura 3), verificou-se modificações na superfície do filme de PLA apenas na isolado de *G. resinaceum* Boud. O micélio deste fungo promoveu alterações na superfície do filme polimérico, após apenas 14 dias de exposição. Este microrganismo cresceu no meio e em parte do filme (Figura 3).

A biodegradação do PLA, dependendo das condições em que o material for submetido, ocorre entre 6 meses a 2 anos (FECHINE, 2010). Neste trabalho, verificou-se o início da degradação em apenas 14 dias de exposição, indicando a relevância do emprego do fungo *G. resinaceum* Boud para processos de biodegradação. Adicionalmente, a visualização da degradação biológica do PLA por microscopia eletrônica de varredura é clara e a identificação do potencial de degradação deste polímero pelo fungo *G. resinaceum* é inédito uma vez que não existem citações na literatura que utilizam o macrofungo *G. resinaceum* Boud, para degradação de polímeros.

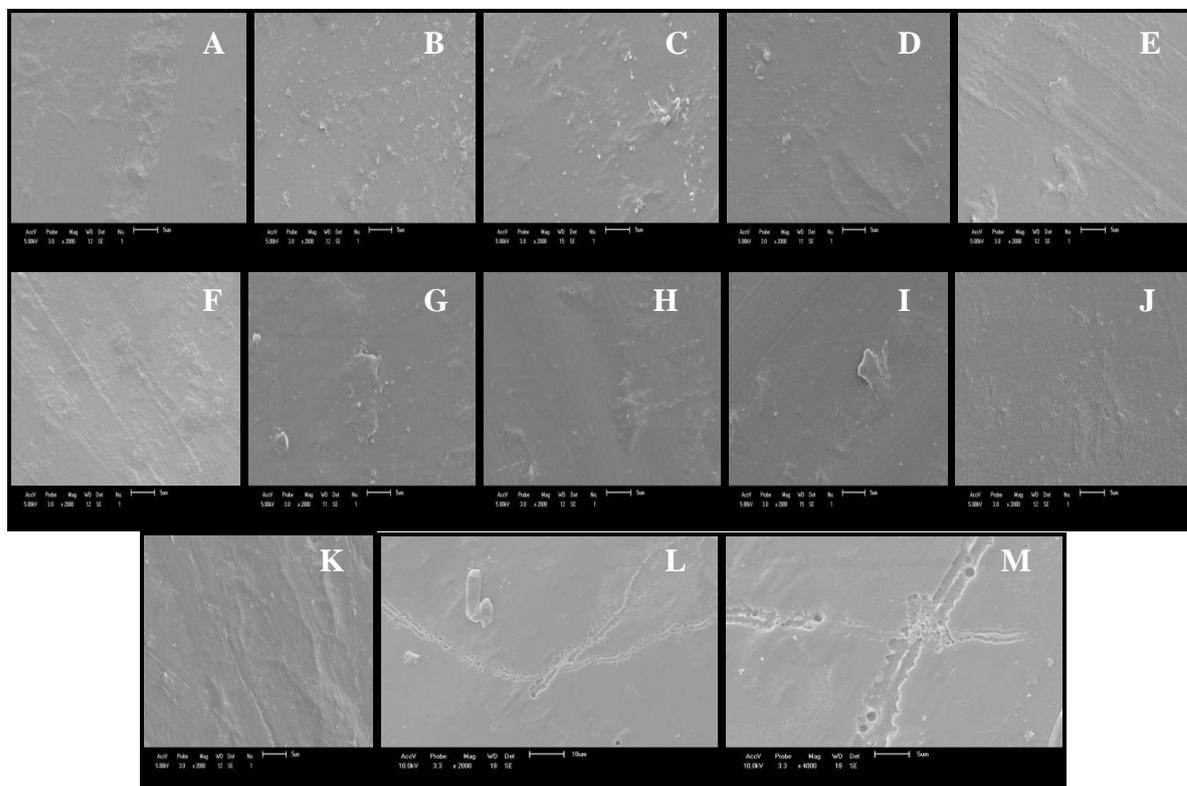


Figura 3 – Micrografias de microscopia eletrônica de varredura dos filmes de poli(ácido láctico) após 14 dias de exposição aos fungos, com magnitude original de 2000x: A) Poli(ácido láctico) puro; B) *Trametes villosa* (Sw) Kreisel; C) *Trametes* sp. Fr; D) *Auricularia bull* Ex Juss; E) *Pleurotus* cf. *pulmonarius* (Fr.);

F) *Schizophyllum* cf. *commune* (Fr); G) *Macrolepiota* sp; H) *Pycnoporus sanguineus* (L) Munill;

I) *Oudemansiella* cf. *canarii* (Jungh); J) *Aurantioporus pulcherrimus*; K) *Lepiota*; L) *Ganoderma resinaceum*

Boud. e M) *Ganoderma resinaceum* Boud. com magnitude original de 4000x.



4 Conclusão

Os dados obtidos indicam o potencial de *G. resinaceum* para o desenvolvimento de processos de biorremediação de PLA, visto que foram observadas degradações do biopolímero em apenas 14 dias de exposição ao fungo. Este tempo é bastante inferior aos tempos indicados na literatura.

Referências

ACHILIAS, D.S., ROUPAKIAS, C.P., MEGALOKONOMOS, A.A., LAPPAS, E.V., ANTONAKOU. Chemical recycling of plastic wastes made from polyethylene (LDPE and HDPE) and polypropylene (PP). **Journal of Hazardous Materials**, n.149 p.536–542, 2007.

American Standard for Testing and Methods – ASTM D883: Standard Terminology Relating to Plastics, 2012.

BÖSTMAN, O.M. Current concepts review absorbable implants for the fixation fractures. **The Journal of Bone and Joint Surgery**, n. 73, p. 148-153, 1991.

DRUMRIGHT, R.E., GRUBER, P.R., HENTON, D.E. Polylactic acid technology. **Advanced Materials**, v. 12, n. 23, p. 1841-1846, 2000.



FECHINE, G. J. M. A Era dos Polímeros Biodegradáveis. **Revista Plástico Moderno**, n. 423, p. 28-38, 2010.

FLEMMING, H.C. Relevance of biofilms for biodeterioration of surfaces of polymeric materials. **Polymer Degradation and Stability**, n. 59, p. 309-315, 1998.

FORTUNATI, E., ARMENTANO, L., LANNONIA, A., KENNY, J.M. Development and thermal behavior of ternary PLA matrix composites. **Polymer Degradation and Stability**, n.95, p.2200-2206, 2010.

LAZAREVIC, D., AOUSTINA, E., BUCLET, N., BRANDT, N. Plastic waste management in the context of a European recycling society: Comparing results and uncertainties in a life cycle perspective. **Resources, Conservation and Recycling**, n.55 p.246–259, 2010.

LUCAS, N., BIENAIME, C., BELLOY, C., QUENEUDEC, M., SILVESTRE, F., NAVASAUCCEDO, J.E. **Polymer biodegradation**: Mechanisms and estimation techniques. **Chemosphere**, v. 73, p. 429-442, 2008.

MANDELS, M., REESE, E.T. Induction of cellulase in *Trichoderma viride* as influenced by carbon source and metals. **Journal Bacteriology**, n. 73, p.269-278, 1957.

NAMPOOTHIRI, M.K., NAIR, N.R., JOHN, R.P. *An overview of the recent developments in polylactide (PLA) research*. **Bioresource Technology**, n. 101, p. 8493-8501, 2010.

QIN, L., QIU, J., LIU, M., DING, D., SHAO, L., LÜ, S., ZHANG, G., ZHAO, Y., FU, X. Mechanical and thermal properties of poly(lactic acid) composites with rice straw fiber modified by poly(butyl acrylate). **Chemical Engineering Journal**, 2010.

REDDY, N., NAMA, D., YANG, Y. Polylactic acid/polypropylene polyblend fibers for better resistance to degradation. **Polymer Degradation and Stability**, 93, p. 233-241, 2008.

SHAH, A. A., HASAN, F., HAMEED, A., AHMED, S. Biological degradation of plastics: A comprehensive review. **Biotechnology Advances**, vol. 26, p. 246-265, 2008.

ZENKIEWICZ, M., RICHERT, A., MALINOWSKI, R., MORACZEWSKI, K. A comparative analysis of mass losses of some aliphatic polyester upon enzymatic degradation. **Journal Polymer Testing**, n. 32, p. 209–214, 2013.

WILES, D.M., SCOTT, G. Polyolefins with controlled environmental degradability. **Polymer Degradation and Stability**, v.91, p.1581 -1592, 2006.

YEW, G.H., MOHD YUSOF, A.M., MOHD ISHAK, Z.A., ISHIAKU, U.S. Water absorption and enzymatic degradation of poly(lactic acid)/rice starch composites. **Polymer Degradation and Stability**, n. 90, p. 488-500, 2005.