



**INSTITUTO LATINO-AMERICANO DE
CIÊNCIAS DA VIDA E DA NATUREZA
(ILACVN)**

**CIÊNCIAS BIOLÓGICAS – ECOLOGIA E
BIODIVERSIDADE**

**ESTUDO DE MÉTODOS PARA AVALIAÇÃO DA DEGRADAÇÃO DE BISFENOL A
(BFA) POR FUNGOS FILAMENTOSOS**

LARISSA STHEFANY KAO

Foz do Iguaçu
2023



**INSTITUTO LATINO-AMERICANO DE
CIÊNCIAS DA VIDA E DA NATUREZA
(ILACVN)**

**CIÊNCIAS BIOLÓGICAS – ECOLOGIA E
BIODIVERSIDADE**

ESTUDO DE MÉTODOS PARA AVALIAÇÃO DA DEGRADAÇÃO DE BISFENOL A (BFA) POR FUNGOS FILAMENTOSOS

LARISSA STHEFANY KAO

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Instituto Latino-Americano de Ciência da Vida e da Natureza da Universidade Federal da Integração Latino-Americana, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas - Ecologia e Biodiversidade.

Orientadora: Prof. Dra. Rafaella Costa Bonugli Santos

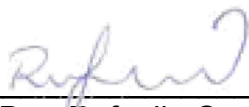
Foz do Iguaçu
2023

LARISSA STHEFANY KAO

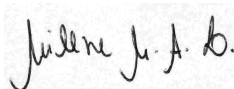
**ESTUDO DE MÉTODOS PARA AVALIAÇÃO DA DEGRADAÇÃO DE BISFENOL A
(BFA) POR FUNGOS FILAMENTOSOS**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Instituto Latino-Americano de Ciência da Vida e da Natureza da Universidade Federal da Integração Latino-Americana, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas - Ecologia e Biodiversidade.


BANCA EXAMINADORA



Orientador: Prof. Dra. Rafaella Costa Bonugli Santos
UNILA



Me. Milene Miranda Almeida Lira
UNILA

Documento assinado digitalmente
 NATHALIA CORREA CHAGAS DE SOUZA
Data: 20/06/2023 10:30:11-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Dra. Nathalia Correa Chagas De Souza
UNILA

Foz do Iguaçu, 15 de Junho de 2023.

TERMO DE SUBMISSÃO DE TRABALHOS ACADÊMICOS

Nome completo do autor(a): Larissa Sthefany Kao

Curso: Ciências Biológicas - Ecologia e Biodiversidade

Tipo de Documento

<input checked="" type="checkbox"/> graduação	<input type="checkbox"/> artigo
<input type="checkbox"/> especialização	<input checked="" type="checkbox"/> trabalho de conclusão de curso
<input type="checkbox"/> mestrado	<input type="checkbox"/> monografia
<input type="checkbox"/> doutorado	<input type="checkbox"/> dissertação
	<input type="checkbox"/> tese
	<input type="checkbox"/> CD/DVD – obras audiovisuais
	<input type="checkbox"/> _____

Título do trabalho acadêmico: ESTUDO DE MÉTODOS PARA AVALIAÇÃO DA DEGRADAÇÃO DE BISFENOL A (BFA) POR FUNGOS FILAMENTOSOS

Nome do orientador(a): Prof. Dra. Rafaella Costa Bonugli Santos

Data da Defesa: 15/06/2023

Licença não-exclusiva de Distribuição

O referido autor(a):

a) Declara que o documento entregue é seu trabalho original, e que o detém o direito de conceder os direitos contidos nesta licença. Declara também que a entrega do documento não infringe, tanto quanto lhe é possível saber, os direitos de qualquer outra pessoa ou entidade.

b) Se o documento entregue contém material do qual não detém os direitos de autor, declara que obteve autorização do detentor dos direitos de autor para conceder à UNILA – Universidade Federal da Integração Latino- Americana os direitos requeridos por esta licença, e que esse material cujos direitos são de terceiros está claramente identificado e reconhecido no texto ou conteúdo do documento entregue.

Se o documento entregue é baseado em trabalho financiado ou apoiado por outra instituição que não a Universidade Federal da Integração Latino-Americana, declara que cumpriu quaisquer obrigações exigidas pelo respectivo contrato ou acordo.

Na qualidade de titular dos direitos do conteúdo supracitado, o autor autoriza a Biblioteca Latino- Americana – BIUNILA a disponibilizar a obra, gratuitamente e de acordo com a licença pública Creative Commons **Licença 3.0 Unported**.

Foz do Iguaçu, 15 de Junho de 2023

 Larissa Kao
Assinatura do Responsável

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, expresso a minha mais profunda gratidão pelo papel fundamental da minha orientadora, Prof. Rafaella Costa Bonugli Santos, o seu apoio incondicional e constante durante todo o processo de desenvolvimento do trabalho foram inestimáveis. Sua disponibilidade para responder minhas dúvidas e fornecer orientação, permitiu avançar de forma segura e confiante. Além disso, o seu papel como orientadora foi além da importância acadêmica, tornando-se um verdadeiro exemplo a ser seguido na formação científica.

Agradeço a todos os docentes que lecionaram e compartilharam os seus conhecimentos e experiências ao longo da graduação, suas aulas enriquecedoras proporcionaram um aprendizado significativo em suas respectivas áreas. Principalmente aos professores Cleto Kaveski Peres, Elaine Della Giustina Soares e Fernando Cesar Vieira Zanella, por serem grandes inspirações no meu primeiro ano de curso, e por sempre oferecer apoio e orientação.

Agradeço à minha família que, desde o início, me incentivou a perseguir meus interesses, e escolher a biologia foi um reflexo direto desse apoio. Agradeço por estarem sempre ao meu lado, oferecendo suporte e ajudando a conciliar os estudos com outras responsabilidades, proporcionando um ambiente propício ao aprendizado em casa.

Agradeço aos integrantes do DELABEN, um local onde tive a oportunidade de realizar meu estágio e aprender diversos conhecimentos práticos. Neste ambiente, tive a chance de conhecer pessoas incríveis, cujo apoio e a orientação ultrapassaram os limites do estágio, mesmo após concluir minhas atividades.

Agradeço meus amigos que fiz durante a graduação. Conhecer pessoas de diferentes turmas e cursos enriqueceu minha experiência acadêmica e proporcionou uma rede de apoio essencial. Cada um de vocês contribuiu para momentos agradáveis e conversas significativas que tornaram os momentos estressantes mais leves. Sou grata pela amizade, companheirismo e pelos laços que construímos ao longo desses anos. Vocês foram verdadeiros aliados na minha jornada e levarei cada memória compartilhada em meu coração. Obrigada Barbara, Lauren, Eduardo,

Vanessa, Gabriela Morais, Allan, Eric, Felipe, Vinicius, Douglas, Alejandra, Valeria, Heloisa, Laura, Arthur, Irene, Lina e Alberto.

Expresso meu profundo agradecimento à Gabriela Alves, uma amiga muito importante que fiz nos últimos períodos da universidade. Fico extremamente feliz por ter participado de momentos significativos em sua graduação e sempre guardarei com carinho a lembrança do dia em que decidimos unir o nosso encorajamento para finalizar o curso da melhor forma possível. Sua amizade e apoio foram fundamentais para enfrentarmos juntos os desafios acadêmicos, e estou grata por termos compartilhado essa jornada inesquecível.

Também gostaria de expressar minha gratidão à Antonella, uma amiga incrível e parceira de campo. Sua constante disposição e parceria em trabalhos foi fundamental. Além disso, agradeço por sempre cuidar de mim, demonstrando preocupação e apoio em todos os momentos. Por último, agradeço à minha amiga de longa data, Yohanna, sempre oferecendo palavras inspiradoras nos momentos em que me sentia desanimada. Sua presença constante em todas as fases da minha vida é algo que valorizo imensamente.

“Não devemos confiar em nada além de fatos: estes são apresentados a nós pela Natureza e não podem enganar. Devemos, em todos os casos, submeter nosso raciocínio ao teste do experimento, e nunca buscar a verdade, mas sim o caminho natural do experimento e da observação.”

Antoine-Laurent Lavoisier

KAO, Larissa Sthefany. **ESTUDO DE MÉTODOS PARA AVALIAÇÃO DA DEGRADAÇÃO DE BISFENOL A (BFA) POR FUNGOS FILAMENTOSOS**. 2023. 65 p. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharel em Ciências Biológicas - Ecologia e Biodiversidade) – Universidade Federal da Integração LatinoAmericana, Foz do Iguaçu, 2023.

RESUMO

O plástico é um material versátil que tem sido utilizado na produção de diferentes produtos, desde utensílios domésticos, até componentes industriais. Porém, as consequências desta utilização é o intenso descarte gerado após seu uso. O Bisfenol A (BFA) é um componente presente em diversos plásticos por conta de sua aplicabilidade e baixo valor, contudo, também é notável pelos seus efeitos tóxicos causados ao meio ambiente e aos organismos. Como uma alternativa para degradação e remoção do BFA, a biorremediação utilizando fungos se mostra uma estratégia promissora. Contudo, para avaliar a biodegradação são usadas atualmente metodologias que demandam equipamentos especializados, dificultando a eficiência na triagem microbiana. Assim, o presente estudo avaliou dois métodos para detecção de BFA, a partir de processos de desintoxicação e degradação através dos cultivos das linhagens fúngicas *Bjerkandera* sp. CCMIBA_R111, *Aspergillus* sp. CCMIBA_R056, *Trametes* sp. CCMIBA_2AQ e *Penicillium* sp. CCMIBA_2G pertencentes à Coleção de Cultura de Micro-organismos de Importância Biotecnológica e Ambiental (CCMIBA), na presença de 10 mg/L de BFA. Ao fim do cultivo, os sobrenadantes foram separados para ensaios de fitotoxicidade com *Cucumis sativus*, avaliação da atividade da enzima lacase e a avaliação espectrofotométrica de detecção de BFA. No ensaio de fitotoxicidade, a germinação (em cm) das sementes de *C. sativus* cultivadas nos sobrenadantes dos tratamentos fúngicos foi utilizada para o cálculo da porcentagem de inibição (toxicidade). No meio de cultivo dos basidiomicetos, houve germinação das sementes no controle negativo (apenas com BFA), indicando algum efeito sinérgico independente da biodegradação que diminuiu a toxicidade. Por outro lado, em todos os ensaios (incluindo o controle negativo) dos ascomicetos *Aspergillus* sp. CCMIBA_R056 e *Penicillium* sp. CCMIBA_2G houve inibição total na germinação. Para *Bjerkandera* sp. CCMIBA_R111 e *Trametes* sp. CCMIBA_2AQ houve germinação das sementes, porém ainda com toxicidade alta, que poderia ser ocasionada pelos próprios metabólitos secundários dos fungos basidiomicetos. Ademais, registrou-se uma variabilidade nos valores de germinação, mesmo no ensaio controle (com água) indicando a necessidade de um bioindicador alternativo com sensibilidade conhecida e maior reprodutibilidade. A avaliação da lacase demonstrou a ausência enzimática em todos os fungos, a lacase é umas das principais enzimas reportadas para degradação do BFA, indicando assim, a possibilidade de outra rota de degradação pelos fungos estudados. Por fim, os perfis espectrofotométricos obtidos mostraram redução dos picos de BFA em fungos basidiomicetos, ou seja, possivelmente degradação da molécula e corroborando com os resultados da fitotoxicidade. Deste modo, *Bjerkandera* sp. CCMIBA_R111 e *Trametes* sp. CCMIBA_2AQ apresentaram potencial para biorremediação de BFA e serão avaliados em novos estudos. Concluímos que o uso de um método de toxicidade, diferente de *C. sativus*, é necessário para fortalecer os resultados do perfil espectrométrico, e essa pode ser uma estratégia interessante para a triagem de fungos que possam contribuir na biorremediação do BFA.

Palavras-chave: microplásticos, biorremediação, enzimas, toxicidade, basidiomicetos.

KAO, Larissa Sthefany. **ESTUDO DE MÉTODOS PARA AVALIAÇÃO DA DEGRADAÇÃO DE BISFENOL A (BFA) POR FUNGOS FILAMENTOSOS**. 2023. 65 p. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharel em Ciências Biológicas - Ecologia e Biodiversidade) – Universidade Federal da Integração LatinoAmericana, Foz do Iguaçu, 2023.

ABSTRACT

Plastic is a versatile material that has been used in the production of different products, from household utensils to industrial components. However, the consequences of this usage are the intense waste generated after its use. Bisphenol A (BPA) is a component present in various plastics due to its applicability and low cost; however, it is also notable for its toxic effects on the environment and organisms. Bioremediation using fungi proves to be a promising strategy as an alternative for the degradation and removal of BPA. However, to assess biodegradation, methodologies that currently require specialized equipment are used, hindering efficiency in microbial screening. The present study evaluated two methods for BFA detection, based on detoxification and degradation through processes of the cultivations of fungal strains *Bjerkandera* sp. CCMIBA_R111, *Aspergillus* sp. CCMIBA_R056, *Trametes* sp. CCMIBA_2AQ, and *Penicillium* sp. CCMIBA_2G belonging to the Collection of Microorganisms of Biotechnological and Environmental Importance (CCMIBA), in the presence of 10 mg/L of BFA. At the end of cultivation, the supernatants were separated for phytotoxicity assays with *Cucumis sativus*, evaluation of laccase enzyme activity, and spectrophotometric evaluation of BFA detection. In the phytotoxicity assay, the germination (in cm) of *C. sativus* seeds cultivated in the supernatants of fungal treatments was used to calculate the percentage of inhibition (toxicity). In the basidiomycete cultivation medium, seed germination occurred in the negative control (BFA only), indicating some independent synergistic effect that reduced toxicity despite biodegradation. On the other hand, in all assays (including the negative control) of the ascomycetes *Aspergillus* sp. CCMIBA_R056 and *Penicillium* sp. CCMIBA_2G, there was a total inhibition of germination. For *Bjerkandera* sp. CCMIBA_R111 and *Trametes* sp. CCMIBA_2AQ, seed germination occurred, but still with high toxicity, which could be caused by the secondary metabolites produced by the basidiomycete fungi themselves. Furthermore, there was variability in the germination values, even in the control assay (with water), indicating the need for an alternative bioindicator with known sensitivity and greater reproducibility. The evaluation of laccase showed the absence of enzymatic activity in all fungi. Laccase is one of the main enzymes reported for BFA degradation, suggesting the possibility of another degradation pathway by the studied fungi. In this way, *Bjerkandera* sp. CCMIBA_R111 and *Trametes* sp. CCMIBA_2AQ demonstrated potential for BFA bioremediation and will be further evaluated in future studies. We conclude that the use of a toxicity method different from *C. sativus* is necessary to strengthen the results of the spectrometric profile, and this can be an interesting strategy for screening fungi that may contribute to BFA bioremediation.

Keywords: microplastics, bioremediation, enzymes, toxicity, basidiomycetes.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Polímeros plásticos constituídos por monômeros	16
Figura 2 - Categorização dos plásticos e a estrutura química dos polímeros	18
Figura 3 - Classificação do tamanho das partículas plásticas	19
Figura 4 - Estrutura molecular do bisfenol A (BFA)	22
Figura 5 - Reação da síntese do bisfenol A	22
Figura 6 - Vias metabólicas de degradação do BFA por fungos ligninolíticos	27
Figura 7 - Rota metabólica de metabolismo do BFA por <i>P. sordida</i> YK-624	28
Figura 8 - Vias metabólicas de degradação do BFA por fungos não ligninolíticos	30
Figura 9 - Possível via de degradação do BFA por <i>A. terreus</i> e <i>A. flavus</i>	31
Figura 10 - Organograma de metodologias realizadas para avaliar a degradação de BFA por fungos filamentosos	36
Figura 11 - Linhagens fúngicas selecionadas (A) <i>Bjerkandera</i> sp. CCMIBA_R111, (B) <i>Aspergillus</i> sp. CCMIBA_R056, (C) <i>Trametes</i> sp. CCMIBA_2AQ e (D) <i>Penicillium</i> sp. CCMIBA_2G.	38
Figura 12 - Espectro de absorção do BFA na suspensão estoque de 1 g/L BFA preparado com água e 5,4 % de etanol absoluto. A região circulada indica o pico de absorção a 211 nm.	45
Figura 13 - Espectro de absorção do tratamento fúngico <i>Bjerkandera</i> sp. CCMIBA_R111 e controle negativo. Pico em 212 nm indicado pela seta.	46
Figura 14 - Espectro de absorção do tratamento fúngico <i>Trametes</i> sp. CCMIBA_2AQ e controle negativo. A seta indica o pico de absorção a 214 nm.	46
Figura 15 - Espectro de absorção do tratamento fúngico <i>Aspergillus</i> sp. CCMIBA_R56 e controle negativo. Pico em 214 nm indicado pela seta.	47
Figura 16 - Espectro de absorção do tratamento fúngico <i>Penicillium</i> sp. CCMIBA_2G e controle negativo. A seta indica o pico de absorção a 214 nm.	48

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Média e desvio-padrão do comprimento (cm) das radículas nos ensaios após o tempo de incubação das sementes de *C. sativus* com os tratamentos fúngicos **43**

Tabela 2 - Percentual de inibição (%) de germinação das sementes de *C. sativus* dos ensaios após período de incubação das sementes de *C. sativus* com os tratamentos fúngicos **43**

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
2.1. MICROPLÁSTICOS	16
2.2. IMPACTO AMBIENTAL	19
2.3. BISFENOL A (BFA)	21
2.4. BIORREMEDIAÇÃO DO BFA	24
2.5. FUNGOS LIGNINOLÍTICOS	25
2.6. FUNGOS NÃO LIGNINOLÍTICOS	28
2.7 DIFICULDADE PARA TRIAGEM DE FUNGOS COM POTENCIAL PARA BIORREMEDIAÇÃO DO BFA	31
3. OBJETIVO	35
3.1. OBJETIVOS GERAIS	35
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	35
4. MATERIAIS E MÉTODOS	36
4.1. PREPARO DO SUSPENSÃO DE BISFENOL A	36
4.2. ANÁLISE DE FITOTOXICIDADE COM CUCUMIS SATIVUS	37
4.2.1. TRATAMENTO PARA A EXPOSIÇÃO DAS SEMENTES	37
4.2.2. AVALIAÇÃO DA GERMINAÇÃO DAS SEMENTES	37
4.3. SELEÇÃO E REATIVAÇÃO DOS FUNGOS	38
4.4. CULTIVO DO FUNGO NA PRESENÇA DE BFA	38
4.5. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DA LACASE	39
4.6. DETECÇÃO DE BFA POR ESPECTROFOTOMETRIA	41
5. RESULTADOS	42
5.1. CONCENTRAÇÃO E TOXICIDADE DO BFA	42
5.2. ANÁLISE DE FITOTOXICIDADE COM CUCUMIS SATIVUS	42
5.3. ATIVIDADE DA LACASE	44
5.4. AVALIAÇÃO ESPECTROFOTOMÉTRICA PARA DETECÇÃO DE BFA	44
6. DISCUSSÃO	49

7. CONCLUSÃO	54
8. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA	55
APÊNDICES	62
APÊNDICE A - ENSAIO DE FITOTOXICIDADE PARA DETERMINAÇÃO DE CONCENTRAÇÃO DE BFA	63
APÊNDICE B - ENSAIO DE FITOTOXICIDADE COM CCMIBA_R111	64
APÊNDICE C - ENSAIO DE FITOTOXICIDADE COM CCMIBA_R056	65
APÊNDICE D - ENSAIO DE FITOTOXICIDADE COM CCMIBA_2AQ	66
APÊNDICE E - ENSAIO DE FITOTOXICIDADE COM CCMIBA_2G	67

1. INTRODUÇÃO

Em meio ao constante crescimento populacional e desenvolvimento urbano, o consumo de industrializados se tornou cada vez mais frequente, esses produtos demandam um uso elevado de plásticos. O motivo se deve à versatilidade deste material, a sua grande variedade de composições e o baixo valor de custo que permite a utilização em diversos âmbitos, como na produção de embalagens, setores agrícolas, suprimentos domésticos e outros. Entretanto, juntamente ao crescimento da produção de plásticos também ocorre o aumento de geração e acúmulo de descartes. Outra questão é a baixa degradabilidade dos plásticos, que no ambiente sofrem efeitos físicos e químicos, resultando somente na fragmentação em tamanhos menores, como os microplásticos.

Esses microplásticos possibilitam o aumento da exposição de substâncias químicas no ambiente, especialmente os aditivos químicos usados na fabricação. A liberação no ambiente pode acontecer de forma proposital ou não, desde o uso na indústria ou deterioração dos plásticos maiores em tamanhos menores, respectivamente. A partir disso, essas partículas apresentam grandes chances de vazamento nos ecossistemas por meio de setores agrícolas, indústria têxtil e esgoto doméstico. Seus impactos podem ser observados pela capacidade de acumulação no meio ambiente, causando implicações na saúde de diversos organismos. Dentre os mais notáveis compostos, o bisfenol A (BFA), um dos componentes de diversos plásticos, é conhecido por sua aplicabilidade na indústria de plásticos e seus efeitos tóxicos no meio ambiente e em diferentes organismos.

Com o cenário crescente de quantidade de microplásticos, é necessário analisar as possibilidades existentes para contornar as problemáticas expostas acima. Em vista disso, a biorremediação torna-se uma alternativa promissora por conta de seu baixo custo e a capacidade de remover poluentes. Esse processo envolve a utilização de organismos vivos para remover ou reduzir poluentes de um ambiente.

O uso de fungo se mostra promissor para remediação de ambientes contendo plásticos, visto que possui uma alta capacidade de adaptação em meios contaminados por compostos tóxicos, um sistema enzimático extracelular eficiente e outras características vantajosas. Dentre aqueles importantes para a remoção e

degradação do BFA, destacam-se os fungos ligninolíticos e fungos não ligninolíticos. O processo pode ocorrer de forma direta, através do cultivo de fungos ligninolíticos na presença de BFA, ou pela aplicação de enzimas extracelulares ligninolíticas purificadas. Enquanto, fungos não ligninolíticos atuam pelo processo de biodegradação por rotas intracelulares.

Contudo, um dos desafios que existe na triagem de fungos, que exibem potencial para a biorremediação do BFA, são as limitações nos métodos aplicados para a detecção do BFA, que não permitem um estudo de alta eficiência na seleção microbiana. Entre os métodos de detecção amplamente utilizados, destacam-se a Cromatografia Líquida de alta eficiência (HPLC), Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS), Eletroforese Capilar (CE), imunoenaios e o uso de sensores. Deste modo, para avaliar o potencial de biodegradação tanto dos fungos ligninolíticos quanto dos fungos não ligninolíticos, torna-se imprescindível a utilização de métodos alternativos, rápidos e de fácil aplicabilidade, capazes de verificar a degradação ou detoxificação do BFA por esses microrganismos.

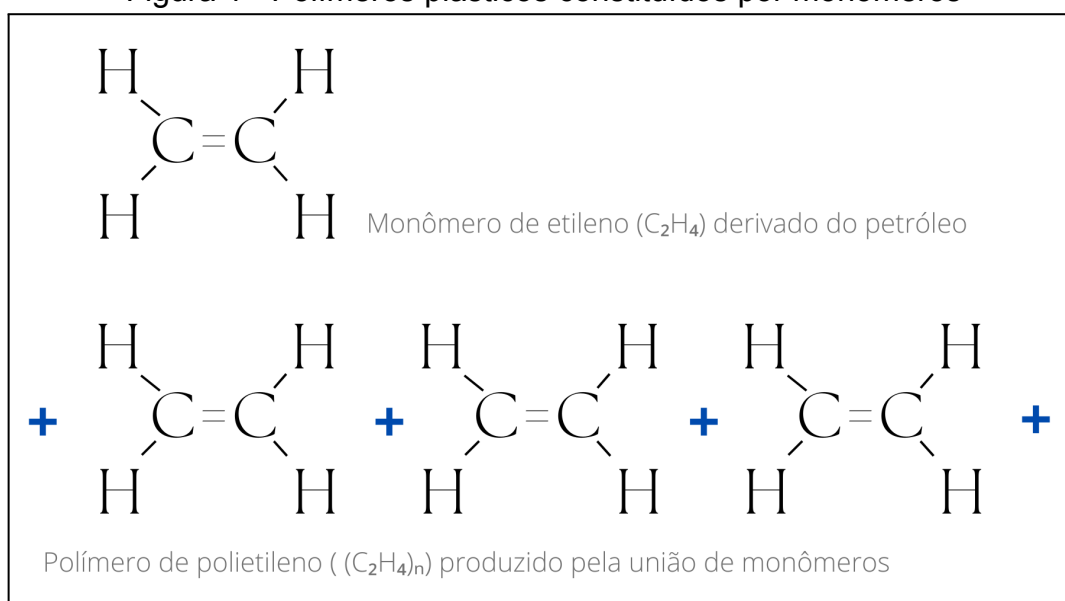
Portanto, o presente projeto teve como finalidade avaliar métodos alternativos de detecção de BFA, a partir de processos de desintoxicação e perfil de degradação por métodos espectrofotométricos UV-Vis de cultivos de fungos ligninolíticos e não ligninolíticos da Coleção de Cultura de Micro-organismos de Importância Biotecnológica e Ambiental (CCMIBA) da Universidade Federal da Integração LatinoAmericana (UNILA).

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. MICROPLÁSTICOS

Os plásticos são polímeros sintéticos formados por segmentos de monômeros (Figura 1) que são usualmente oriundos de petróleo e gás natural. Esses dois componentes passam pelo processo de refinamento, formando etano e propano que são separados e purificados para serem aquecidos em uma mistura de vapor que produz etileno, propileno, hidrogênio e outros subprodutos. O etileno ou propileno são combinados com um catalisador em um reator, gerando polímeros que são misturados com aditivos. Em seguida, o polímero é alimentado e fundido em uma extrusora (equipamento que força o material através de uma matriz adquirindo assim a forma pré-determinada pela forma da matriz projetada para a peça) que produz o plástico (SHAW; SAHNI, 2014)

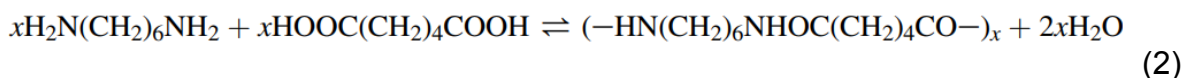
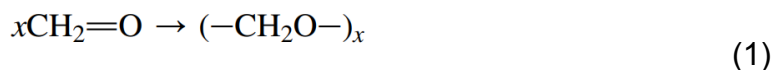
Figura 1 - Polímeros plásticos constituídos por monômeros



Fonte: AUTORA (2023)

Os polímeros se estruturam de forma linear, ramificada, reticulada ou de rede, e essa polimerização pode ocorrer por reação em cadeia, em que uma molécula simples de baixa massa molar possuindo uma ligação dupla ($C=C$), isto é, o monômero, reage com um iniciador ou cadeia polimérica já em crescimento quebrando a ligação dupla, deixando uma valência livre para reação adicional com outros monômeros (equação 1) (EDMONDSON; GILBERT, 2017). Outra maneira é a








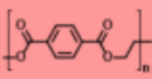
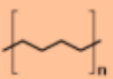
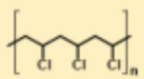
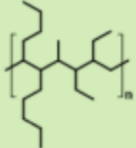

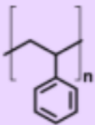
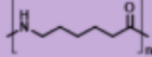
polimerização por reação em etapas, na qual envolve a reação de pares de grupos funcionais nos monômeros e a eliminação de uma molécula de água (equação 2) (EDMONDSON; GILBERT, 2017).



Na sociedade moderna, o uso do plástico tornou-se inevitável por conta de sua ampla forma de aplicação, baixo custo, versatilidade e sua característica de durabilidade. Por conta da composição à base de petróleo, os plásticos não se quebram naturalmente devido à sua profunda estabilidade, contudo, podem se fragmentar em segmentos menores (SUMAN *et al.*, 2020). Esse material serve de constituinte para diversos produtos que são utilizados nos setores do cotidiano humano, os quais englobam as embalagens, engenharia e construção, eletrônica, setores agrícolas, saúde, suprimentos domésticos, e entre outros usos (GIRI; MUKHERJEE, 2022).

A variedade de materiais plásticos está relacionada com os diferentes arranjos estruturais químicos, para isso sua fabricação exige o uso de aditivos que são poluentes para o ambiente, como plastificantes, estabilizadores e corantes. Os principais plásticos confeccionados e utilizados são polietileno de baixa densidade (PEBD), polietileno de baixa densidade linear (PEBDL), polietileno de alta densidade (PEAD), poliestireno (PS), polipropileno (PP), poli(cloreto de vinila) (PVC), poli(tereftalato de etileno) (PET) e policarbonato (PC). Um dos efeitos dessa intensa produção e consumo é o descarte posterior em grandes proporções, gerando grandes quantidades de detritos por falta de conscientização e a inabitual prática de reciclagem (SÁNCHEZ, 2020). Usualmente, os tipos plásticos são classificados em sete categorias (figura 2) com base na temperatura em que o material foi aquecido, de acordo com os *Resin Identification Codes* (RICs) (The Green Chemistry Initiatives Blog, 2019).

Figura 2 - Categorização dos plásticos e a estrutura química dos polímeros

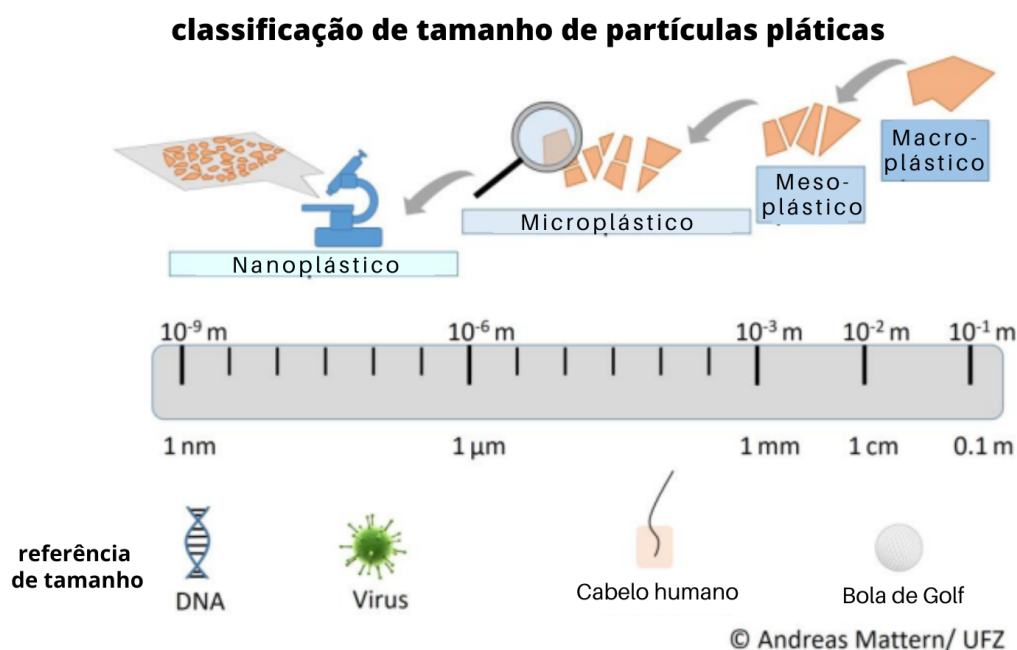
						
PET	PE-HD	PVC	PE-LD	PP	PS	O
Politereftalato de etileno (PET, PETE)	Polietileno de alta densidade (PEAD)	Policloreto de vinila (PVC)	Polietileno de baixa densidade (LDPE)	Polipropileno (PP)	Poliestireno (PS)	Outros (O)- incluindo plásticos diversos (ex.: nylon não reciclável e bioplásticos)
						

Fonte: Adaptado de The Green Chemistry Initiatives Blog (2019)

Em razão da baixa degradabilidade deste polímero sintético, a prolongada persistência no ambiente leva ao processo de envelhecimento pelas ações físicas e químicas. A fragmentação desses polímeros decorre pela exposição prolongada à radiação ultravioleta (UV) que gera rupturas de ligações pela foto-oxidação, e em ambientes aquáticos, por ação de ondas e abrasão física por sedimentos naturais (ALONSO, 2014; BARNES *et al.*, 2009).

Nesse processo, os plásticos maiores se fragmentam em tamanhos menores, como os microplásticos (menores que 5 mm) e nanoplásticos (menores que 100 nm) (figura 3) (GIRI; MUKHERJEE, 2022). Comumente, os microplásticos se referem a uma ampla gama de polímeros, tamanhos e densidades, mas são usualmente definidos como aquelas partículas que apresentam dimensões de 5 mm ou menos. Existem duas formas de classificar essas partículas, os microplásticos primários, os quais são especificamente fabricados em uma faixa de tamanho de micrômetro, em geral, está voltado para jateamento de areia ou produtos de higiene pessoal. A segunda forma são os microplásticos secundários, os quais são formados pela fragmentação de lixos mesoplásticos e macropásticos (HORTON *et al.*, 2017).

Figura 3 - Classificação do tamanho das partículas plásticas



Fonte: Adaptado de Andreas Mattern, [s.d]

Os microplásticos são potenciais vetores de exposição e transferências de compostos orgânicos tóxicos. A origem acontece de duas formas, a primária, que ocorre de maneira proposital por ação antrópica e por uso na indústria, e a secundária, que se origina de maneira não intencional pela deterioração dos plásticos maiores no ambiente. A presença destas partículas é detectada em vários ambientes, como água marinha; água doce; solo; comida e água potável distribuída pelas redes de abastecimento (BITENCOURT BELO *et al.*, 2021).

2.2. IMPACTO AMBIENTAL

A contaminação por microplásticos no ambiente acontece quando os sistemas de águas residuais não retêm as pequenas partículas nas telas de tratamento preliminar nas estações de tratamento de águas residuais (FENDALL; SEWELL, 2009). Desta forma, uma certa quantidade de partículas que contornam o sistema de filtragem acessa o ambiente de água doce por meio de efluente, aumentando o potencial generalizado de vazamento nos ecossistemas (HORTON *et al.*, 2017).

As fontes contaminadas por microplásticos incluem o uso de água residuais tratadas para a irrigação, setores agrícolas, indústria têxtil e despejo de esgoto

doméstico, nas quais liberam partículas de materiais plásticos presentes em produtos de limpeza, fibras de polímeros de tecidos sintéticos e outros (GIRI; MUKHERJEE, 2022). Vale destacar que a ausência de um planejamento ambiental acurado contribui para que os ambientes recebam uma grande carga de poluentes proveniente dos meios urbanizados e industrializados (ALONSO, 2014).

A maior preocupação e ameaça à saúde ambiental está relacionada ao alto caráter recalcitrante e a capacidade dos plásticos em adsorver e acumular poluentes orgânicos persistentes (POPs). Esse potencial contaminante se deve à hidrofobicidade, lipofilicidade e a alta relação superfície-volume das MPs que permite que os POPs sejam sorvidos em fases apolares pelas partículas (RODRIGUES *et al.*, 2019). Além disso, os impactos também são presenciados em humanos, visto que os plásticos liberam metais tóxicos que acarretam danos no sistema nervoso central e periférico, neural e respiratório (MOHAN *et al.*, 2016)

Essas pequenas partículas possuem como característica uma baixa velocidade de sedimentação, e acoplado à resistência de degradação, suas partículas podem se dispersar por longas distâncias em cursos d'água (LANG, 2022). Em ambientes marinhos, os plásticos são comumente os poluentes que mais afetam os integrantes da fauna e da teia alimentar, como tartarugas, mamíferos, organismos bentônicos e aves, os quais são perturbados com os materiais sobrenadantes e contaminados por meio da ingestão dos fragmentos, impedindo a realização de atividade básicas para a sobrevivência do organismo, como se alimentar, ou pelo acúmulo do poluente levando a morte (ALONSO, 2014)

Essa capacidade de bioacumular resulta em biomagnificação ao longo dos níveis tróficos (BITENCOURT BELO *et al.*, 2021). Isso representa riscos toxicológicos e uma grande preocupação, uma vez que estudos evidenciam a detecção de variadas partículas nos intestinos e estômagos de vários organismos, desde marisco até em mamíferos marinhos (AKDOGAN; GUVEN, 2019). O microplástico ingerido também pode por meio da translocação ser transferido do revestimento epitelial do intestino para os demais tecidos do corpo (BROWNE *et al.*, 2008).

Linhas de evidências indicam que os sistemas terrestres fazem parte dos principais sumidouros de microplástico, e a partir desta ampla distribuição e alta

abundância de polímeros, existem potenciais ameaças de alterações das propriedades físicas e químicas do solo. Os riscos envolvem a capacidade de reter água e distribuição de agregados estáveis à água (BAHO; BUNDSCHUH; FUTTER, 2021). Zhang *et al.* (2019) verificaram que solos contaminados por microfibras de poliéster apresentaram alteração na distribuição do tamanho dos poros em solo argiloso, o que reduz a estabilidade dos agregados e degrada a estrutura do solo. Ademais, a presença de microplásticos gera mudanças nas associações simbióticas de micorrizas, e impactos adversos nos organismos e plantas no solo (WANG *et al.*, 2020).

Em diferentes estudos, a presença de microplásticos foi capaz de desencadear distintos efeitos em diferentes órgãos vegetais. Qi *et al.* (2018) avaliaram o efeito dos tamanhos de resíduos plásticos de polietileno no crescimento vegetativo e reprodutivo de *Triticum aestivum* (trigo), os resultados mostraram que os microplásticos influenciam de forma mais negativa em relação aos macropolásticos, a explicação foi atribuída a presença de resíduos plásticos que alteraram a propriedade do solo. Os microplásticos são absorvidos e translocados para diferentes órgãos por meio do xilema durante a transpiração, e geralmente o maior acúmulo de polímeros pode acontecer em altas temperaturas e baixa umidade (LI *et al.*, 2020).

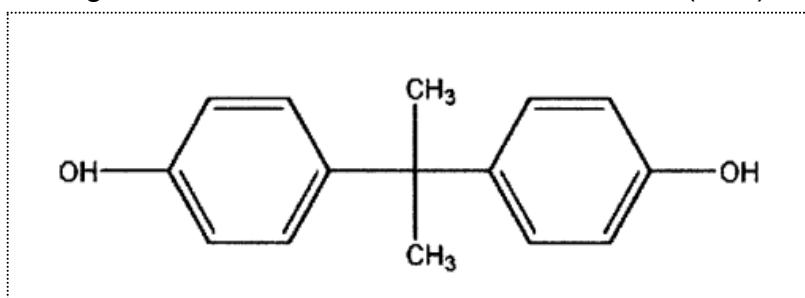
A maioria das pesquisas desenvolvidas se concentrou na toxicidade de microplásticos em organismos aquáticos, contudo, trabalhos que buscaram verificar os efeitos em organismos terrestres mostraram que a exposição à essas partículas resultaram em citotoxicidade, genotoxicidade, neurotoxicidade e toxicidade reprodutiva. Uma avaliação feita com o nematoide *Caenorhabditis elegans* revelou que a exposição à microplásticos de poliestireno resultou em efeitos fisiológicos adversos no desenvolvimento, comportamento de locomoção, estresse oxidativo e lesão intestinal (YU *et al.*, 2020).

2.3. BISFENOL A (BFA)

O Bisfenol A ou BFA, é um composto químico sintético 2,2-(4,4'-dihidroxidifenil) propano (figura 4) do grupo dos policarbonatos, geralmente presente na a produção de certos tipos de plásticos, como o policarbonato e a resina epóxi. A estrutura compreende dois anéis benzênicos e dois substituintes (4,4) -OH

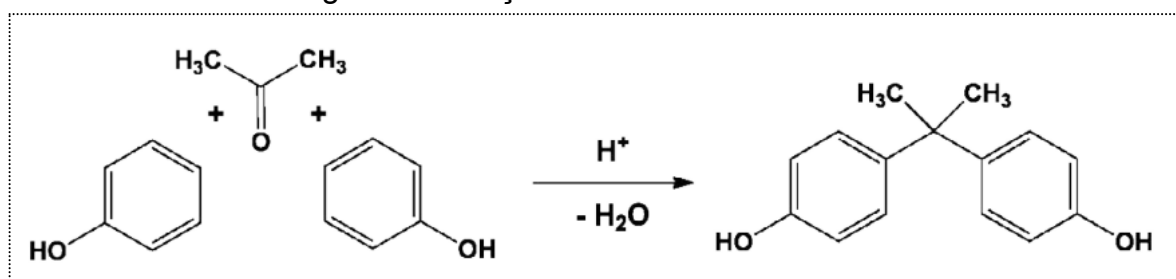
(VANDENBERG *et al.*, 2009). Usualmente, sua produção envolve a condensação de fenol com acetona sob condições de baixo pH e alta temperatura, na presença de catalisadores (figura 5) (DAVIES, 2011).

Figura 4 - Estrutura molecular do bisfenol A (BFA)



Fonte: Davies (2011)

Figura 5 - Reação da síntese do bisfenol A



Fonte: Cardoso (2019)

Em condições ambientais, o BFA se encontra em um formato sólido branco como cristais, grânulos ou flocos. As suas propriedades físicas o tornam um composto relativamente hidrofóbico, a sua solubilidade fica entre 120-300 mg/L em água. Por conta de dois grupos OH na estrutura química, este apresenta também duas constantes de dissociação, pKa 9,59 e 11,30, logo, a solubilidade em água pode ser mais bem observada em pH alcalino (DAVIES, 2011). Os tamanhos das partículas de BFA variaram principalmente de 2,10 a 7,0 μm (CHUNG *et al.*, 2017), sendo sozinho, caracterizado como um microplástico, conforme a figura 3.

O BFA apresenta a função de ligação, plastificação e endurecimento em produtos plásticos, mas sua principal função está na produção de resina de policarbonato, resina epóxi, poliéster insaturado, dentre outros (KLEČKA *et al.*, 2001). O composto tem sido aplicado também como intermediário de determinados produtos como retardadores de chama, materiais de construção, lentes ópticas,

revestimentos dentários, encapsulamento de peças elétricas, eletrônicas e outros (DAVIES, 2011).

A aplicabilidade e o baixo valor do BFA estão ligados à sua intensa sintetização pelas indústrias, entretanto, problemas ambientais podem ser causados ao longo da cadeia de produção, onde acontece a liberação no meio ambiente em instalações de tratamento de águas residuais industriais ou públicas que recebem BFA. Outros ambientes que também podem ser atingidos são o solo, as águas superficiais, bem como o ar. É importante ressaltar que, ao considerar as propriedades físicas do BFA entende-se por que possuem a capacidade viável de permanecer no meio aquoso (DAVIES, 2011; KLEČKA *et al.*, 2001).

A exposição humana ao BFA pode acontecer por meio da contaminação do ambiente, ou pelo uso de produtos que contêm BFA em sua fabricação, como revestimento de latas de metal, recipientes de bebidas e de armazenamento produzidos por policarbonato (DAVIES, 2011). Estudos indicam que o BFA gera riscos à saúde humana pelos efeitos adversos sobre a fertilidade, sistema nervoso, puberdade precoce, dentre outros (BESERRA; SCHIAVINI; RODRIGUES, 2012). Em mulheres grávidas, o BFA pode atravessar a barreira placentária materno-fetal, sendo associado a casos de hiperplasia endometrial, ocorrência de abortos, esterilidade e outras complicações (DAVIES, 2011). Outra preocupação conhecida é a capacidade que o BFA possui em agir como um desregulador endócrino uma vez que possui uma composição química semelhante ao hormônio estrogênio. Portanto, consequências negativas podem ser ocasionadas tanto na saúde humana quanto na vida selvagem, assim propiciando um desequilíbrio dos ecossistemas (IKE *et al.*, 2002; LI; ZHOU; CAI, 2007).

O BFA em solo pode ser lixiviado, adsorvido e absorvido, propiciando a concentração em diferentes matrizes ambientais e bioacumular em diferentes organismos, desde produtores até nos organismos de topo da cadeia trófica (TORRES-GARCÍA *et al.*, 2021). Um exemplo, são as microalgas que atuam como produtoras primárias e base da cadeia trófica aquática, nelas foram observados efeitos inibitórios que envolveram danos em processos fisiológicos como a fotossíntese e na divisão celular (BEN OUADA *et al.*, 2018).

2.4. BIORREMEDIAÇÃO DO BFA

Tendo em vista o cenário da crescente presença de microplásticos no ambiente e os seus variados impactos, se faz necessária a busca por alternativas. Nos últimos tempos, diferentes tecnologias foram desenvolvidas para retirar o BFA dos meios, sendo classificadas com base em sua aplicação. Apesar da eficiência de tecnologias que utilizam tratamentos químicos e físicos, a utilização ainda não é convencional e acarreta altos custos (TORRES-GARCÍA *et al.*, 2022). Neste cenário, a biorremediação torna-se a maneira apropriada, dado que se trata de uma tecnologia biológica e de baixo custo, envolvendo processos naturais (SÁNCHEZ, 2020).

A biorremediação é um processo em que organismos vivos são utilizados para remover ou reduzir poluentes de ambientes ou condições com ação antropogênica. A sua aplicação é recomendada pelo âmbito científico como uma alternativa viável para o tratamento de águas superficiais, subterrâneas e solos contaminados. Em geral, usa-se microrganismos degradadores e plantas (fitorremediação) com atividade de degradação dos compostos poluentes (GAYLARDE, 2005).

Cepas bacterianas são capazes de crescer em ambientes que possuem o BFA como a única fonte de carbono e energia. Essa biodegradabilidade pode ser afetada por determinados fatores ambientais como quantidade de biomassa, temperatura e pH. Alguns táxons incluem *Pseudomonas sp.*, *Nitrosomonas sp.*, *Streptomyces sp.* e *Bacillus sp.* (ZHANG; YIN; CHEN, 2013). Estudos realizados utilizando a espécie *Pseudomonas putida* mostraram resultados promissores como capacidade metabólica para degradar concentrações extremamente altas e baixas de BFA (ELTOUKHY *et al.*, 2020).

O uso de fungos (micorremediação) apresenta várias possibilidades de aplicação em áreas contaminadas com BFA, isso se deve à capacidade de adaptação em meios com presença de compostos tóxicos recalcitrantes, a presença de um sistema enzimático extracelular eficiente, a forma de crescimento vegetativo que permite a distribuição no solo e em contato direto com o poluente, e a sua baixa especificidade de substrato (FOUDA *et al.*, 2015; TORRES-GARCÍA *et al.*, 2021). Deste modo, os fungos e as suas enzimas são promissores para a remediação de

ambientes tomados pelos plásticos (SÁNCHEZ, 2020). Os fungos listados por conta da eficiência na remoção e degradação do BFA são classificados de acordo com a sua morfofisiologia e sistema enzimático extracelular, sendo esses: fungos ligninolíticos, fungos não ligninolíticos e leveduras. O uso para degradação pode ser de maneira direta ou por meio da aplicação dessas enzimas extracelulares ligninolíticas (lacases e Mn-peroxidases) (TORRES-GARCÍA *et al.*, 2022).

2.5. FUNGOS LIGNINOLÍTICOS

Os fungos ligninolíticos são produtores de enzimas que degradam a lignina, um grupo de fenoxidases que possuem um papel importante na degradação de BFA, os mais conhecidos são os gêneros *Pleurotus*, *Phanerochaete* e *Trametes* (TORRESGARCÍA *et al.*, 2022). As enzimas ligninolíticas apresentam matrizes de oxidoreductase com intenso potencial redox, dentre as principais incluem: a lacase, a catalase, a lignina peroxidase, a manganês peroxidase e a peroxidase versátil. O processo de degradação e desintoxicação destas enzimas também podem ser aumentados por meio de outras enzimas, como a aril-álcool oxidase, quinona redutases, lipases e outras (ASEMOLOYE *et al.*, 2021; KUMAR, CHANDRA, 2020).

Esses fungos pertencem, geralmente, ao filo Basidiomycota, o qual se destaca por sua importância na biodegradação de poluentes recalcitrantes como fenóis, naftóis, bisfenóis e outros, e tem o potencial relacionado com seu rico suprimento de lacases, tirosinases e as variadas formas de peroxidases (MARTÍNKOVÁ *et al.*, 2016). O processo de biodegradação envolve as enzimas ligninolíticas extracelulares purificadas ou o cultivo de fungos ligninolíticos na presença de BFA, na qual produzirá um coquetel de enzimas (TORRES-GARCÍA *et al.*, 2021).

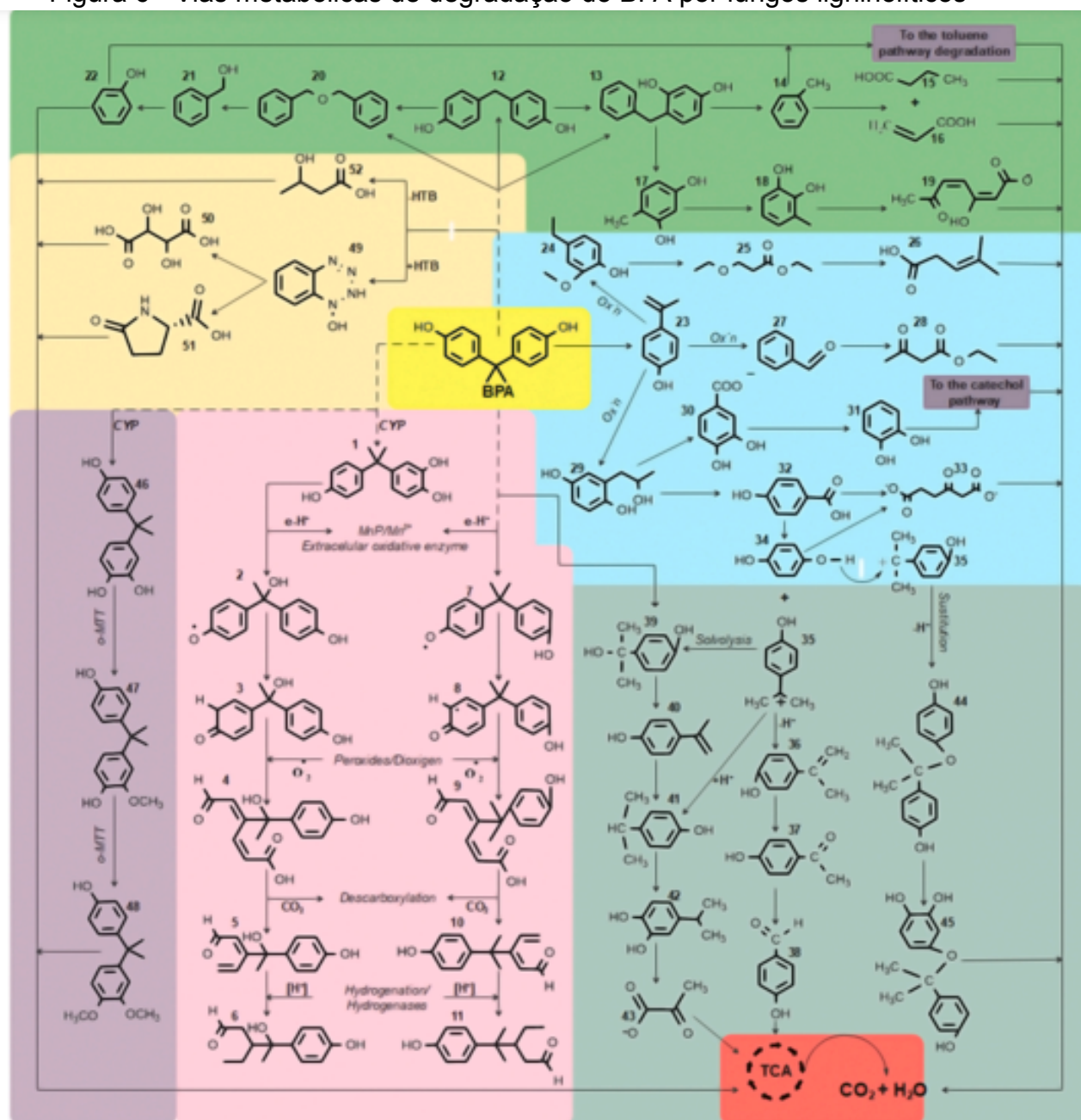
A produção de enzimas ligninolíticas necessita de condições e meios de culturas adequadas para o desenvolvimento do fungo. A faixa de pH de crescimento oscila entre 4,5 e 6,5, enquanto a temperatura entre 20 e 30 °C. Quanto aos recursos para desenvolvimento, as principais fontes de carbono e nitrogênio utilizadas são a glicose e extrato de levedura ou peptona de caseína, respectivamente (TORRESGARCÍA *et al.*, 2022). Os meios de culturas também podem ser suplementados com indutores, como o uso de CuSO₄ para lacases. Após

realizado o cultivo, as enzimas são extraídas com soluções específicas para serem utilizadas como biocatalisadores para a degradação do BFA (DAÂSSI *et al.*, 2016).

Torres-García *et al.* (2022) abordam as distintas vias metabólicas fúngicas de degradação de BFA, por enzimas ligninolíticas, representada na figura 6 através de diferentes cores. Contudo, ainda são poucos os estudos que relatam tais vias. Alguns deles evidenciaram que o metabolismo do BFA se mostrou mais rápido na presença de mediadores, como 1-hidroxibenxotriaxzol (HBT) e 2,2-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato), em comparação a quando as lacases se encontram isoladas (KANG; KATAYAMA; KONDO, 2006).

Em experimentos realizado por Chairin *et al.* 2013, observou-se melhora no desempenho de oxidação do BFA por *Trametes polyzona* quando adicionado juntamente a enzima lacase purificada a um mediador redox. (1-hidroxibenxotriaxzol). Da mesma forma, os fungos que produzem enzimas juntamente ao BFA também são cultivados em meios de culturas complexos para o seu desenvolvimento, e posteriormente, porções do micélio são retiradas e inseridas em outro meio que será enriquecido com BFA para degradação (KABIERSCH *et al.*, 2011).

Figura 6 - Vias metabólicas de degradação do BFA por fungos ligninolíticos



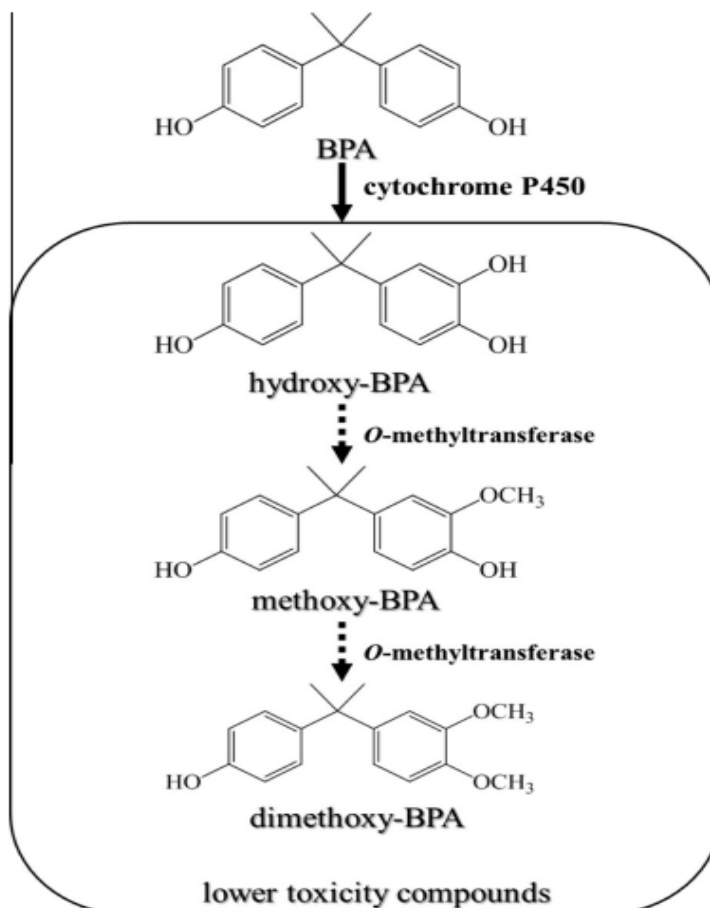
Fonte: TORRES-GARCÍA *et al.* (2022)

Os fungos de outros Filos também podem produzir enzimas ligninolíticas, porém, geralmente a atividade catalítica e a expressão são diferenciadas (BONUGLISANTOS *et al.*, 2010).

Esses fungos podem degradar o BFA também por outras rotas metabólicas, como relatado para o basidiomiceto *Phanerochaete erréus* YK-624 sob condição não ligninolítica (não produzindo enzimas da rota lignolítica) mostra que a transformação do BFA é monooxigenado (pelo citocromo P450) para formar hidroxi-BPA; este

metabólito primário é então metilado para gerar dois novos compostos, metoxi-BPA e dimetoxi-BPA (figura 7) (WANG *et al.*, 2014).

Figura 7 - Rota metabólica de metabolismo do BPA por *P. sordida* YK-624



Fonte: WANG *et al.* (2014)

2.6. FUNGOS NÃO LIGNINOLÍTICOS

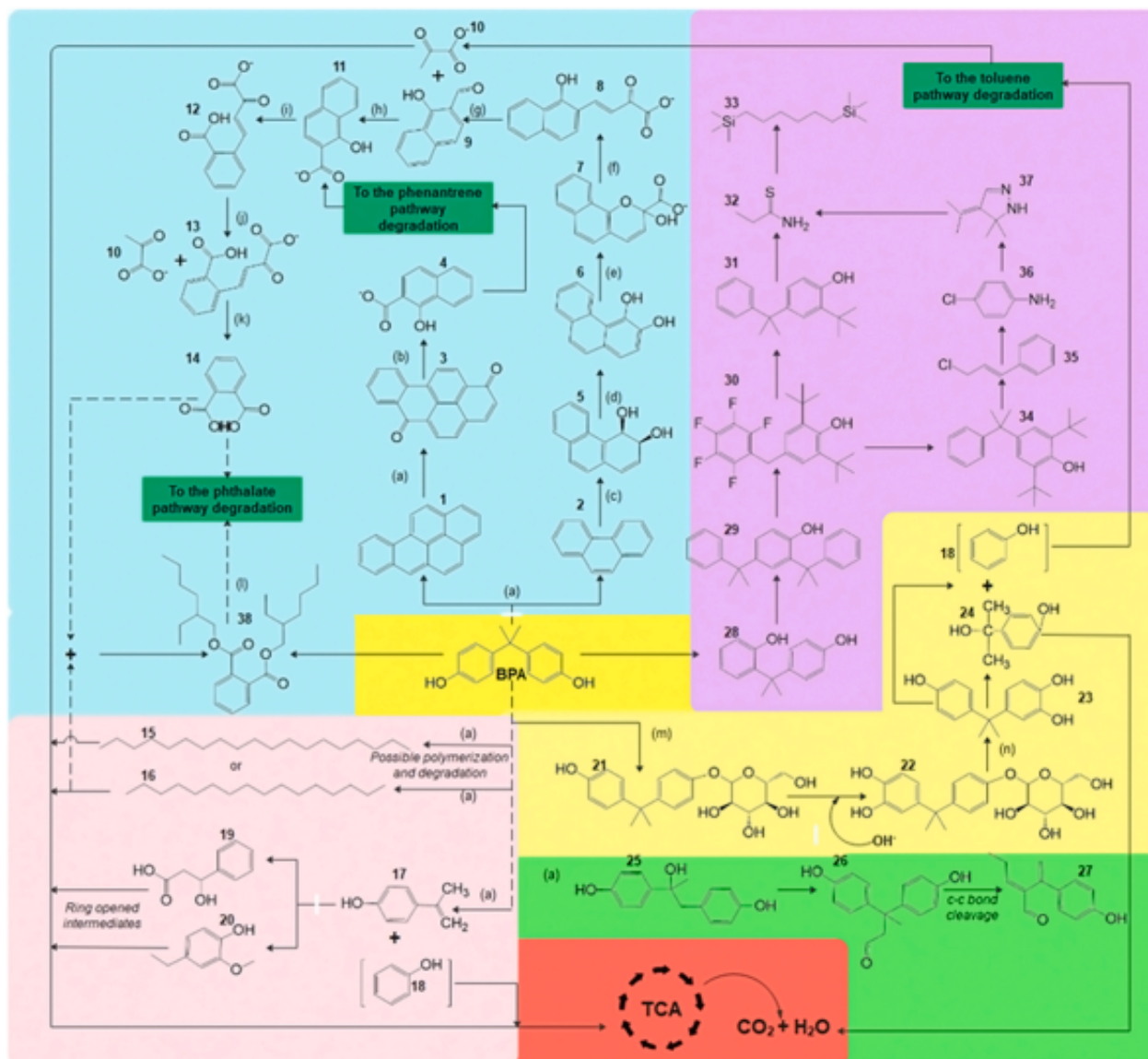
Os grupos de fungos não ligninolíticos são geralmente pertencentes ao filo Ascomycota e conhecidos pelo processo de biodegradação por rotas intracelulares, as quais incluem os gêneros: *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium* e *Trichoderma*. São geralmente usados devido à capacidade de desenvolvimento em ambientes que possuem condições extremas, como aquelas contaminadas com elementos químicos potencialmente tóxicos, bem como a adaptabilidade a uma ampla faixa de pH e temperatura, facilidade de quelação de íons metálicos e utilização de amplas variedades de fontes de carbono e energia a partir de suas vias metabólicas centrais (FOUDA *et al.*, 2015; TORRES-GARCÍA *et al.*, 2021).

Chhaya e Gupte (2013) analisaram a ação da espécie *Fusarium incarnatum* em determinadas condições ambientais, o resultado demonstrou que o fungo conseguiu degradar o BFA com alta eficiência. Outro estudo realizado para investigar a atividade de biodegradação de BFA de fungos, verificou que 11 cepas de fungos foram capazes de degradar BFA (40 mg/L), dentre elas as cepas das espécies: *Aspergillus erréus* MT-13, *Fusarium mornilforme* 2-2, *Fusarium sporotrichioides* NFRI-1012 e *Emericella nidulans* MT-78, foram as que obtiveram maior eficiência (CHAI *et al.*, 2005)

Para a degradação do BFA, a utilização de células, esporos ou conídios de fungos não ligninolíticos necessitam de condições de cultivo entre 25-30 °C e de uma faixa de pH entre 5 e 6,8. Em geral, os meios de cultivos usam a glicose como principal fonte de carbono e as fontes complexas de nitrogênio, como extrato de malte ou extrato de levedura, bem como fontes inorgânicas, como NaNO_3 (TORRES-GARCÍA *et al.*, 2022).

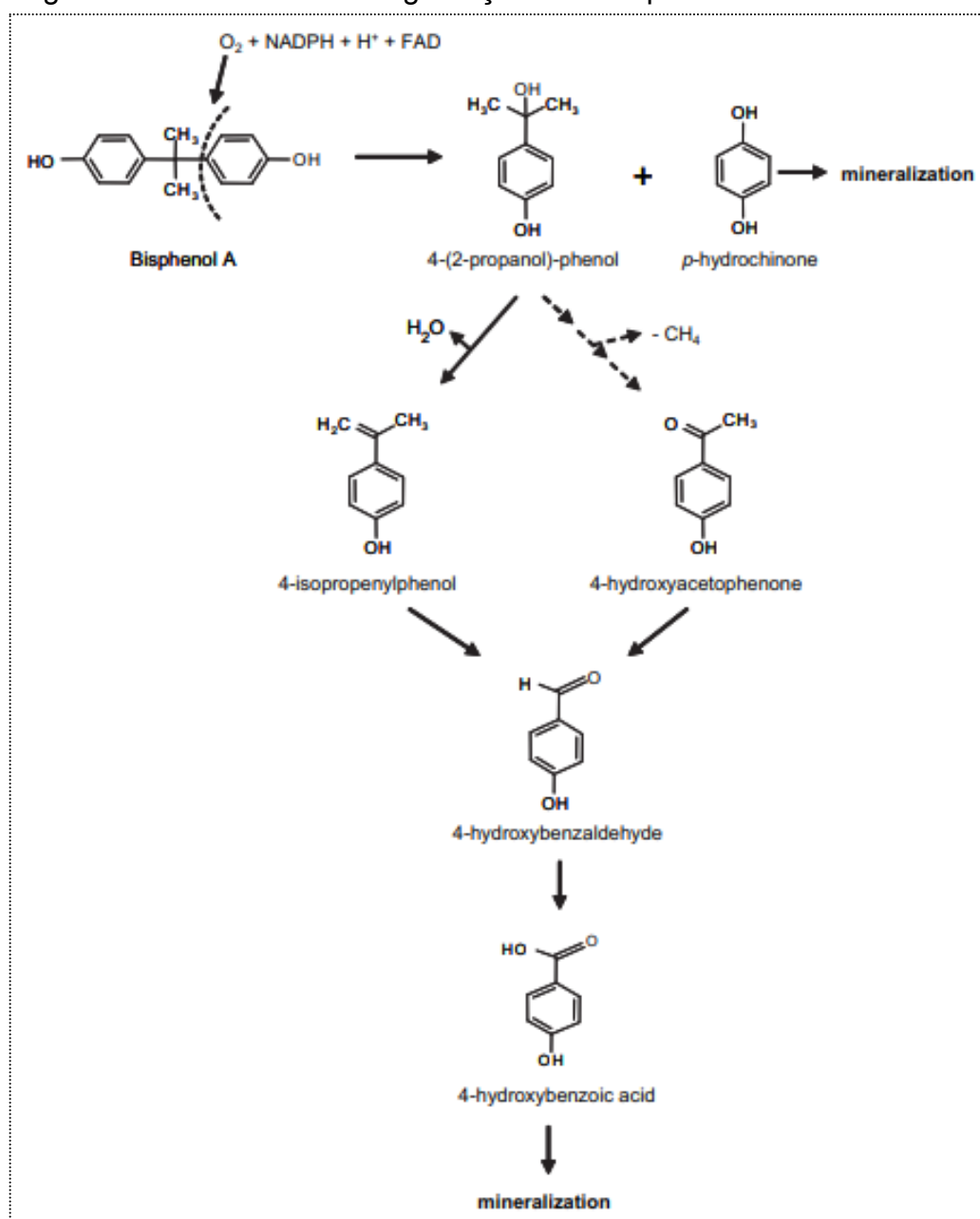
Assim como acontece com os fungos ligninolíticos, o conhecimento sobre as vias metabólicas de fungos não ligninolíticos responsáveis pela degradação do BFA ainda são pouco elucidadas. Torres-García *et al.* (2022) também reúne as distintas rotas conhecidas na literatura pelas diferentes espécies (figura 8). Em um dos trabalhos voltados para investigar a via de degradação, analisou-se que as espécies *Aspergillus erréus* e *Aspergillus flavus* poderiam clivar o BFA em 4,2-propanol fenol e p-hidroquinona. Em seguida, 4-(2-propanol) fenol se divide em 4-isopropenilfenol e 4 hidroxiacetofenona, e esse se converte em ácido p-hidroxibenzóico que se mineraliza (figura 9) (FISCHER *et al.*, 2010, FOUDA *et al.*, 2015).

Figura 8 - Vias metabólicas de degradação do BFA por fungos não ligninolíticos



Fonte: TORRES-GARCÍA *et al.* (2022)

Figura 9 - Possível via de degradação do BFA por *A. terreus* e *A. flavus*



Fonte: FISCHER *et al.* (2010)

2.7 DIFICULDADE PARA TRIAGEM DE FUNGOS COM POTENCIAL PARA BIORREMEDIAÇÃO DO BFA

A biorremediação é baseada na busca e descoberta de recursos biológicos exploráveis. Uma abordagem clássica das etapas do processo de busca e descoberta passa pela seleção e triagem de materiais com os atributos desejados e seleção final do(s) melhor(es) candidato(s) a partir de uma lista reduzida de opções que culmina com o desenvolvimento de um produto comercial ou processo industrial (BULL *et al.* 2000, CANHOS & MAFIO, 2023).

Os métodos utilizados atualmente para análises do BFA não permitem um estudo de alta eficiência na triagem microbiana. Dentre os métodos analíticos de alta precisão e amplamente utilizados para a detecção de BFA presentes em amostras ambientais complexas, estão descritos o uso da Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), capaz de detectar o BFA e seus compostos em uma baixa concentração, e a Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GCMS) que possui a capacidade de detecção e quantificação do BFA em meios contendo outros componentes. Enquanto, a Eletroforese Capilar (CE) se destaca pela rápida detecção do BFA e uma alta sensibilidade analítica, sendo capaz de alcançar um limite de quantificação de até 0,8 ng/mL (TARAFDAR *et al.*, 2022).

É importante ressaltar que os imunoenaios também oferecem um potencial significativo na detecção do BFA, como é o caso do Ensaio de Imunoabsorção Enzimática (ELISA), que possui alta seletividade e precisão ao utilizar a interação entre antígeno-anticorpo e enzimas. Além disso, a utilização de ensaios imunocromatográficos também tem sido empregada para a detecção do BFA, em que nanopartículas de ouro conjugadas com anticorpos anti-BFA são empregadas como sondas de reconhecimento, demonstrando um desempenho superior em comparação com a primeira técnica mencionada, com a capacidade de detectar concentrações baixas com um limite de 0,5 ppb (TARAFDAR *et al.*, 2022). Entretanto, no Brasil há uma dificuldade de obtenção desses ensaios de forma comercial, especialmente devido a disponibilidade e custo elevado, dificultando a aplicação para triagem em bibliotecas grandes.

Tarafdar *et al.* (2022) também aborda a utilização de sensores, os quais oferecem vantagens notáveis em termos de precisão, seletividade e robustez na detecção do BFA em amostras que apresentam matrizes complexas. Esses sensores podem ser do tipo eletroquímico e se baseiam na utilização de polímeros impressos molecularmente (MIP), os quais conferem alta especificidade para o BFA. Outra alternativa, são os sensores baseados em aptâmeros, os quais desempenham um papel análogo ao dos anticorpos, permitindo a captura e detecção do BFA presente em uma determinada amostra.

Visando métodos simples e de baixo custo, que podem ser aplicados em qualquer laboratório básico de microbiologia, a primeira metodologia avaliada no

presente trabalho é baseada no potencial de desintoxicação do BFA usando como bioindicador de fitotoxicidade sementes de *Cucumis sativus* L. Trabalhos mostraram que essas sementes são ótimos indicadores para testes de fitotoxicidades visto que a germinação é suficientemente sensível quando expostas a substâncias tóxicas e poluentes (WANG *et al.*, 2001).

Os testes de fitotoxicidade são vantajosos devido à sensibilidade das plantas a diversos compostos químicos. Além disso, as plantas são facilmente armazenadas e manipuladas, possuem baixo custo e fácil acesso às sementes (FISKESJÖ, 1985). Nesse sentido, o teste de fitotoxicidade baseado no índice de germinação de sementes combina medidas de germinação de sementes e alongamento de raízes para detectar componentes tóxicos no meio de cultivo das plantas, sendo sensível à presença de substâncias tóxicas (DEVESA-REY *et al.*, 2008). Dessa forma, os ensaios de fitotoxicidade analisam o crescimento da radícula e do hipocótilo das plantas, evidenciando a capacidade de desenvolvimento da planta em um determinado meio, considerando a possibilidade de comprometimento dos processos fisiológicos devido à presença de toxinas (ROCHA, 2017).

A segunda estratégia é baseada na análise do perfil de absorção da luz pelo BFA usando o espectrofotômetro UV-VIS. SOUSA (2018) avaliou por meio do espectrofotômetro UV-Vis a ação da lacase sobre o BFA, e detectou que os picos de absorção de ambos os compostos (BFA e lacase) foram semelhantes pois apresentam-se sobrepostos, assim foi utilizado o espectro de ordem zero, pela técnica de ponto de anulação por uma varredura de 200 a 400 nm por espectrometria derivativa, sendo possível observar a redução da absorbância do BFA devido à sua degradação pela lacase, na região de 288 nm, pois neste comprimento de onda da derivada não ocorreu sobreposição dos picos, sendo possível observar apenas o BFA. Assim, a avaliação da presença da lacase no estudo para detectar a necessidade ou não de uso da técnica de ponto de anulação descrita por Sousa (2018).

Por fim, como indicado anteriormente, os fungos apresentam estratégias diferentes de biodegradação do BFA baseado na produção ou não de enzimas ligninolíticas. Neste sentido, para o estudo foram selecionados dois fungos do Filo

Basidiomiceto (potenciais produtores de enzimas ligninolíticas) e dois fungos do Filo Ascomiceto.

3. OBJETIVO

3.1. OBJETIVOS GERAIS

Avaliar métodos alternativos para detecção de bisfenol A (BFA), usando ensaios de fitotoxicidade e análises da degradação por espectrofotômetro UV-Vis a partir de cultivos dos fungos ligninolíticos e não ligninolíticos da Coleção de Cultura de Micro-organismos de Importância Biotecnológica e Ambiental (CCMIBA) da Universidade Federal da Integração Latino-Americana (UNILA).

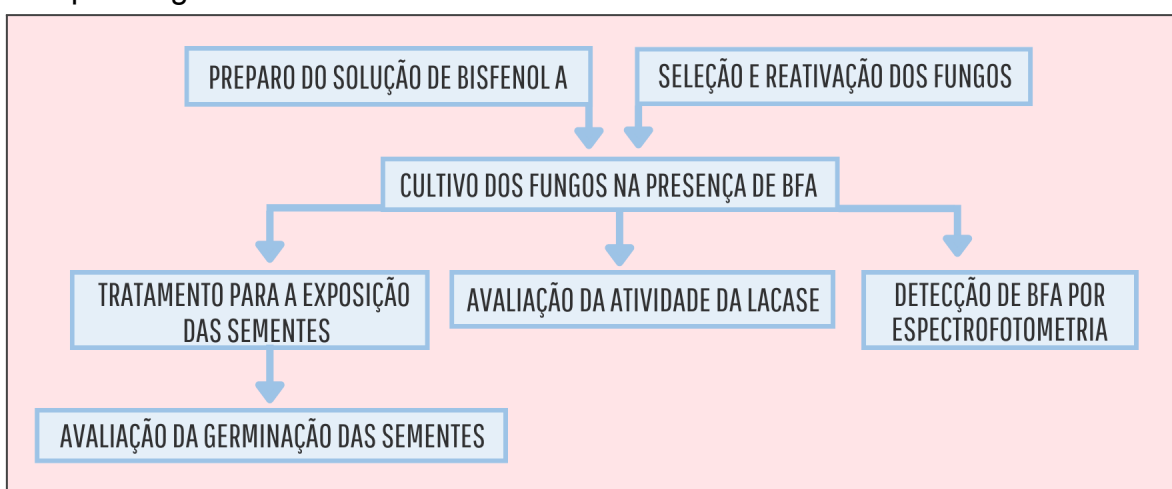
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar a melhor mistura de BFA que permita a suspensão da molécula;
- Avaliar a toxicidade da suspensão de BFA sem tratamento usando *Cucumis sativus* como indicador de fitotoxicidade;
- Selecionar as linhagens potenciais para biorremediação da CCMIBA;
- Reativar os fungos;
- Cultivar os fungos em meio contendo BFA;
- Avaliar a taxa de destoxificação do BFA usando *Cucumis sativus* como modelo toxicológico;
- Avaliar a atividade de lacase das linhagens fúngicas selecionadas;
- Avaliar o perfil espectrofotométrico dos tratamentos fúngicos na presença do BFA em comparação com os meios de cultivos ausentes de fungo, somente com BFA.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

Para avaliar a degradação de BFA por fungos filamentosos, determinados processos foram realizados conforme a metodologia estabelecida. Esses processos que permitiram avaliar o potencial dos fungos ligninolíticos e não ligninolíticos estão demonstrados no organograma da figura 10, a qual apresenta uma visão abrangente do fluxo de atividades seguidas ao longo do estudo.

Figura 10 - Organograma de metodologias realizadas para avaliar a degradação de BFA por fungos filamentosos



Fonte: Autora (2023)

4.1. PREPARO DO SUSPENSÃO DE BISFENOL A

A fim de testar a suspensão de BFA frente a variação do pH e no menor volume de etanol absoluto, conforme Davies (2010), 0,01 g de BFA (Sigma-Aldrich), foi adicionado em 9,46 mL de água destilada (correspondente a 1 g/L) e 0,54 mL de etanol. O pH das misturas preparadas foram corrigidas usando NaOH e HCl, de modo que pudessem atingir valores de pH próximos de 5, 6, 7 e 8.

Posteriormente, as misturas foram agitadas em um agitador magnético a uma temperatura de 45°C, por 20 minutos, ou até se observar a suspensão do BFA em pequenas partículas, de maneira que o formato sólido inicial não fosse mais visível.

Deste modo, a mistura de pH 7,6 que apresentou a melhor suspensão foi selecionada para avaliar a toxicidade do BFA, utilizando-se *Cucumis sativus* como bioindicador e para os ensaios espectrofotométricos. As demais misturas com pH

próximos de 5, 6, e 8 não obtiveram suspensão em menores partículas, mantendo-se com a estrutura sólida inicial do BFA.

4.2. ANÁLISE DE FITOTOXICIDADE COM *CUCUMIS SATIVUS*

4.2.1. TRATAMENTO PARA A EXPOSIÇÃO DAS SEMENTES

As sementes de *Cucumis sativus* passaram por um pré-tratamento com solução de hipoclorito de sódio 0,1% por 20 minutos, seguidamente, foram embebidas em água deionizada por 10 minutos e lavadas com água deionizada por três vezes anteriormente ao uso, conforme Wang *et al.* (2001).

Posteriormente, os ensaios de toxicidade foram feitos usando as sementes de *C. sativus* cultivadas em placas de petri, baseados nos estudos de Farias (2022). Em placas de Petri foram colocados papel filtro, 15 sementes e 5 ml da solução teste. Em seguida, as placas foram recobertas com filme plástico para evitar a evaporação do tratamento, e armazenadas em temperatura ambiente, no escuro, ao longo de cinco dias. Para o controle negativo foi utilizado uma solução de sulfato de zinco ($ZnSO_4$) (0,05 M), na qual inibe a germinação das sementes, assim confirmando sua sensibilidade, e para o controle positivo, água destilada.

Inicialmente, foi avaliado o potencial de fitotoxicidade da suspensão de BFA sem tratamento, para testar se a metodologia era sensível à concentração do composto teste. Para isso, diferentes concentrações do BFA, a partir da suspensão estoque de 0,01 g, foram avaliadas conforme a metodologia acima, sendo essas concentrações: 10 mg/L, 50 mg/L e 100 mg/L. A concentração mínima que apresentou toxicidade para *C. sativus* foi selecionada para os tratamentos de biodegradação fúngica.

Os ensaios de fitotoxicidade foram realizados no interior de um ambiente estéril, cabine de segurança biológica, a fim de evitar crescimentos fúngicos decorrentes da contaminação do ar.

4.2.2. AVALIAÇÃO DA GERMINAÇÃO DAS SEMENTES

Após a incubação com as soluções testes, foram consideradas germinadas as sementes de *C. sativus* que conseguiram alcançar 5 mm de comprimento em suas radículas. A biomassa da parte aérea, as radículas e hipocótilos foram

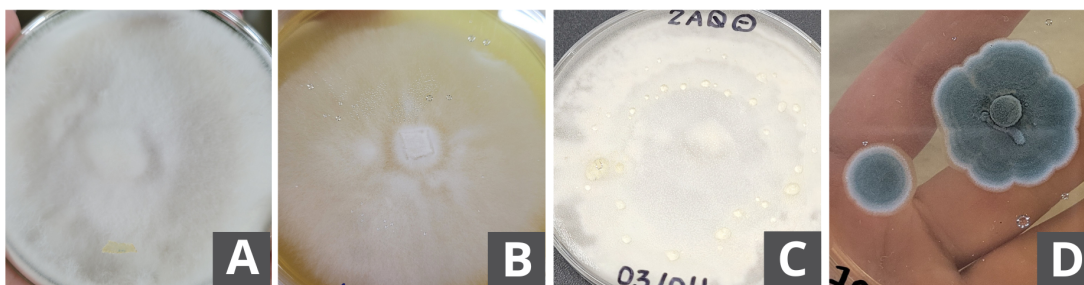
medidas, e por fim, foi calculado a porcentagem de inibição de acordo com a equação 3.

$$\% \text{ de inibição} = \frac{(\text{média do controle positivo} - \text{média do bioensaio})}{(\text{média do controle positivo})} \quad (3)$$

4.3. SELEÇÃO E REATIVAÇÃO DOS FUNGOS

A partir do banco de dados da CCMIBA, foram selecionados fungos de diferentes grupos taxonômicos, especialmente potenciais ligninolíticos e não ligninolíticos, conforme o relato do potencial de degradação de BFA no trabalho de Torres-García (2022). Posteriormente, os fungos foram reativados em Meio Extrato de Malte por sete dias. Foram selecionados os fungos com potencial ligninolítico, o *Bjerkandera* sp. CCMIBA_R111 e *Trametes* sp. CCMIBA_2AQ, e não ligninolítico as linhagens *Aspergillus* sp. CCMIBA_R056 e o *Penicillium* sp. CCMIBA_2G (figura 11).

Figura 11 - Linhagens fúngicas selecionadas (A) *Bjerkandera* sp. CCMIBA_R111, (B) *Aspergillus* sp. CCMIBA_R056, (C) *Trametes* sp. CCMIBA_2AQ e (D) *Penicillium* sp. CCMIBA_2G.



Fonte: AUTORA (2023)

4.4. CULTIVO DO FUNGO NA PRESENÇA DE BFA

Para o desenvolvimento de fungos ligninolíticos, as linhagens foram cultivadas em um meio de cultura Ágar extrato de malte (MEA) (contendo extrato de levedura 4 g, extrato de malte 10 g, glicose 4 g e ágar 15 g em 1 L H₂O), até por 10 dias. Posteriormente para obtenção do préinóculo, três discos (5 × 5 mm) de ágar com micélio ativo foram cultivados em 20 mL do mesmo meio (sem ágar) em agitação (130 rpm) por cinco dias a 28° C. Posteriormente, os frascos de cultura contendo 20 ml do mesmo meio de cultura suplementado com 200 µL da suspensão estoque de 1 g/L de BFA (concentração final nos ensaios de 10 mg/L) foram

inoculados com os 20 mL do pré-inóculo fúngico, por sete dias a 28° C, na mesma agitação (CHOI; SONG, 2007).

O meio de cultivo de fungos não ligninolíticos foi o meio Czapek (CY) líquido com extrato de levedura que continha por litro de água destilada: 3,0 g de NaNO₃, 1,0 g de K₂HPO₄, 0,5 g de KCl, 0,5 g de MgSO₄·7H₂O, 0,01 g de FeSO₄·7H₂O, 0,01 g de ZnSO₄·7H₂O, 0,005 g de CuSO₄·5H₂O, 5,0 g de extrato de levedura e 30,0 g de sacarose, conforme Chai *et al.* (2005). O preparo do pré-inóculo seguiu o mesmo procedimento e condições dos fungos não ligninolíticos, contudo, os frascos foram envoltos por papel alumínio para proporcionar um ambiente ausente de luz para o crescimento fúngico. Para o ensaio de degradação do BFA, 20 mL do pré-inóculo foram inoculadas em 20 mL do mesmo meio de cultivo utilizado para o seu desenvolvimento, com exceção à sacarose, adicionando 200 µL da suspensão estoque BFA (1 g/L) como a principal fonte de carbono (concentração final nos ensaios de 10 mg/L). Deste modo, o inóculo com BFA foi incubado em agitação (130 rpm) a 28 °C no escuro, durante sete dias

Todos os ensaios foram realizados em triplicata, incluindo controle negativo (meio de cultura suplementado com BFA, sem fungo).

Após os cultivos, os tratamentos foram centrifugados a 10.000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi utilizado para avaliação da enzima lacase, para os ensaios de fitotoxicidade, conforme metodologia descrita anteriormente, e para a análise do perfil de espectrofotometria UV-Vis.

4.5. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DA LACASE

Com o uso do mesmo sobrenadante obtido na centrifugação dos tratamentos fúngicos, foram realizadas as análises de atividade de lacase usando espectrofotômetro UV-Vis (weblaborsp; WUV-M51). Inicialmente, foi preparada uma solução de 0,02% de substrato ABTS 2,2-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) e tampão acetato de sódio 0,1 mol pH 4,5. Para o ensaio enzimático foram adicionados 1,5 ml de tampão acetato de sódio 0,1 mol pH 4,5 em tubos de ensaios, juntamente com 0,5 ml de sobrenadantes dos diferentes ensaios das linhagens fúngicas, incluindo os controles negativos (WOLFENDEN; WILLSON, 1982). Nos

tubos de ensaios, finalizou-se a mistura reacional com a adição de 0,2 ml do ABTS 0,02%, substrato para a ação enzimática.

Essas soluções foram transferidas para as cubetas e inseridas no espectrofotômetro, onde foi analisada a quantidade de energia radiante absorvida, no comprimento de onda de 420 nm, utilizando-se água destilada para zerar o equipamento. Com os valores registrados, as soluções foram novamente transferidas para os tubos de ensaios e incubadas na estufa durante 10 minutos, em uma temperatura de 37 °C.

Após o tempo necessário, as reações foram mais uma vez colocadas no espectrofotômetro e foram registrados os valores de absorbância final. Após leitura no espectrofotômetro, a atividade enzimática da lacase foi determinada através da equação 4 abaixo, conforme Baltierra-Trejo *et al.* (2015).

$$U L^{-1} = \frac{(\Delta A)(V_t)(D_f)(10^6)}{(t)(\epsilon)(d)(V_s)} \quad (4)$$

Onde:

U Atividade enzimática

ΔA Absorbância final - absorbância inicial.

V_t Volume total da reação (mL).

t Tempo de reação (min).

ϵ Coeficiente de extinção molar (M⁻¹ cm⁻¹ ou L mol⁻¹ cm⁻¹).

d Percurso óptico (1 cm).

V_s Volume de amostra (mL).

D_f Fator de diluição.

10⁶ Fator de correção (μmol mol⁻¹)

Uma unidade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima necessária para oxidar 1 μmol de substrato por minuto. A atividade enzimática foi expressa em U L⁻¹ do caldo enzimático.

4.6. DETECÇÃO DE BFA POR ESPECTROFOTOMETRIA

A avaliação espectrofotométrica também foi realizada para verificar o potencial de degradação de BFA pelas linhagens fúngicas por meio da análise da solução do sobrenadante gerado na centrifugação.

A detecção utilizou o espectrofotômetro UV-Vis (weblaborsp; WUV-M51) acoplado ao seu aplicativo UV Professional 2, o qual possibilitou a geração de curvas de absorbância das soluções preparadas de 300 a 800 nm. Dentre as soluções analisadas, buscou-se realizar comparações entre as curvas, para isso, uma detecção foi realizada para suspensão estoque (mais concentrado que o volume utilizado nos ensaios) de 0,01 g de BFA, utilizando água destilada como parâmetro zero do equipamento.

As demais análises foram realizadas com as réplicas dos tratamentos fúngicos que obtiveram os melhores resultados na germinação das sementes e os seus respectivos controles negativos. Para o parâmetro zero do espectrofotômetro, foram utilizados também seus respectivos meios de cultura sem BFA e sem cultivo fúngico, meio MEA para fungos ligninolíticos e meio CY para fungos não ligninolíticos.

5. RESULTADOS

O estudo de métodos alternativos para triagem de fungos com potencial de degradação de BFA iniciaram no grupo de pesquisa em 2019 por Barcellos (2019) que avaliou o uso da espécie vegetal *Allium cepa* como bioindicador a partir de uma solução estoque de BFA preparada com 10% de etanol absoluto. Contudo, a concentração do etanol foi tóxica para a cebola e para os fungos. Barcellos (2019) iniciou também os testes de perfil espectrofotométrico usados no presente trabalho. Assim, o primeiro desafio do estudo atual foi encontrar uma concentração mínima de etanol absoluto capaz de dissolver o BFA e não ser tóxico para o bioindicador. Após, foi selecionada uma espécie diferente como bioindicador devido à dificuldade de obtenção de *Allium cepa* orgânica (sem a adição de inibidores de raiz), em conjunto com a avaliação da atividade de lacase e os perfis espectrofotométricos.

5.1. CONCENTRAÇÃO E TOXICIDADE DO BFA

A mistura contendo 5,4 % de etanol absoluto e pH 7,6 apresentou a melhor suspensão em menores partículas e foi selecionada para avaliar qual a concentração do BFA que apresentava toxicidade para a germinação de *Cucumis sativus*.

A concentração de BFA definida para os tratamentos de biodegradação fúngica foi 10 mg/L, onde os testes mostraram que essa quantidade resultou em uma maior inibição do crescimento das radículas das sementes avaliadas, quando comparada com as demais concentrações de BFA (apêndice A).

5.2. ANÁLISE DE FITOTOXICIDADE COM *CUCUMIS SATIVUS*

Os ensaios foram divididos em quatro lotes, sendo cada fungo correspondente a um lote, incluindo o controle positivo, o controle negativo da germinação (com sulfato de zinco) e o controle negativo do tratamento (meio cultura e BFA, sem fungo). Ao final de cada ensaio de fitotoxicidade com *C. sativus*, todos os valores de germinação (apêndice A) foram registrados e calculadas as médias das quinze sementes para as triplicatas dos tratamentos fúngicos, o controle positivo, o controle negativo com sulfato de zinco ($ZnSO_4$) (0,05 M) e com BFA (10 mg/L). Todos os valores estão representados na representada na tabela 1.

Tabela 1 - Média e desvio-padrão do comprimento (cm) das radículas nos ensaios após o tempo de incubação das sementes de *C. sativus* com os tratamentos fúngicos:

	Controle positivo	Controle negativo (ZnSO4)	Réplica A	Réplica B	Réplica C	Controle negativo (BFA)
R111	2,66 ± 1,26	0,07 ± 0,18	2,1 ± 1,03	1,67 ± 0,98	2,59 ± 1,38	2,27 ± 1,13
R56	1,57 ± 1,07	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
2AQ	5 ± 0,58	0 ± 0	0,8 ± 0,71	1,3 ± 1,17	0,5 ± 0,51	2,7 ± 0,9
2G	4,5 ± 1,42	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0,5 ± 0,33

Bjerkandera sp. CCMIBA_R111, *Aspergillus* sp. CCMIBA_R056 *Trametes* sp. CCMIBA_2AQ e *Penicillium* sp. CCMIBA_2G. As sementes do controle positivo foram incubadas com água destilada esterilizada, e para o controle negativo (zinco) do tratamento, apenas com sulfato de zinco (ZnSO4) (0,05 M). Enquanto que o controle negativo (BFA), foram somente incubadas com meio de cultivo com BFA, sem fungo.

O controle positivo em que as sementes foram incubadas somente com água destilada, se observou uma grande variação nos valores de germinação, como pode ser observado na média (tabela 1). Bem como em determinados lotes, houve uma variação com até 4,5 cm de diferença entre os maiores e menores comprimentos de radículas, indicando que a taxa de crescimento só pode ser comparada dentro do seu lote de estudo e não extrapolando a comparação para os outros lotes. Apesar dessa variação, o controle negativo com sulfato de zinco confirmou a sensibilidade das sementes. Entretanto, o controle do tratamento não reduziu a germinação nos ensaios com meio MEA, meio de cultura dos basidiomicetos.

Além das médias de comprimento de germinação, também foram determinados os percentuais de inibição das sementes de *C. sativus*, expressos na tabela 2, quanto menor a % de inibição, maior a atividade de desintoxicação do BFA.

Tabela 2 - Percentual de inibição (%) de germinação das sementes de *C. sativus* dos ensaios após período de incubação das sementes de *C. sativus* com os tratamentos fúngicos:

	Controle negativo (ZnSO4)	Réplica A	Réplica B	Réplica C	Controle negativo (BFA)
R111	97%	21%	37%	3%	15%
R56	100%	100%	100%	100%	100%
2AQ	100%	84%	74%	90%	46%
2G	100%	100%	100%	100%	89%

Bjerkandera sp. CCMIBA_R111, *Aspergillus* sp. CCMIBA_R056 *Trametes* sp. CCMIBA_2AQ e *Penicillium* sp. CCMIBA_2G. As sementes do controle positivo foram incubadas com água destilada esterilizada, e para o controle negativo (zinco) do tratamento, apenas com sulfato de zinco (ZnSO4) (0,05 M). Enquanto que o controle negativo (BFA), foram somente incubadas com meio de cultivo com BFA, sem fungo.

Os percentuais de inibição em sementes tratadas com as linhagens fúngicas também se mostram bastante variáveis. Em determinados ensaios, as sementes não atingiram um comprimento significativo em suas radículas, sendo consideradas não germinadas, como nos lotes de tratamento fúngico *Aspergillus* sp. CCMIBA_R056 e *Penicillium* sp. CCMIBA_2G, nos quais as sementes apresentaram 0 cm de comprimento de radículas e conseqüentemente, 100% inibição na germinação. Por outro lado, também foi possível verificar uma variação da inibição de germinação em determinados lotes, como no caso do *Bjerkandera* sp. CCMIBA_R111, o qual apresentou um valor de apenas 3% a 37%, com alto desvio padrão.

Como já indicado pelo tamanho das radículas, conforme a tabela 2, é possível identificar que para os fungos com potencial ligninolítico (R111 e 2AQ), a inibição foi maior nos tratamentos do que no controle negativo com BFA.

Diante da ausência efetiva de diminuição da inibição de germinação, não foi utilizado nenhum método estatístico para os ensaios de toxicidades.

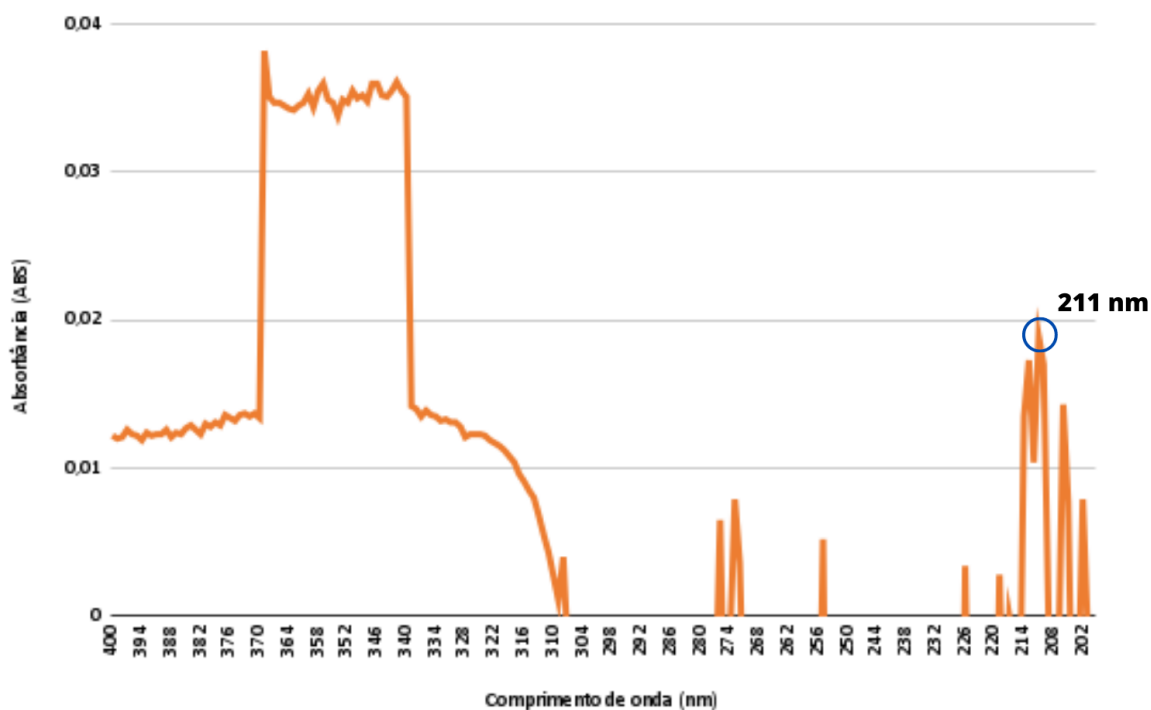
5.3. ATIVIDADE DA LACASE

A avaliação da atividade da lacase realizada mostrou que não houve a presença da enzima nos quatro tratamentos fúngicos.

5.4. AVALIAÇÃO ESPECTROFOTOMÉTRICA PARA DETECÇÃO DE BFA

Por meio da análise espectrofotométrica, foi observado que a suspensão estoque de 1g/L de BFA (em água e 5,4% de etanol absoluto) apresentou um pico de absorbância no comprimento de onda de 211 nm (figura 12) que possivelmente corresponde ao BFA, como descrito por Nugroho et. al (2019) em que a área de absorção de compostos de BFA está na faixa entre 200 nm e 300 nm, sendo o máximo de absorbância em um comprimento de onda de aproximadamente 214 nm.

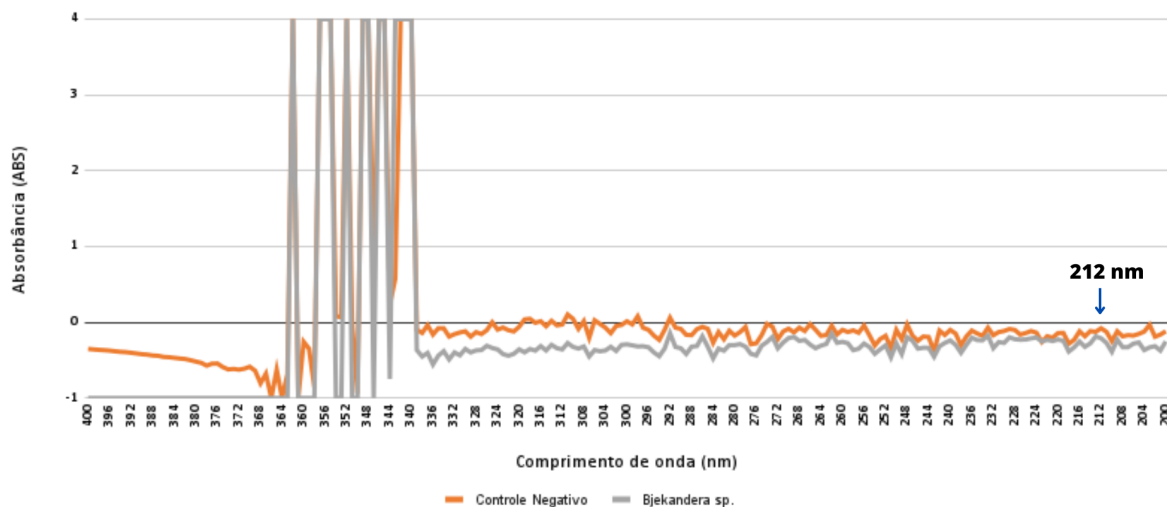
Figura 12 - Espectro de absorção do BFA na suspensão estoque de 1 g/L BFA preparado com água e 5,4 % de etanol absoluto. A região circulada indica o pico de absorção a 211 nm.



Fonte: AUTORA (2023)

O controle negativo do ensaio com o *Bjerkandera* sp. CCMIBA _R111 apresentou um pico no comprimento 212 nm (figura 13), região próxima do pico observado no espectro suspensão estoque. Enquanto, o espectro do tratamento fúngico não mostrou absorvância acentuada no comprimento de onda de 212 nm, ausência essa que pode estar relacionada com a degradação do BFA pelo crescimento fúngico. A absorvância em 212 nm para controle negativo e o tratamento com *Bjerkandera* sp. CCMIBA _R111 foram $ABS_{212} = -0,079$ e $ABS_{212} = -0,211$, respectivamente. Os valores são negativos devido à alta absorção de outro componente do meio na faixa de 340 a 370 nm e/ou devido à baixa concentração dos BFA nos ensaios. Contudo, $-0,211$ significa menor absorção de luz do que $-0,079$, ou seja, menor presença do componente, redução de 0,132 da ABS_{212} .

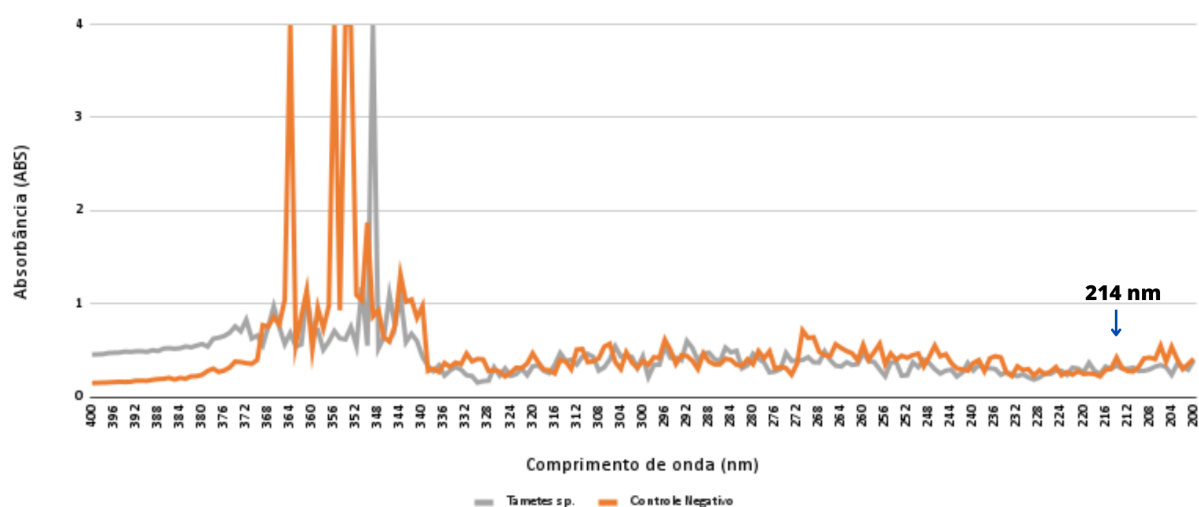
Figura 13 - Espectro de absorção do tratamento fúngico *Bjerkandera* sp. CCMIBA_R111 e controle negativo. Pico em 212 nm indicado pela seta.



Fonte: AUTORA (2023)

Enquanto, o ensaio com *Trametes* sp. CCMIBA_2AQ, o comprimento de onda de 214 nm foi o que exibiu um pico de absorbância em relação ao espectro controle e o tratamento fúngico. Os valores de absorbância do controle negativo e do tratamento fúngico registraram-se, respectivamente, $ABS_{214} = 0,425$ e $ABS_{214} = 0,338$ (figura 14), mostrando um provável potencial de degradação, com redução de $0,087 ABS_{214}$.

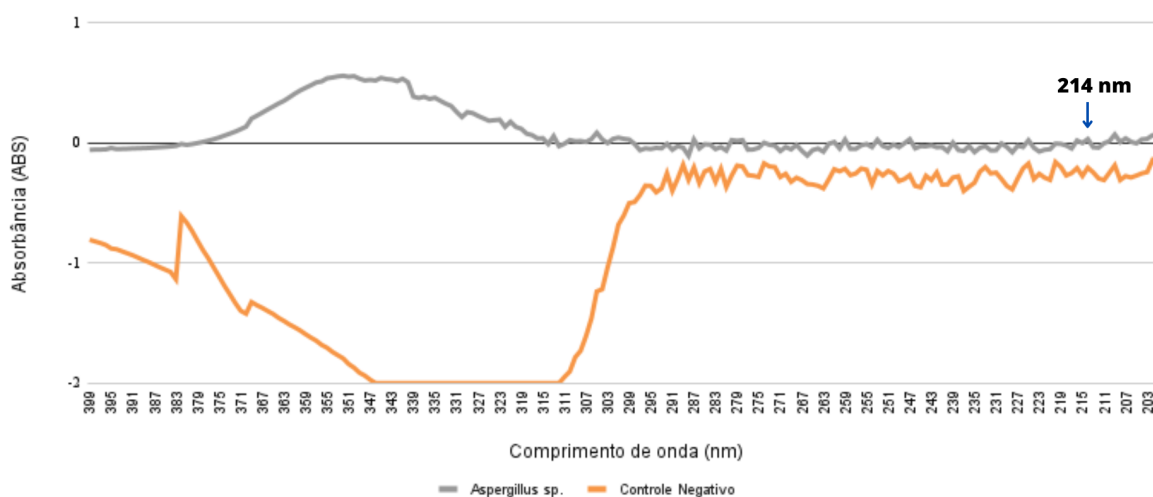
Figura 14 - Espectro de absorção do tratamento fúngico *Trametes* sp. CCMIBA_2AQ e controle negativo. A seta indica o pico de absorção a 214 nm.



Fonte: AUTORA (2023)

No entanto, os ensaios com fungos não ligninolíticos obtiveram maiores valores de absorbâncias em espectros de tratamentos fúngicos em relação aos controles negativos. Para o *Aspergillus* sp. CCMIBA_R56, a absorbância no pico de comprimento de onda de 212 nm do controle negativo foi $ABS_{212} = -0,0613$, sendo o pico de $ABS_{212} = 0,0679$ para o tratamento com fungo (figura 15).

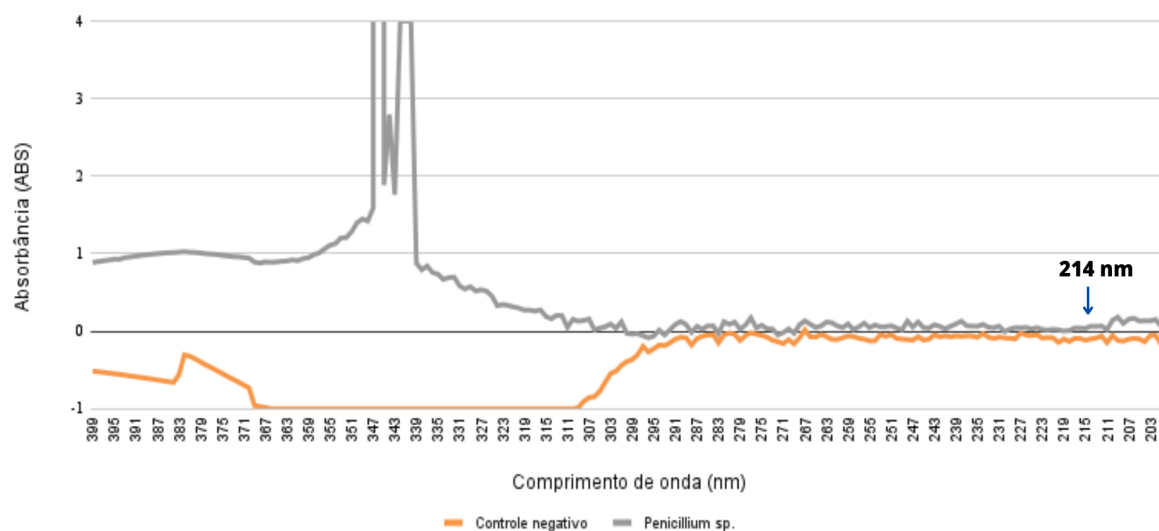
Figura 15 - Espectro de absorção do tratamento fúngico *Aspergillus* sp.CCMIBA_R56 e controle negativo. Pico em 214 nm indicado pela seta.



Fonte: AUTORA (2023)

No ensaio com *Penicillium* sp. CCMIBA_2G, o pico de absorbância ocorreu no comprimento de onda de 214 nm, sendo os valores do controle negativo e do tratamento com fungo, respectivamente, de $ABS_{214} = -0,2074$ e $ABS_{214} = 0,0303$ (figura 16).

Figura 16 - Espectro de absorção do tratamento fúngico *Penicillium* sp.CCMIBA_2G e controle negativo. A seta indica o pico de absorção a 214 nm.



Fonte: AUTORA (2023)

6. DISCUSSÃO

O BFA utilizado no presente trabalho estava na forma cristalina, em pérolas, e trata-se de uma substância insolúvel em água. Conforme a literatura (SOUZA, 2018) para utilização deve-se fazer a mistura em solventes orgânicos, geralmente etanol ou acetonitrila 50% ou 100%. No presente trabalho, conseguiu-se reduzir a porcentagem de etanol usado da suspensão de estoque para 5,4 %, fazendo com que no meio de cultivo a concentração fosse menor ainda, uma vez que foi adicionado 200 uL para 20 mL de meio. Após o resfriamento do preparo da suspensão, obteve-se um produto ainda na íntegra, assim como o tamanho das partículas de microplásticos que estarão presentes em situações práticas de biorremediação dos ambientes contaminados.

A partir dos resultados dos ensaios de fitotoxicidade e seus percentuais de inibição (tabelas 1 e 2), analisando os controles negativos dos tratamentos, os ensaios com os basidiomicetos *Bjerkandera* sp. CCMIBA_R111 e *Trametes* sp. CCMIBA_2AQ permitiram a germinação das sementes, demonstrando a baixa toxicidade do controle com BFA (sem fungo). Por outro lado, os controles dos ensaios dos ascomicetos *Aspergillus* sp. CCMIBA_R56 e *Penicillium* sp. CCMIBA_2G continuaram tóxicos. Os meios de cultivo para cada filo eram diferentes, no caso dos basidiomicetos o meio final de tratamento foi o MEA, que contém extrato de levedura, extrato de malte e glicose, já para os ascomicetos foi usado o meio CY sem a fonte de carbono. Possivelmente, algum reagente do MEA possa ter reagido com o BFA, diminuindo sua toxicidade. Contudo, a partir dos perfis espectrofotométricos é possível observar ainda, provavelmente, a presença do BFA.

Diante desse perfil, não podemos descartar o potencial de diminuição da toxicidade dos basidiomicetos no presente trabalho, que pode ser confirmada pela redução dos picos de BFA nos perfis espectrofotométricos. Já para os ascomicetos, apesar de mostrarem crescimento (apêndice C e E), mesmo com BFA como única fonte de carbono, não houve mudança nos picos espectrofotométricos, confirmando a inibição da germinação das sementes

Grande variação na capacidade de germinação também foi registrada nos controles positivos dos ensaios, na qual foi utilizada apenas água destilada estéril, o que pode justificar o grande desvio padrão dos tratamentos. Um possível motivador

desta situação, poderia ser a maneira de armazenamento das sementes, uma vez que as condições de umidade e temperatura; localização; severidade de danos físicos causados e a incidência de patógenos, juntamente com as condições fisiológicas iniciais das sementes, podem ocasionar diferença do comportamento de germinação entre lotes de sementes armazenadas (NAKADA *et al.*, 2010).

No que diz respeito aos valores de germinação das sementes submetidas aos tratamentos com *Bjerkandera* sp. e *Trametes* sp. na presença de BFA, esses podem estar correlacionados com a concentração do bisfenol A (BFA) e seus diversos efeitos. Em um estudo envolvendo a espécie *Arabidopsis thaliana*, foi demonstrado que o BFA pode influenciar a germinação de maneira dose-dependente, onde baixas concentrações de BFA desempenham um papel positivo na estimulação do aumento do peso fresco das plântulas de *A. thaliana*, bem como no crescimento da raiz principal. Por outro lado, altas concentrações de BFA apresentam um efeito inibitório, levando à redução do peso fresco das plântulas. Além disso, o estudo também ressalta que o BFA afeta a germinação de forma mais pronunciada em condições de ausência de luz (PAN *et al.*, 2013).

Ademais, os resultados de diminuição da toxicidade pelos basidiomicetos possivelmente não foram expressamente evidenciados uma vez que é de conhecimento geral que os fungos são potenciais produtores de metabólitos secundários fitotóxicos que podem afetar o desenvolvimento de sementes, como a germinação das radículas. Os fungos pertencentes ao filo Basidiomycota se destacam pela ação de decomposição de materiais lignocelulósicos, sendo capazes de converter e mineralizar a lignocelulose em dióxido de carbono e água. Dentre os principais grupos, espécies do gênero *Trametes* são capazes de degradar a lignina (SILVA, 2018). Os fungos dos gêneros *Bjerkandera* sp. e *Trametes* sp., são sintetizadores de metabólitos mediadores, como álcool veratrílico, que oxida a lignina por meio da infiltração na parede celular vegetal, bem como o ácido oxálico, na qual está envolvida em processo de biodegradação lignocelulósico, levando-a desestruturação da microfibrilas, e conseqüentemente o aumento de porosidade da parede celular (AGUIAR; FERRAZ, 2011). O efeito inibidor da germinação foi observado no estudo que analisou a desintoxicação da atrazina pelo *Bjerkandera* sp. CCMIBA_R111 onde o controle do fungo (meio de cultivo e fungo), sem o poluente

teste (atrazina) mostrou-se tóxicos para a germinação de *C. sativus* (ANDRETTA, 2022).

Para os fungos ascomicetos, trabalhos abordam a presença de antraquinonas fitotóxicas em espécies do gênero *Aspergillus*, sendo capazes de inibir a germinação em sementes de trigo (*Triticum aestivum*) e rabanete (*Rahanus sativus*). A presença de antraquinona também foi encontrada em espécies do gênero *Penicillium*, na qual também inibiram o crescimento de raízes e hipocótilo de *Rahanus sativus*. Outros metabólitos encontrados em *Penicillium* sp. e que também demonstraram atividade fitotóxicas e inibitórias na germinação, foram: macrolídeos aromáticos; sesquiterpenóides e lactamas (XU *et al.*, 2021).

Para indicação do potencial ligninolítico, no presente trabalho foi selecionada a enzima lacase, uma vez que é a enzima mais estudada para a degradação do BFA (CHEN *et al.*, 2016). Porém outras enzimas, como a lignina peroxidase e manganês peroxidase podem apresentar atividade na degradação do microplástico. A ausência de atividade de lacase nos tratamentos fúngicos, não se deve somente à cepa fúngica selecionada, mas poderia estar associada a diversos fatores e condições, como a composição do meio de cultura; o tempo de cultivo; agitação; pH do meio e outros (BAPTISTA *et al.*, 2012). A produção de lacase também é impulsionada pela presença de indutores, sendo esses compostos fenólicos relacionados à lignina ou derivados de lignina (GIANFREDA; XU; BOLLAG, 1999). Ademais, determinadas concentrações de nitrogênio podem ser necessárias para produção de lacases por *Bjerkandera* spp. (IKEHATA; BUCHANAN; SMITH, 2004).

Em vista das variações observadas na germinação de *C. sativus*, os testes de fitotoxicidade podem ser realizados com espécies bioindicadoras alternativas. A *Vicia faba* L., pertencente à família Fabaceae, é utilizada por Jiang *et al.* (2019) para analisar os efeitos tóxicos de nano e microplásticos nos meristemas das raízes, demonstrando efeitos inibitórios no crescimento e na biomassa. Além disso, essa espécie também é proposta como um indicador confiável para estimar os níveis de contaminação por petróleo bruto leve em solos (ALAVI *et al.*, 2022).

Alternativamente, a *A. thaliana* também mostra como uma escolha para a realização de estudos envolvendo o BFA, considerando a influência do composto sobre o seu desenvolvimento. Experimentos demonstraram que o BFA influencia a

germinação e o comprimento das raízes principais, bem como afeta significativamente o peso fresco (PAN *et al.*, 2013). Além disso, um outro organismo que pode ser considerado para futuras estudos é o *Lepidium sativum* L., frequentemente utilizado em estudos ecotoxicológicos e para a análise dos efeitos adversos dos microplásticos (PFLUGMACHER *et al.*, 2021).

Em suma, para estudos futuros, independente do bioindicador escolhido, faz-se necessária a realização de ensaio controle com as cepas microbianas sem o componente teste, para detectar inibições produzidas pelos metabólitos fúngicos.

O objetivo principal do trabalho foi avaliar a metodologia de triagem, porém o potencial dos fungos basidiomicetos detectados nos resultados não deve ser descartado. *Trametes polyzona* exibiu um notável potencial de degradação, conforme evidenciado nos experimentos conduzidos por Chairin *et al.* (2013). Nesse estudo, a lacase purificada do fungo, em combinação com 1-hidroxibenzo-triazol (HBT), demonstrou efetivamente a capacidade de eliminar completamente 100 mg/L de BFA contido em uma mistura, em apenas 3 horas. A análise do produto resultante da reação de degradação do BFA foi realizada por meio da técnica de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (GC-MS). O potencial biodegradável de *Trametes versicolor* também foi investigado, evidenciando sua capacidade de remover BFA em uma concentração de 4,6 mg/L após um período de sete dias. A absorção e a biotransformação pelo fungo são possíveis mecanismos implicados no desaparecimento do BFA no meio, representando um potencial para biodescontaminação (Traversa *et al.*, 2012).

Em um estudo foram avaliadas oito cepas de fungos ligninolíticos, incluindo a espécie *Bjerkandera adusta*, para a degradação do bisfenol A (BFA). Observou-se que, nos primeiros três dias de cultivo, a espécie foi capaz de degradar o BFA abaixo do limite de detecção. Embora o fungo tenha demonstrado capacidade de remover o BFA da solução, foram formados produtos intermediários de degradação com atividade estrogênica (CAJTHAML *et al.*, 2009). O processo de degradação envolveu a atuação de enzimas, como a lacase dependente e independente de manganês, bem como a lignina peroxidase. Essas enzimas foram capazes de remover totalmente 10 mg/L de BFA em um período de 14 dias (TORRES-GARCÍA *et al.*, 2022).

Em um estudo foram avaliadas oito cepas de fungos ligninolíticos, incluindo a espécie *Bjerkandera adusta*, para a degradação do bisfenol A (BFA). Observou-se que, nos primeiros três dias de cultivo, a espécie foi capaz de degradar o BFA abaixo do limite de detecção. Embora o fungo tenha demonstrado capacidade de remover o BFA da solução, foram formados produtos intermediários de degradação com atividade estrogênica (CAJTHAML *et al.*, 2009). O processo de degradação envolveu a atuação de enzimas, como a lacase dependente e independente de manganês, bem como a lignina peroxidase. Essas enzimas foram capazes de remover totalmente 10 mg/L de BFA em um período de 14 dias (TORRES-GARCÍA *et al.*, 2022).

É evidente que os fungos *Bjerkandera* sp. CCMIBA_R111 e *Trametes* sp. CCMIBA_2AQ mostraram-se microrganismos promissores para a remediação do bisfenol A (BFA), considerando os resultados obtidos na avaliação de detecção de BFA no espectrofotômetro e os ensaios de fitotoxicidade. Nesse contexto, torna-se relevante realizar estudos subsequentes com esses fungos, visando estimular a produção de lacase, uma vez que diversos estudos abordados anteriormente indicam altas taxas de degradação de BFA pelo seu sistema extracelular ligninolítico.

Em relação aos fungos não ligninolíticos, há evidências em estudos que indicam sua capacidade de degradar o BFA em compostos mais complexos, os quais podem ser posteriormente degradados e mineralizados por meio de um consórcio fúngico (Torres-García *et al.*, 2022). Diante disso, torna-se relevante realizar avaliações envolvendo consórcios fúngicos com espécies de fungos não ligninolíticos previamente descritos com potencial para degradar o BFA.

Em estudos subsequentes, é necessário realizar testes com diferentes concentrações de BFA, a fim de determinar a concentração tóxica para os fungos *Bjerkandera* sp. CCMIBA_R111 e *Trametes* sp. CCMIBA_2AQ. Ademais, uma otimização na avaliação de degradação de BFA deve ser realizada ao empregar a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) para a quantificação precisa do BFA, considerando a eficácia dessa técnica na detecção desse composto.

7. CONCLUSÃO

O bisfenol A (BFA) apresentou suspensão em uma mistura contendo 5,4% de etanol absoluto e pH 7,6, na qual foi possível preparar os tratamentos de biodegradação fúngica com uma concentração de 10 mg/L de BFA. Durante a avaliação da degradação do BFA, o ensaio de fitotoxicidade com sementes de *C. sativus* revelou-se inadequado como um bioindicador eficiente, devido à alta variabilidade na germinação e à sensibilidade aos metabólitos fúngicos. Portanto, sugere-se realizar futuros ensaios e utilizar outras espécies de sementes sensíveis às toxinas, como *Lepidium sativum*, *Vicia faba* e *Arabidopsis thaliana*, conhecendo-se a sensibilidade que exibem na germinação ou no desenvolvimento das demais estruturas vegetais.

O uso do espectrofotômetro UV-Vis mostrou-se como um método complementar para avaliar a degradação do bisfenol A (BFA), porém, por si só, não possui sensibilidade suficiente para permitir uma análise eficiente na detecção do BFA. Diante dessa limitação, após a triagem e seleção dos fungos com potencial de biorremediação, torna-se relevante realizar avaliações adicionais utilizando-se a técnica de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC), devido à sua capacidade de detectar o BFA e seus compostos em concentrações baixas, assim proporcionando uma maior sensibilidade e precisão na quantificação do BFA.

Com base no potencial observado dos fungos *Bjerkandera* sp. CCMIBA_R111 e *Trametes* sp. CCMIBA_2AQ, surge a necessidade de realizar estudos subsequentes para explorar seu potencial ligninolítico e sua atividade na degradação de BFA, conforme evidenciado em diversos trabalhos.

8. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

AGUIAR, A.; FERRAZ, A. Mecanismos envolvidos na biodegradação de materiais lignocelulósicos e aplicações tecnológicas correlatas. **Química Nova**, 2011.

AKDOGAN, Z.; GUVEN, B. Microplastics in the environment: A critical review of current understanding and identification of future research needs. **Environmental Pollution**, v. 254, p. 113011, nov. 2019.

ALAVI, E. et al. **Vicia faba seed: A bioindicator of phytotoxicity, genotoxicity, and cytotoxicity of light crude oils**. [s.l.] In Review, 5 abr. 2022. Disponível em: <<https://www.researchsquare.com/article/rs-1423421/v1>>. Acesso em: 1 jun. 2023.

ALONSO, A. L. F. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. p. 63, 2014.

ANDRETTA, A. **Análise da fitotoxicidade da atrazina após biodegradação fúngica**. 2022. 60p. Universidade Federal da Integração Latino-Americana, Foz do Iguaçu, 2022.

ASEMOLOYE, M. D. et al. Genome-based engineering of ligninolytic enzymes in fungi. **Microbial Cell Factories**, v. 20, n. 1, p. 20, dez. 2021.

BAHO, D. L.; BUNDSCHUH, M.; FUTTER, M. N. Microplastics in terrestrial ecosystems: Moving beyond the state of the art to minimize the risk of ecological surprise. **Global Change Biology**, v. 27, n. 17, p. 3969–3986, set. 2021.

BALCÁZAR-LÓPEZ, E. et al. Xenobiotic Compounds Degradation by Heterologous Expression of a *Trametes sanguineus* Laccase in *Trichoderma atroviride*. **PLOS ONE**, v. 11, n. 2, p. e0147997, 5 fev. 2016.

BALTIERRA-TREJO, E.; MÁRQUEZ-BENAVIDES, L.; SÁNCHEZ-YÁÑEZ, J. M. Inconsistencies and ambiguities in calculating enzyme activity: The case of laccase. **Journal of Microbiological Methods**, v. 119, p. 126–131, dez. 2015.

BAPTISTA, N. M. Q. ; SANTOS, A. C.; ARRUDA, F. V. F.; GUSMÃO N. B., Produção das Enzimas Lignina Peroxidase e Lacase por Fungos Filamentosos - **SCIENTIA PLENA** VOL. 8, NUM. 1 2012 pg.4

BARCELLOS, Ema Carolina Almeida. **Bioprospecção de fungo com potencial de biodegradação do Bisfenol A: avaliação da metodologia de seleção**. 2019. 49 p. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Biotecnologia) – Universidade Federal da Integração Latino-Americana, Foz do Iguaçu, 2019.

BARNES, D. K. A. et al. Accumulation and fragmentation of plastic debris in global environments. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 364, n. 1526, p. 1985–1998, 27 jul. 2009

BEN OUADA, S. et al. Effect of Bisphenol A on the extremophilic microalgal strain *Picocystis* sp. (Chlorophyta) and its high BPA removal ability. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 158, p. 1–8, ago. 2018.

BESERRA, M. R.; SCHIAVINI, J. DE A.; RODRIGUES, W. C. Sua Utilização e a Atual Polêmica em Relação aos Possíveis Danos à Saúde Humana. **Revista Eletrônica TECEN**, v. 5, n. 1, p. 9, 2012.

BITENCOURT BELO, I. C. et al. MICROPLÁSTICOS, SEUS IMPACTOS NO AMBIENTE E MANEIRAS BIODEGRADÁVEIS DE SUBSTITUIÇÃO. **Revista Internacional de Ciências**, v. 11, n. 2, p. 214–228, 31 ago. 2021.

BONUGLI-SANTOS, R. C. et al. Production of laccase, manganese peroxidase and lignin peroxidase by Brazilian marine-derived fungi. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 46, n. 1, p. 32–37, jan. 2010.

BOUAICHA, O. et al. Plant species-specific impact of polyethylene microspheres on seedling growth and the metabolome. **Science of The Total Environment**, v. 840, p. 156678, set. 2022.

BROWNE, M. A. et al. Ingested Microscopic Plastic Translocates to the Circulatory System of the Mussel, *Mytilus edulis* (L.). **Environmental Science & Technology**, v. 42, n. 13, p. 5026–5031, 1 jul. 2008.

BULL, A. T.; WARD, A. C.; GOODFELLOW, M. Search and Discovery Strategies for Biotechnology: the Paradigm Shift. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 64, n. 3, p. 573–606, set. 2000.

CANHOS, V. P; MAFIO, G. P. Recursos Microbiológicos para Biotecnologia. [s.d.].

CARDOSO I, L. Bisphenol A in Odontology: Recent data. **Clinical Research and Trials**, v. 5, n. 5, 2019.

CHAI, W. et al. Biodegradation of Bisphenol A by Fungi. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 120, n. 3, p. 175–182, 2005.

CHAIRIN, T. et al. Biodegradation of Bisphenol A and Decolorization of Synthetic Dyes by Laccase from White-Rot Fungus, *Trametes polyzona*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 169, n. 2, p. 539–545, jan. 2013.

CHEN, Y. et al. Cell Surface Display Fungal Laccase as a Renewable Biocatalyst for Degradation of Persistent Micropollutants Bisphenol A and Sulfamethoxazole. **Environmental Science & Technology**, v. 50, n. 16, p. 8799–8808, 16 ago. 2016.

CHHAYA, U.; GUPTA, A. Possible role of laccase from *Fusarium incarnatum* UC-14 in bioremediation of Bisphenol A using reverse micelles system. **Journal of Hazardous Materials**, v. 254–255, p. 149–156, jun. 2013.

CHOI, H. T.; SONG, H.-G. Biodegradation of Endocrine-disrupting Bisphenol A by White Rot Fungus. p. 5, 2007.

CHUNG, Y. H. et al. Inhalation Toxicity of Bisphenol A and Its Effect on Estrous Cycle, Spatial Learning, and Memory in Rats upon Whole-Body Exposure. **Toxicological Research**, v. 33, n. 2, p. 165–171, 15 abr. 2017.

DAÂSSI, D. et al. Degradation of bisphenol A by different fungal laccases and identification of its degradation products. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 110, p. 181–188, maio 2016.

DAVIES, J. **Solid-phase extraction of bisphenol A in water using carbon nanotube envelopes**. Master of Science—Ottawa, Ontario: Carleton University, 2011.

DEVESA-REY, R.; MOLDES, A.B.; DÍAZ-FIERROS, F.; BARRAL, M.T. Toxicity of Anllóns River Sediment Extracts Using Microtox and the Zucconi Phytotoxicity Test. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 80, p. 225–230, 2008.

EDMONDSON, S.; GILBERT, M. The Chemical Nature of Plastics Polymerization. Em: **Brydson's Plastics Materials**. [s.l.] Elsevier, 2017. p. 19–37.

ELTOUKHY, A. et al. Biodegradation of endocrine disruptor Bisphenol A by *Pseudomonas putida* strain YC-AE1 isolated from polluted soil, Guangdong, China. **BMC Microbiology**, v. 20, n. 1, p. 11, dez. 2020.

FENDALL, L. S.; SEWELL, M. A. Contributing to marine pollution by washing your face: Microplastics in facial cleansers. **Marine Pollution Bulletin**, v. 58, n. 8, p. 1225–1228, ago. 2009.

FARIAS, Gabriele Santana. **Fungos basidiomicetos de solos de recuo da geleira Collins (Antártica): caracterização taxonômica e aplicação ambiental**. 77 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Aplicada) - Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2022.

FISKESJÖ, G. The Allium test as a standard in environmental monitoring. **Hereditas**, v. 102, n. 1, p. 99–112, 1985.

FOUDA, A. et al. Biodegradation and Detoxification of Bisphenol-A by Filamentous Fungi Screened from Nature. **Journal of Advances in Biology & Biotechnology**, v. 2, n. 2, p. 123–132, 10 jan. 2015.

GAYLARDE, C. C. Aspectos biológicos e técnicos da biorremediação de xenobióticos. p. 8, 2005.

Green Marketing in the Plastic Era: Honesty or Hype? (2019, 18 septiembre). The Green Chemistry Initiative Blog.

<https://greenchemuoft.wordpress.com/2019/09/13/green-marketing-in-the-plastic-era-honesty-or-hype/>

GIANFREDA, L.; XU, F.; BOLLAG, J.-M. Laccases: A Useful Group of Oxidoreductive Enzymes. **Bioremediation Journal**, v. 3, n. 1, p. 1–26, jan. 1999.

GIRI, S.; MUKHERJEE, A. Eco-corona reduces the phytotoxic effects of polystyrene nanoplastics in *Allium cepa*: Emphasizing the role of ROS. **Environmental and Experimental Botany**, v. 198, p. 104850, jun. 2022.

HORTON, A. A. et al. Microplastics in freshwater and terrestrial environments: Evaluating the current understanding to identify the knowledge gaps and future research priorities. **Science of The Total Environment**, v. 586, p. 127–141, maio 2017.

IKE, M. et al. Acute toxicity, mutagenicity, and estrogenicity of biodegradation products of bisphenol-A. **Environmental Toxicology**, v. 17, n. 5, p. 457–461, 2002.

IKEHATA, K.; BUCHANAN, I. D.; SMITH, D. W. Recent developments in the production of extracellular fungal peroxidases and laccases for waste treatment. **Journal of Environmental Engineering and Science**, v. 3, n. 1, p. 1–19, 1 jan. 2004.

JIANG, X. et al. Ecotoxicity and genotoxicity of polystyrene microplastics on higher plant *Vicia faba*. **Environmental Pollution**, v. 250, p. 831–838, jul. 2019.

KABIERSCH, G. et al. Fate of bisphenol A during treatment with the litter-decomposing fungi *Stropharia rugosoannulata* and *Stropharia coronilla*. **Chemosphere**, v. 83, n. 3, p. 226–232, abr. 2011.

KANG, J.; KATAYAMA, Y.; KONDO, F. Biodegradation or metabolism of bisphenol A: From microorganisms to mammals. **Toxicology**, v. 217, n. 2–3, p. 81–90, 16 jan. 2006.

KLEČKA, G. M. et al. Biodegradation of bisphenol a in aquatic environments: River die-away. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 20, n. 12, p. 2725–2735, dez. 2001.

KUMAR, A.; CHANDRA, R. Ligninolytic enzymes and its mechanisms for degradation of lignocellulosic waste in environment. **Heliyon**, v. 6, n. 2, p. e03170, fev. 2020.

LANG, Y. **Influence of Microplastics on Environmental and Human Health: Key Considerations and Future Perspectives**. 1. ed. Boca Raton: CRC Press, 2022.

LI, J.-H.; ZHOU, B.-X.; CAI, W.-M. The Solubility Behavior of Bisphenol A in the Presence of Surfactants. **Journal of Chemical & Engineering Data**, v. 52, n. 6, p. 2511–2513, 1 nov. 2007.

LI, L. et al. Effective uptake of submicrometre plastics by crop plants via a crack-entry mode. **Nature Sustainability**, v. 3, n. 11, p. 929–937, nov. 2020.

MARTÍNKOVÁ, L. et al. Biodegradation of phenolic compounds by Basidiomycota and its phenol oxidases: A review. **Chemosphere**, v. 149, p. 373–382, abr. 2016.

MTIBAÀ, R. et al. Degradation of bisphenol A and acute toxicity reduction by different thermo-tolerant ascomycete strains isolated from arid soils. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 156, p. 87–96, jul. 2018.

MOHAN, A. J. et al. Microbial assisted High Impact Polystyrene (HIPS) degradation. **Bioresource Technology**, v. 213, p. 204–207, ago. 2016.

NAKADA, P. G. et al. Desempenho durante o armazenamento de sementes de pepino submetidas a diferentes métodos de secagem. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 32, n. 3, p. 42–51, set. 2010.

NUGROHO, B.; PRAMUDYA, Y.; WIDODO, W. The Content Analysis of Bisphenol A (BPA) on Water in Plastic Glass with Varying Temperatures and Contact Times using UV-VIS Spectrophotometer. **Indonesian Review of Physics**, v. 1, n. 2, p. 27, 30 maio 2019.

PAN, W.-J. et al. Effect of BPA on the germination, root development, seedling growth and leaf differentiation under different light conditions in *Arabidopsis thaliana*. **Chemosphere**, v. 93, n. 10, p. 2585–2592, nov. 2013.

PFLUGMACHER, S. et al. Ageing affects microplastic toxicity over time: Effects of aged polycarbonate on germination, growth, and oxidative stress of *Lepidium sativum*. **Science of The Total Environment**, v. 790, p. 148166, out. 2021.

QI, Y. et al. Macro- and micro- plastics in soil-plant system: Effects of plastic mulch film residues on wheat (*Triticum aestivum*) growth. **Science of The Total Environment**, v. 645, p. 1048–1056, dez. 2018.

ROCHA, B.S. **Fitotoxicidade do corante laranja reativo 64 como efluente têxtil tratado por oxidação avançada (US/H₂O₂)**. 50 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Engenharia Química) - Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, Rio Grande do Norte, 2017.

RODRIGUES, J. P. et al. Significance of interactions between microplastics and POPs in the marine environment: A critical overview. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 111, p. 252–260, fev. 2019.

SÁNCHEZ, C. Fungal potential for the degradation of petroleum-based polymers: An overview of macro- and microplastics biodegradation. **Biotechnology Advances**, v. 40, p. 107501, maio 2020.

SHAW, D.; SAHNI, P. Plastic to oil. v. 46, 10 jan. 2014.

SILVA, A. **Identificação e potencial degradativo de fungos lignocelulolíticos associados às podridões brancas e parda**. 2018. 85p. Dissertação (Programa de Pós-graduação em Fitopatologia). Universidade de Brasília. Brasília (DF), 2018.

SOUZA, Angélica Vieira da Silva Bertoncello. **Otimização da produção de lacase pelo fungo *Trametes sp.* para a biorremediação de bisfenol A em meio aquoso**. 144p. Dissertação (Mestrado Meio Ambiente Urbano e Industrial,). Universidade Federal do Paraná, 2018.

SUMAN, T. Y. et al. Characterization of petroleum-based plastics and their absorbed trace metals from the sediments of the Marina Beach in Chennai, India. **Environmental Sciences Europe**, v. 32, n. 1, p. 110, dez. 2020.

TARAFDAR, A. et al. The hazardous threat of Bisphenol A: Toxicity, detection and remediation. **Journal of Hazardous Materials**, v. 423, p. 127097, fev. 2022.

TORRES-GARCÍA, J. L. et al. Bisphenol A in the environment and recent advances in biodegradation by fungi. **Chemosphere**, v. 303, p. 134940, set. 2022.

TORRES-GARCÍA, J. L. et al. Bisfenol A: un problema de carácter mundial y el uso de hongos como estrategia para su biorremediación. **Frontera Biotecnologica**. Instituto Politécnico Nacional 18, 10–13, enero - abril. 2021.

VANDENBERG, L. N. et al. Bisphenol-A and the Great Divide: A Review of Controversies in the Field of Endocrine Disruption. **Endocrine Reviews**, v. 30, n. 1, p. 75–95, 1 fev. 2009.

WANG, F. et al. Interactions of microplastics and cadmium on plant growth and arbuscular mycorrhizal fungal communities in an agricultural soil. **Chemosphere**, v. 254, p. 126791, set. 2020.

WANG, J. et al. Metabolism of bisphenol A by hyper lignin-degrading fungus *Phanerochaete sordida* YK-624 under non-ligninolytic condition. **Chemosphere**, v. 109, p. 128–133, ago. 2014.

WANG, X. et al. Validation of germination rate and root elongation as indicator to assess phytotoxicity with *Cucumis sativus*. **Chemosphere**, v. 44, n. 8, p. 1711–1721, set. 2001.

WANG, Xiaodong. et al. Validation of germination rate and root elongation as indicator to assess phytotoxicity with *Cucumis sativus*. **Chemosphere**, v. 44, p. 1711-1721, 2001.

XU, D. et al. Phytotoxic Secondary Metabolites from Fungi. **Toxins**, v. 13, n. 4, p. 261, 6 abr. 2021.

YU, Y. et al. Polystyrene microplastics (PS-MPs) toxicity induced oxidative stress and intestinal injury in nematode *Caenorhabditis elegans*. **Science of The Total Environment**, v. 726, p. 138679, jul. 2020.

ZHANG, C. et al. Edible fungus degrade bisphenol A with no harmful effect on its fatty acid composition. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 118, p. 126–132, ago. 2015.

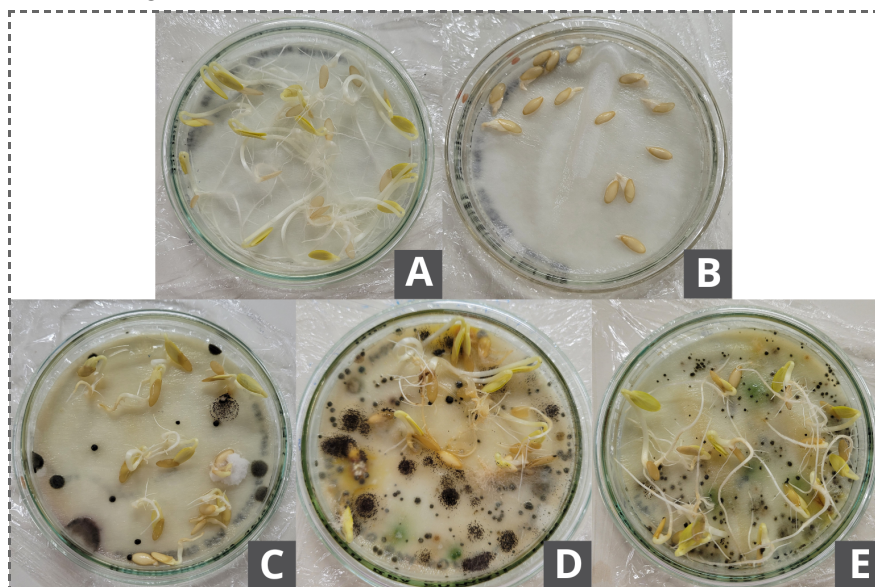
ZHANG, G. S.; ZHANG, F. X.; LI, X. T. Effects of polyester microfibers on soil physical properties: Perception from a field and a pot experiment. **Science of The Total Environment**, v. 670, p. 1–7, jun. 2019.

ZHANG, W.; YIN, K.; CHEN, L. Bacteria-mediated bisphenol A degradation. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 97, n. 13, p. 5681–5689, jul. 2013.

APÊNDICES

APÊNDICE A - ENSAIO DE FITOTOXICIDADE PARA DETERMINAÇÃO DE CONCENTRAÇÃO DE BFA

Figura - Ensaio de fitotoxicidade com *Cucumis sativus* para determinar a concentração tóxica de BFA para aplicação nos tratamentos fúngicos. (A) Controle positivo; (B) Controle negativo (ZnSO₄); (C) Tratamento BFA 10 mg/L; (D) Tratamento BFA 50 mg/L; (E) Tratamento BFA 100 mg/L.



Fonte: AUTORA (2023)

Tabela - Resultado da germinação (cm) das sementes de *Cucumis sativus* do Ensaio de fitotoxicidade para determinação da concentração tóxica de BFA para aplicação nos tratamentos fúngicos.

Controle positivo (água)	Controle negativo (ZnSO ₄)	Tratamento BFA 10 mg/L	Tratamento BFA 50 mg/L	Tratamento BFA 100 mg/L
12,3	0	0,8	1,2	6,7
12,6	0	1,3	2,0	6,5
15,3	0	1,5	1,5	3,8
16,1	0	2,0	2,7	6,9
13,5	0	3,3	3,9	3,2
13,2	0,5	2,3	3,4	5,4
14,6	0	2,5	1,7	6,7
13,6	0	0,5	0,9	5,8
15,5	0	0,5	0	4,1
12,8	0,5	0,5	1,4	5,8
14,1	0	1,2	0,7	3,3
14,6	0,5	0	1,2	6,0
12,3	0	1,1	1,5	8,4
12,2	0,7	0,5	0,9	6,7
18,2	0	0	2,1	1,2

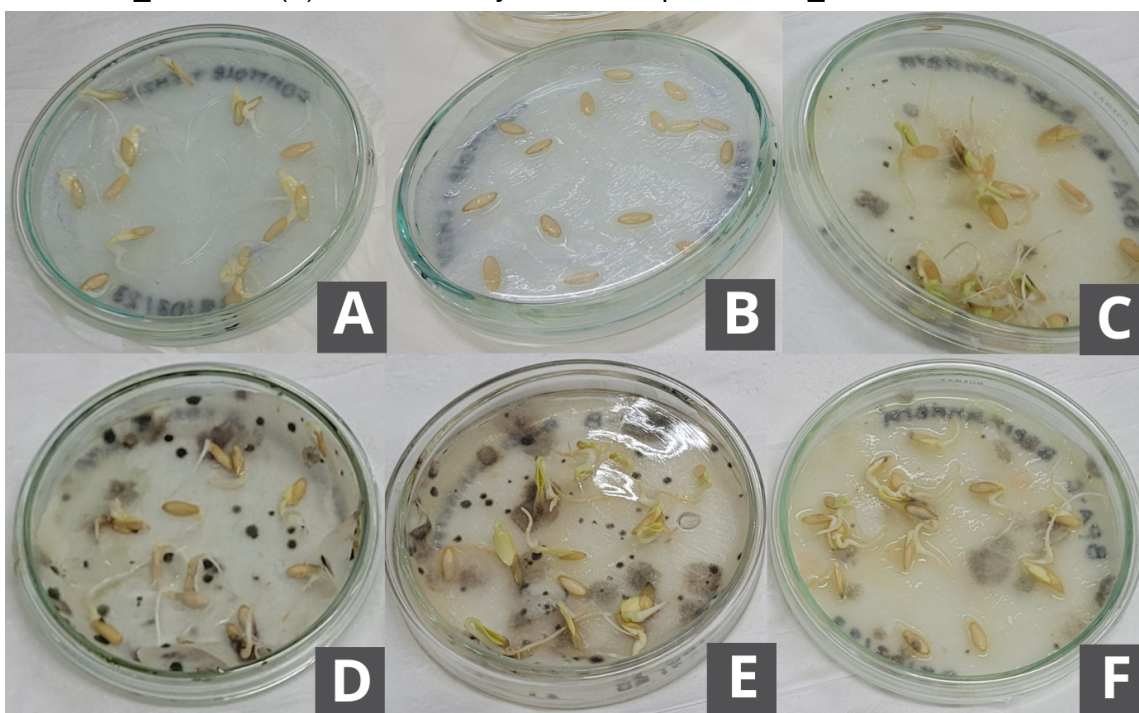
APÊNDICE B - ENSAIO DE FITOTOXICIDADE COM CCMIBA_R111

Figura - Aspecto morfológico dos cultivos de pré-inóculo do *Bjerkandera* sp. CCMIBA_R111 em meio líquido após cinco dias.



Fonte: AUTORA (2023)

Figura - Ensaio de fitotoxicidade com *Cucumis sativus* e tratamento com *Bjerkandera* sp. CCMIBA_R111 (A) Controle positivo; (B) Controle negativo (ZnSO₄); (C) Controle negativo com BFA; (D) Tratamento *Bjerkandera* sp. CCMIBA_R111 - A; (E) Tratamento *Bjerkandera* sp. CCMIBA_R111 - B; (F) Tratamento *Bjerkandera* sp. CCMIBA_R111 - C.



Fonte: AUTORA (2023)

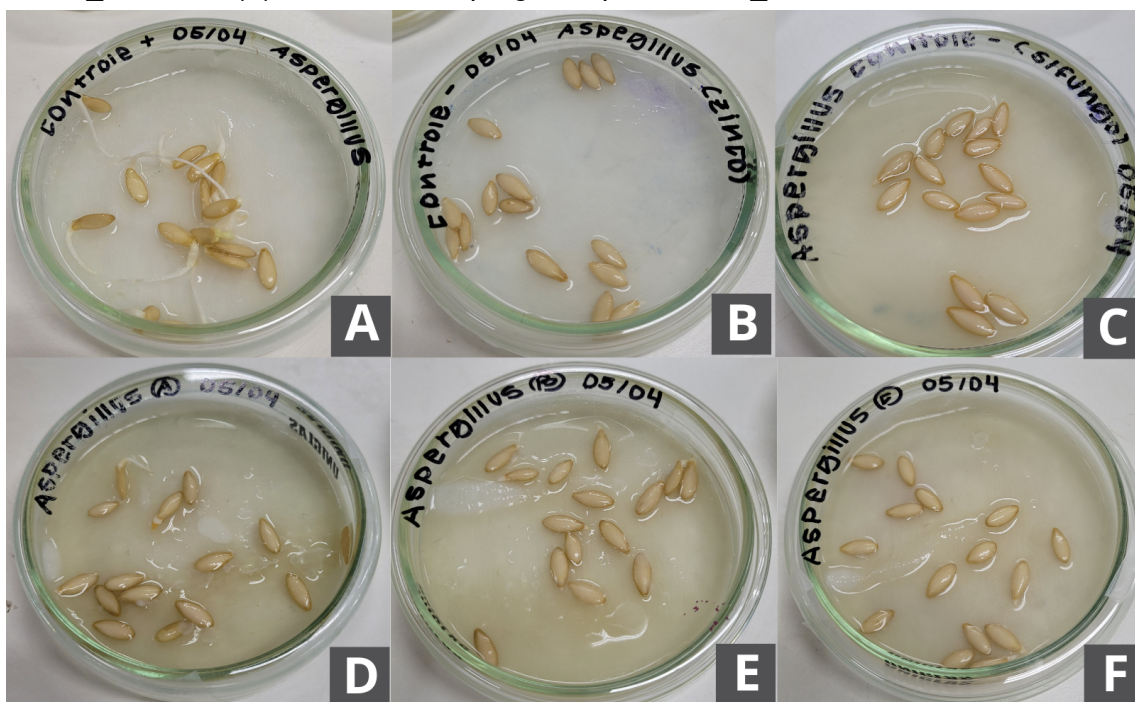
APÊNDICE C - ENSAIO DE FITOTOXICIDADE COM CCMIBA_R056

Figura - Aspecto morfológico dos cultivos de inóculos do *Aspergillus* sp. CCMIBA_R056 em meio líquido após sete dias.



Fonte: AUTORA (2023)

Figura - Ensaio de fitotoxicidade com *Cucumis sativus* e tratamento com *Aspergillus* sp. CCMIBA_R056 (A) Controle positivo; (B) Controle negativo (ZnSO₄); (C) Controle negativo com BFA; (D) Tratamento *Aspergillus* sp. CCMIBA_R056 - A; (E) Tratamento *Aspergillus* sp. CCMIBA_R056 - B; (F) Tratamento *Aspergillus* sp. CCMIBA_R056 - C.



Fonte: AUTORA (2023)

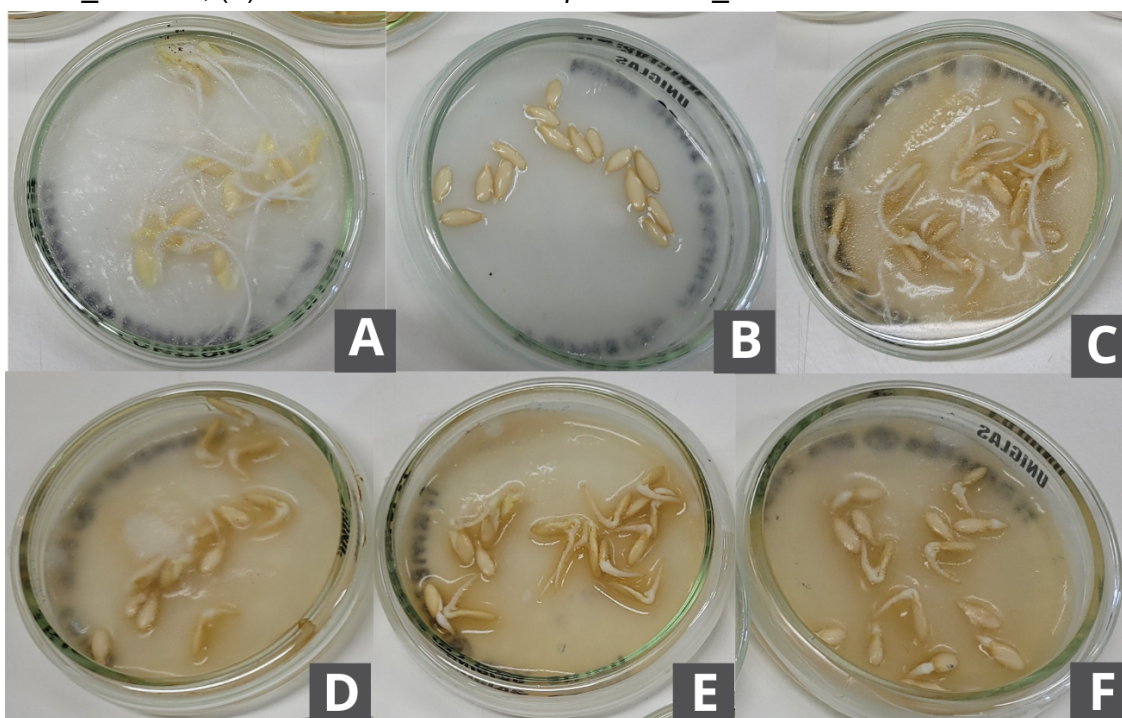
APÊNDICE D - ENSAIO DE FITOTOXICIDADE COM CCMIBA_2AQ

Figura - Aspecto morfológico dos cultivos de inóculos do *Trametes sp.* CCMIBA_2AQ e em meio líquido após sete dias.



Fonte: AUTORA (2023)

Figura - Ensaio de fitotoxicidade com *Cucumis sativus* e tratamento com *Trametes sp.* CCMIBA_2AQ (A) Controle positivo; (B) Controle negativo ($ZnSO_4$); (C) Controle negativo com BFA; (D) Tratamento *Trametes sp.* CCMIBA_2AQ- A ; (E) Tratamento *Trametes sp.* CCMIBA_2AQ - B; (F) Tratamento *Trametes sp.* CCMIBA_2AQ - C.



Fonte: AUTORA (2023)

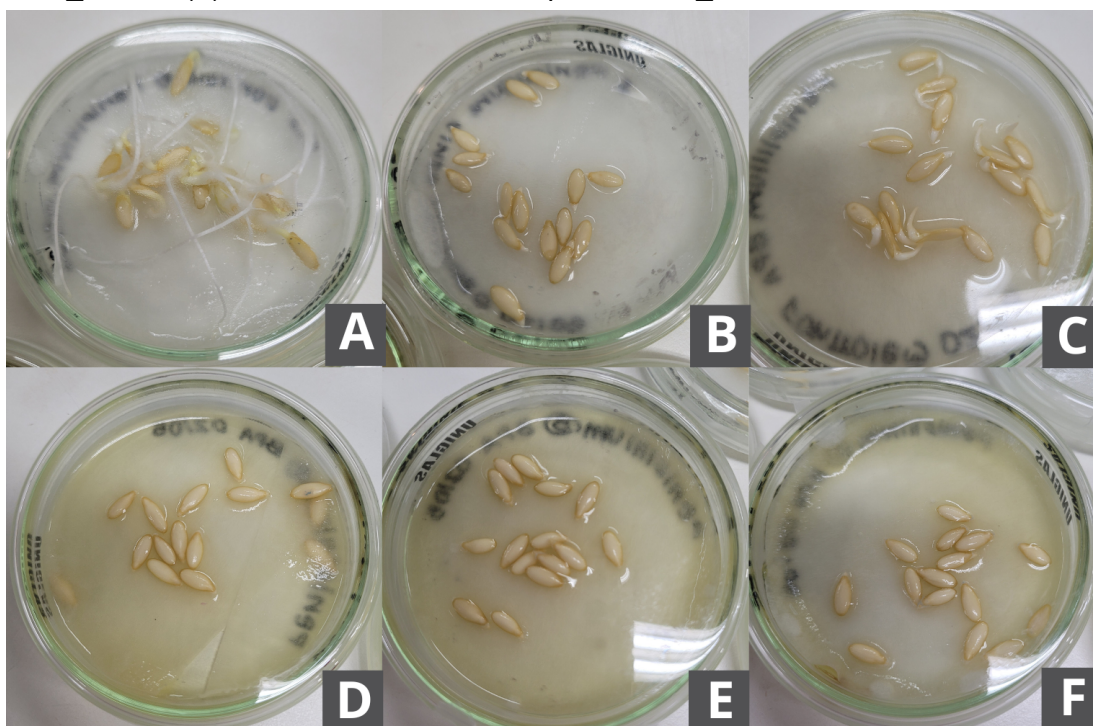
APÊNDICE E - ENSAIO DE FITOTOXICIDADE COM CCMIBA_2G

Figura - Aspecto morfológico dos cultivos de inóculos do *Penicillium sp.* CCMIBA_2G e em meio líquido após sete dias.



Fonte: AUTORA (2023)

Figura - Ensaio de fitotoxicidade com *Cucumis sativus* e tratamento com *Penicillium sp.* CCMIBA_2G (A) Controle positivo; (B) Controle negativo (ZnSO₄); (C) Controle negativo com BFA; (D) Tratamento *Penicillium sp.* CCMIBA_2G - A; (E) Tratamento *Penicillium sp.* CCMIBA_2G - B; (F) Tratamento *Penicillium sp.* CCMIBA_2G - C.



Fonte: AUTORA (2023)