



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS (UFG)
INSTITUTO DE PATOLOGIA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA (IPTSP)
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA DA RELAÇÃO
PARASITO-HOSPEDEIRO (PPGBRPH)

DULCIMÊ GONÇALVES DORTA

**Bioprospecção de microrganismos biodessulfurizantes
de borracha vulcanizada de pneu inservível**

GOIÂNIA
2021



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE PATOLOGIA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA

TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO (TECA) PARA DISPONIBILIZAR VERSÕES ELETRÔNICAS DE TESES

E DISSERTAÇÕES NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a [Lei 9.610/98](#), o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou download, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

O conteúdo das Teses e Dissertações disponibilizado na BDTD/UFG é de responsabilidade exclusiva do autor. Ao encaminhar o produto final, o autor(a) e o(a) orientador(a) firmam o compromisso de que o trabalho não contém nenhuma violação de quaisquer direitos autorais ou outro direito de terceiros.

1. Identificação do material bibliográfico

☒ [X] Dissertação ☐ [] Tese

2. Nome completo do autor

DULCIMÊ GONÇALVES DORTA

3. Título do trabalho

Bioprospecção de microrganismos biodessulfurizantes de borracha vulcanizada de pneu inservível

4. Informações de acesso ao documento (este campo deve ser preenchido pelo orientador)

Concorda com a liberação total do documento ☒ [X] SIM ☐ [] NÃO¹

[1] Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. Após esse período, a possível disponibilização ocorrerá apenas mediante:

a) consulta ao(à) autor(a) e ao(à) orientador(a);

b) novo Termo de Ciência e de Autorização (TECA) assinado e inserido no arquivo da tese ou dissertação.

O documento não será disponibilizado durante o período de embargo.

Casos de embargo:

- Solicitação de registro de patente;
- Submissão de artigo em revista científica;
- Publicação como capítulo de livro;
- Publicação da dissertação/tese em livro.

Obs. Este termo deverá ser assinado no SEI pelo orientador e pelo autor.



Documento assinado eletronicamente por **José Daniel Gonçalves Vieira, Professor do Magistério Superior**, em 13/10/2021, às 12:37, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **DULCIME GONCALVES DORTA, Discente**, em 13/10/2021, às 13:18, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **2367714** e o código CRC **1938CE4D**.

Referência: Processo nº 23070.047746/2021-91

SEI nº 2367714

DULCIMÊ GONÇALVES DORTA

**Bioprospecção de microrganismos biodessulfurizantes de
borracha vulcanizada de pneu inservível**

Dissertação apresentada à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Biologia da Relação Parasito-Hospedeiro do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública da Universidade Federal de Goiás, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Biologia da Relação Parasito-Hospedeiro.

Área de concentração: Biologia da Relação Parasito-Hospedeiro.

Linha de pesquisa: Caracterização Biológica, Molecular e Bioquímica de Parasitas Uni ou Multicelulares, Bactérias, Vírus e Fungos.

Orientador: José Daniel Gonçalves Vieira

Coorientador: Prof Dr Armando García Rodríguez

GOIÂNIA
2021

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do
Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UFG.

Dorta, Dulcimê Gonçalves

Bioprospecção de microrganismos biodessulfurizantes de borracha
vulcanizada de pneu inservível [manuscrito] / Dulcimê Gonçalves
Dorta. - 2021.

xiv, 58 f.

Orientador: Prof. Dr. José Daniel Gonçalves Vieira; co-orientador
Dr. Armando García Rodriguez.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Goiás, Instituto
de Patologia Tropical e Saúde Pública (IPTSP), Programa de Pós
Graduação em Biologia da Relação Parasito-Hospedeiro, Goiânia, 2021.

Bibliografia. Anexos.

Inclui siglas, fotografias, abreviaturas, gráfico, tabelas, lista de
figuras, lista de tabelas.

1. prospecção microbiana. 2. dessulfurização microbiana. 3.
biorremediação. 4. desvulcanização. I. Vieira, José Daniel Gonçalves,
orient. II. Título.

CDU 579.6



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS

INSTITUTO DE PATOLOGIA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA

ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO

ATA DA REUNIÃO DA BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE DULCIMÊ GONÇALVES DORTA - Aos vinte e dois dias do mês de setembro do ano de 2021 (22/09/2021), às 09h00min, reuniram-se os componentes da Banca Examinadora: Profs. Drs. **JOSÉ DANIEL GONÇALVES VIEIRA** (UFG), **ANDRÉ CORREA AMARAL** (UFG) e **AYSHA JUSSARA IVONILDE CARRIM** (UFG) para, sob a presidência do primeiro, e em sessão pública realizada por WEBCONFERÊNCIA, procederem à avaliação da defesa de dissertação intitulada: **“Determinação da capacidade de dessulfurização microbiana em borracha vulcanizada de pneu inservível”**, em nível de MESTRADO, área de concentração em **BIOLOGIA DA RELAÇÃO PARASITO-HOSPEDEIRO**, de autoria de **DULCIMÊ GONÇALVES DORTA**, discente do PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA DA RELAÇÃO PARASITO-HOSPEDEIRO, da Universidade Federal de Goiás. A sessão foi aberta pelo Orientador, Prof. Dr. **JOSÉ DANIEL GONÇALVES VIEIRA**, que fez a apresentação formal dos membros da Banca e orientou a Candidata sobre como utilizar o tempo durante a apresentação de seu trabalho. A palavra a seguir, foi concedida à autora da dissertação que, em 30 minutos procedeu à apresentação de seu trabalho. Terminada a apresentação, cada membro da Banca arguiu a Candidata, tendo-se adotado o sistema de diálogo sequencial. Terminada a fase de arguição, procedeu-se à avaliação da defesa. Tendo-se em vista o que consta na Resolução nº. 1492/2017 do Conselho de Ensino, Pesquisa, Extensão e Cultura (CEPEC), que regulamenta o Programa de Pós-Graduação em Biologia da Relação Parasito-Hospedeiro a Banca, em sessão secreta, expressou seu Julgamento, considerando a candidata Aprovada ou Reprovada:

Banca Examinadora

Prof. Dr. **José Daniel Gonçalves Vieira**
Prof. Dr. **André Correa Amaral**
Profa. Dra. **Aysha Jussara Ivonilde Carrim**

Aprovada / Reprovada

Aprovada
Aprovada
Aprovada

Em face do resultado obtido, a Banca Examinadora considerou a candidata **Habilitada**, (**Habilitada ou não Habilitada**), cumprindo todos os requisitos para fins de obtenção do título de **MESTRA EM BIOLOGIA DA RELAÇÃO PARASITO-HOSPEDEIRO**, na área de concentração em **BIOLOGIA DA RELAÇÃO PARASITO-HOSPEDEIRO**, pela Universidade Federal de Goiás. Cumpridas as formalidades de pauta, às 12 h 0 min, a presidência da mesa encerrou esta sessão de defesa de dissertação e para constar eu, **HELOÍSA DE SOUSA VIEIRA**, secretária do Programa de Pós-Graduação em Biologia da Relação Parasito-Hospedeiro, lavrei a presente Ata que depois de lida e aprovada, será assinada pelos membros da Banca Examinadora.

TÍTULO SUGERIDO PELA BANCA

Bioprospecção de microrganismos biodessulfurizantes de borracha vulcanizada de pneu inservível



Documento assinado eletronicamente por **José Daniel Gonçalves Vieira**, **Professor do Magistério Superior**, em 22/09/2021, às 11:51, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº](#)



Documento assinado eletronicamente por **André Corrêa Amaral, Professor do Magistério Superior**, em 22/09/2021, às 11:53, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Aysha Jussara Ivonilde Carrim, Técnico de Laboratório**, em 22/09/2021, às 11:59, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **2331265** e o código CRC **FBFCBC8C**.

Referência: Processo nº 23070.047746/2021-91

SEI nº 2331265

AGRADECIMENTOS

Meus sinceros agradecimentos vão, primeiramente, ao Profº José Daniel, que me acolheu e orientou desde a graduação. Obrigada pela paciência e oportunidade.

Conjuntamente, agradeço meus colegas e companheiros de laboratório, Ana Karulline, Rodolfo e especialmente, Raylane por terem me ajudado e apoiado não somente em questões do projeto, mas no dia-a-dia, assim como meu ex-pupilo Thiago.

Não devo esquecer-me de agradecer a empresa Ecotire® por fornecer o item (borracha) sem o qual a realização deste projeto não teria acontecido. Da mesma forma, agradeço ao Laboratório Multiusuário de Microscopia de Alta Resolução – UFG e Centro de Recursos Biológicos e Biologia Genômica Campus de Jaboticabal – UNESP pelos serviços prestados.

Aos meus amigos e companheiros do Cookie Club, agradeço profunda e carinhosamente pela existência de vocês. Eduardo, Gabriel, Janaina, Juliana, Maria Clara, Pedro e Salorrane, obrigada por fazerem parte desta jornada e tornarem ela mais agradável.

Por fim, mas não menos importante agradeço minha família pelo apoio, com todo o devido crédito à Edimê, minha mãe, heroína e pilar.

SUMÁRIO

TABELAS, FIGURAS E ANEXOS.....	VIII
SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS.....	IX
RESUMO.....	XI
ABSTRACT.....	XII
1. INTRODUÇÃO.....	13
2. JUSTIFICATIVA.....	26
3. OBJETIVOS.....	28
3.1. OBJETIVOS GERAIS.....	28
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	28
4. METODOLOGIA.....	29
4.1. BIOPROSPECÇÃO BACTERIANA.....	29
4.1.1. Isolamento.....	29
4.1.2. Caracterização bioquímica.....	32
4.1.3. Identificação molecular.....	32
4.1.4. Teste de resistência a metais.....	33
4.1.5. Antibiograma.....	34
4.2. UM MICRORGANISMO SELVAGEM APARECE!.....	35
4.2.1. Isolamento.....	35
4.2.2. Identificação molecular.....	35
4.3. DESVULCANIZAÇÃO.....	36
4.3.1. Borracha: obtenção e preparo.....	36
4.3.2. Preparo do inóculo.....	37
4.3.3. Tratamento de dessulfurização.....	38
4.3.4. Quantificação de SO_4^{2-}	40
5. RESULTADOS.....	41
5.1. IDENTIFICAÇÃO.....	ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.
5.1.1. Bactérias.....	41
5.1.2. Fungo.....	Erro! Indicador não definido.
5.2. ANTIBIOGRAMA E TESTE DE RESISTÊNCIA A METAIS.....	44
5.3. TESTE DE DESSULFURIZAÇÃO.....	47
6. DISCUSSÃO.....	53
7. CONCLUSÕES.....	58
REFERÊNCIAS.....	59
ANEXOS.....	69

TABELAS, FIGURAS E ANEXOS

Tabela 1. Caracterização bioquímica.....	42
Tabela 2. Antibiógrama dos isolados bacterianos.	45
Tabela 3. Concentração Inibitória Mínima de metais em que houve crescimento bacteriano.....	46
Figura 1. Representação gráfica de torus.....	13
Figura 2. Representação de ligações cruzadas na matriz polimérica após vulcanização.	14
Figura 3. Exemplo de estrutura básica de pneu.	16
Figura 4. O ciclo do pneu.	19
Figura 5. Fluxograma da metodologia do isolamento bacteriano.	30
Figura 6. Fluxograma do isolamento: purificação.....	31
Figura 7. Fluxograma do protocolo de preparo do inóculo bacteriano para o teste de dessulfurização.	38
Figura 8. Fluxograma para o teste de dessulfurização.....	39
Figura 9. Dendograma da similaridade genética do isolado DAF baseado no rRNA do gene 16S.	43
Figura 10. Dendograma da similaridade genética do fungo F1 baseado na região ITS1-18S-ITS.....	44
Figura 11. Análise de SO_4^{2-} no meio de cultivo.	47
Figura 12. Análise do crescimento celular expressa em absorbância.....	48
Figura 13. Diferença entre o peso inicial e final dos frascos de cultivo.....	49
Figura 14. Micrografia Eletrônica de Varredura da borracha não tratada e tratada.	50
Figura 15. Micrografia Eletrônica de Varredura da borracha de pneu granulada tratada com os isolados bacterianos.	Erro! Indicador não definido.
Figura 16. Micrografia Eletrônica de Varredura da borracha de pneu granulada tratada com o fungo F1 em menor e maior aumento.....	52

SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS.

% (v/v) - porcentagem em volume por volume

% p/v - porcentagem em peso por volume

μl - microlitros

ABIDIP - Associação dos Importadores e Distribuidores de Pneus

AgNO₃ - Nitrato de prata

ANIP - Associação Nacional das Indústrias de Pneumáticos

atm - atmosfera

BaCl₂-cloreto de bário

BD - borracha devulcanizada

BH - meio Bushnell-Haas

BHI - Meio de cultivo Infusão de Cérebro e Coração, do inglês, *Brain Heart Infusion*.

BH-s - meio BH sem MgSO₄

BM - meio sem borracha e microrganismos

BN - borracha natural

BP-III - borracha de pneu granulada

BPT - borracha de pneu triturada

BS - borracha sintética

BSV - borracha sintética vulcanizada

BV - borracha vulcanizada

BVT - borracha vulcanizada triturada

C - Carbono

CdCl₂-cloreto de cádmio

CIM - concentração inibitória mínima

CONAMA - Conselho Nacional do Meio Ambiente

CoSO₄- Sulfato de cobalto

CuCl₂-cloreto de cobre

DMSO - dimetilsufóxido

DNA - ácido desoxirribonucleico

DO - Densidade óptica

ETRMA - European Tyre & Rubber Manufactures Association (associação europeia de empresas manufaturadas de pneu)

FeSO₄ -Sulfato Ferroso

h - hora

HgCl₂ - Cloreto de Mercúrio

IBAMA - Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis

KOH - Hidróxido de Potássio

M- - meio teste sem microrganismos ()

MEB - Caldo Extrato de Malte, do inglês *Malt Extract Broth*

MEV - Microscopia Eletrônica de Varredura

MgSO₄ - Sulfato de Magnésio

MS - Ministério da Saúde

NiCl₂ - Cloreto de Níquel

phr - partes por cem partes de borracha, do inglês *parts per hundred rubber*

ReciclAnip - anagrama com a palavras reciclagem e ANIP

SO₄⁻² – Íon sulfato

TESPT - Bis(triethoxisililpropil)tetrasulfeto

TMTD - Dissulfeto de tetrametiltiuram, ou tirame

WHO - *World Health Organization*

Zn - Zinco elementar

RESUMO

Bioprospecção de microrganismos biodessulfurizantes de borracha vulcanizada de pneu inservível.

Pneus possuem grande importância econômica, mas um risco para a saúde pública e meio ambiente devido à vulcanização da borracha e demais componentes. Uma das formas de reuso dos pneus é a reciclagem da borracha pela desvulcanização. Assim, foi objetivado isolar microrganismos de rejeito de oficina mecânica e avaliar a capacidade de dessulfurização da borracha vulcanizada (BV). Utilizando enriquecimento com dimetilsulfóxido (DMSO) foram isoladas duas bactérias nomeadas D1 e DAF, submetidas a testes bioquímicos, de resistência a metais e ao antibiograma. Preliminarmente aos testes foi observada contaminação por fungo que revelou ser proveniente da BV, sendo isolado e incluído ao protocolo. Utilizou-se 1% (p/v) de borracha de pneu granulada (BP-III) assepsiada com álcool 70% em frasco de cultivo. Cada microrganismo foi adicionado com meio Bushnell-Haas sem SO_4^{2-} (BH-s) a um frasco, um não teve adição de microrganismos, outro conteve apenas meio e foram incubados em agitação a 30° C, 130 rpm. As provas bioquímicas indicaram D1 como *Pseudomonas* sp. O método molecular apontou DAF como *Staphylococcus warneri* e o fungo como *Fusarium chlamydosporum*. As bactérias apresentaram tolerância aos metais testados. O antibiograma de D1 possuía dados comparativos para cinco antibióticos, nenhum tolerante, enquanto DAF apresentou sensibilidade a oito. D1 apresentou maior quantidade de SO_4^{2-} no meio que DAF. Esta e o fungo degradaram a borracha, entretanto o fungo possui maior potencial de dessulfurização. Assim, observou-se a capacidade microbiana em dessulfurizar BV, um método promissor e preferível para reciclagem de pneu por ser ambientalmente amigável e de maior custo benefício.

Palavras-chaves: prospecção microbiana, dessulfurização microbiana, biorremediação, desvulcanização.

.

ABSTRACT

Bioprospecting of waste tire vulcanized rubber biodesulfurizing microorganisms

Tires have great importance, but have become a risk to public health and the environment due to the characteristics conferred by the rubber vulcanization and other components. One of the ways of reusing the tyre is rubber recycling through devulcanization. Thus, the objective was to isolate microorganisms from mechanic shop's waste and assess their desulphurization of vulcanized rubber (VR) capacity. With selective enrichment using DMSO, two bacteria named D1 and DAF were isolated, later submitted to biochemical, metal resistance and antibiogram tests. Preliminary to the tests, fungus contamination was observed, which revealed to be from BV, being isolated and included in the protocol. It used 1% (w/v) of granulated tire rubber (BP-III) aseptis with 70% alcohol in a culture flask. Each microorganism was added with Bushnell-Haas medium without SO_4^{-2} (BH-s) to a flask, one had no microorganism added, another contained only medium and were incubated in a shaker at 30°C, 130 rpms. Biochemical tests indicated D1 as *Pseudomonas* sp. The molecular method identified DAF as *Staphylococcus warneri* and the fungus as *Fusarium chlamydosporum*. Bacteria showed tolerance to the metals tested. The D1 antibiogram had comparative data for five antibiotics, none of which were tolerant, while DAF showed sensitivity to eight. D1 had a greater amount of SO_4^{-2} in the medium than DAF. This and the fungus degraded the rubber. However, the fungus has greater potential for desulfurization. Thus, the microbial capacity to desulfurize VR was observed, a promising and preferable method for tire recycling as it is environmentally friendly and cost-effective.

Keywords: microbial prospecting, microbial desulfurization, bioremediation, devulcanization

.

1. INTRODUÇÃO

Com grande uso no setor automobilístico e de transportes, a importância da borracha vulcanizada (BV) alcança tanto a esfera industrial quanto a esfera social e militar (Jain et al. 2012). Ela é o principal componente dos pneus, produtos que de acordo com Rodgers & Waddell (2005) são “uma maravilha da engenharia: geometricamente é um toros, mecanicamente são flexíveis e sustentam altas pressões. Estruturalmente é composto por elastômeros, fibras de aço e uma variedade de elementos orgânicos e inorgânicos”. Toros é a designação de uma forma anelar tridimensional, podendo ser observada na Figura 1.

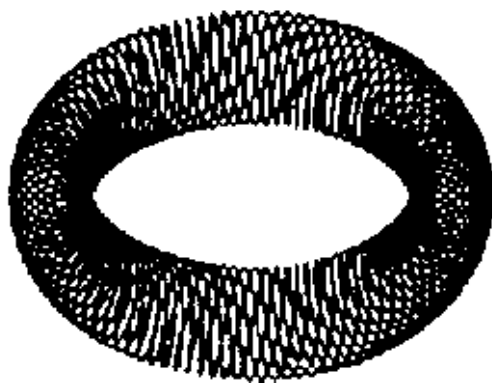


Figura 1. Representação gráfica de toros. Fonte: Seção de imagem originalmente por Tavkhelidze (2017).

O uso em grande escala de produtos derivados da borracha, em especial os pneumáticos, se deve ao processo de vulcanização, pois até a descoberta deste processo a borracha possuía uso limitado. Este método revolucionou os processos industriais, pois a roda não era apenas um componente de transporte, mas também uma peça necessária em muitos maquinários, assim como a borracha é atualmente (Rodgers & Waddell, 2005, Coran, 2013).

A vulcanização é definida por Ikeda, (2014) como uma reação de ligação cruzada mediada por enxofre que confere a borracha estrutura tridimensional, sendo o melhor processo conhecido capaz de conferir estabilidade aos produtos da borracha. Tal reação é representada na Figura 2, que exemplifica de forma simples as ligações sulfídricas entre a matriz polimérica. O processo de vulcanização consiste, de acordo com Akiba &

Hashim, (1997) em aquecer o polímero, que pode tanto ser a borracha sintética (BS) quanto a borracha natural (BN), a altas temperaturas e com alguns aditivos. Cada componente adicionado tem uma função, sendo que o mais importante é o agente de vulcanização, que geralmente utiliza-se de enxofre inorgânico. Outros componentes utilizados durante a vulcanização são classificados em: aceleradores, ativadores, retardantes e inibidores pré-vulcanização (Akiba & Hashim, 1997).

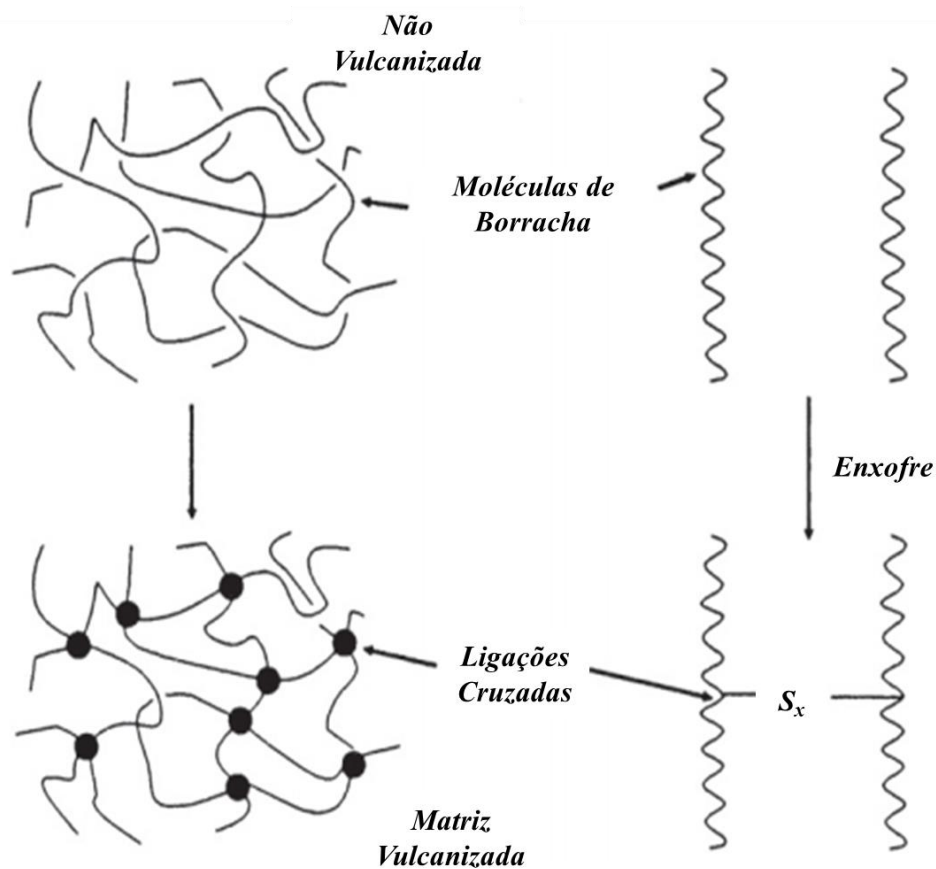


Figura 2. Representação de ligações cruzadas na matriz polimérica após vulcanização. As moléculas da borracha não vulcanizada estão entremeadas e são suportadas uma pela outra. Após a vulcanização, as cadeias poliméricas próximas formam ligações cruzadas, mediadas pelo enxofre no ponto em que se envolvem. Fonte: Figura adaptada de Coran (2013).

A vulcanização confere maior elasticidade e menor plasticidade. Tais características mecânicas e físicas adquiridas após o processo são devidas a formação de ligações cruzadas do enxofre com a matriz polimérica (Coran, 2013). Quando não

vulcanizado, o polímero é moldável, sendo que se torna mais maleável com o aumento da temperatura, perdendo a forma desejável, ou se torna quebradiça com a diminuição da temperatura, da mesma forma indesejado. Com a vulcanização, o polímero passa a ser menos maleável (perda da plasticidade), mantendo assim a forma com a qual foi moldado, sendo que ainda é capaz de resistir a variações bruscas de temperatura e tensão (aumento da elasticidade) (Coran, 2013; ANIP, 2018).

O processo foi desenvolvido por Charles Goodyear no final da década de 1830. Isso aconteceu acidentalmente ao deixar certa quantidade de borracha contendo enxofre próximo a um forno enquanto fazia experimentos com BN, e desde então este método vem sendo aprimorado (Bredberg et al. 2005; ANIP 2018), pois permitiu o uso amplo e variado da BN, que até então não resistia a grandes variações de temperatura. Com a vulcanização foi possível conferir novas propriedades a borracha, uma vez que o processo modifica a sua rede tridimensional polimérica (Coran 2013).

Como componente principal de grande parte dos meios de transporte, pneus constituem um fator fundamental para a indústria, seja direta ou indiretamente. Em dados disponibilizados pela Associação Nacional das Indústrias de Pneumáticos (ANIP), em 2016 foram produzidos mais de 67 milhões de pneus no Brasil, sendo que as vendas constituíram mais de 70 milhões de pneus, que foram distribuídos pelos principais canais: 18,2% pelas montadoras, 18,5% foram exportados e 63,4% constituíram as vendas de reposição (substituição de pneus usados por um novo).

Em 2020 foram comercializados 67,9 milhões de pneus, o que representou queda justificada pela pandemia da COVID-19 que afetou consideravelmente o mercado (Allied Market Research, 2020). Ainda assim, de acordo com a ReciclAnip (anagrama com a palavras reciclagem e ANIP), a quantidade de pneus reciclados pela organização atingiu 42,2 milhões de unidades em 2020 (ReciclANIP, 2021). Ao comparar esse dado com os dados referentes ao comércio de pneus no Brasil, observa-se que a quantidade de pneus coletados em um ano não se equipara àqueles comercializados no mesmo ano (ANIP, 2021).

O relatório disponibilizado na *webpage* da *Allied Market Research* (2020), aponta que devido ao crescimento e desenvolvimento das indústrias, a tendência é que haja o aumento do uso de veículos de comércio, como caminhões e carretas. Além disso, a melhoria de renda influencia a compra de carros de passeio por mais famílias, além de tornar viável a compra de carros e motos de luxo. Similarmente, se espera que haja maior comercialização de veículos elétricos. Portanto, estima-se que até 2027 o mercado

automobilístico crescerá com o mercado brasileiro pode atingir o valor de 2,05 bilhões de dólares em 2027, sendo que o valor contabilizado em 2019 foi de 1,87 bilhões (Allied Market Research, 2020).

O crescimento do consumo tende a aumentar a quantidade de bens descartados, mas devemos considerar aqueles já presentes no meio ambiente. A forma como os pneus são descartados é de preocupação, pois eles são termoplásticos elásticos (que pode ser moldado por meio de altas temperaturas), insolúveis, e infusíveis; e a incorporação dos reforçadores e extensores contribui com a razão dos mesmos serem extremamente resistentes a biodegradação (Adhikari 2000; Ramarad et al. 2015). Na Figura 3 pode-se observar a complexidade estrutural do pneu e seus componentes, projetados para o melhor desempenho e segurança.

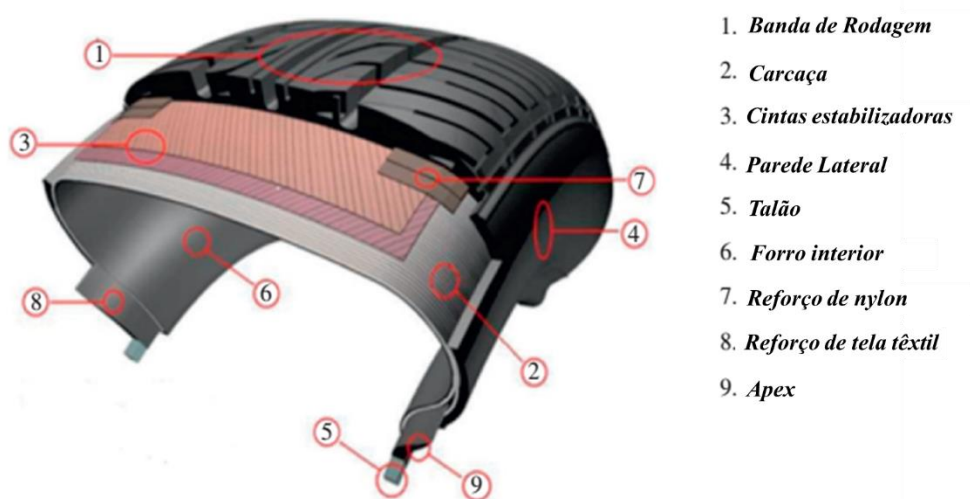


Figura 3. Exemplo de estrutura básica de pneu indicando as partes de um pneu.
Fonte: Figura adaptada de Zhang et al. (2019).

Devido a estrutura tridimensional mais rígida conferida ao polímero com a vulcanização e as características citadas acima, tinha-se o conceito de que a reciclagem do elastômero submetido a tal processo seria impraticável, fazendo com que os pneus fossem simplesmente descartados quando danificados. As consequências desta prática são então refletidas em custos ambientais e implicações à saúde humana e animal (Li et al. 2011; Lagarinhos & Tenório 2012).

Pneus constituem sério risco de incêndios, pois uma vez em combustão o fogo nesses materiais é difícil de ser extinguido, podendo atingir grandes proporções dependendo do local (Sofi, 2018). Durante a queima há a formação de alcatrão oleoso que além de benzenos, aminas, toluenos e nafta, contem metais como cádmio, níquel e

zinco (Lagarinhos & Tenório, 2008). Ao mesmo tempo ocorre a liberação de benzenos, estireno, hidrocarbonetos poliaromáticos, monóxido de carbono, óxido nítrico e dióxido de enxofre que contaminam o ar e o solo da região afetada; e os óleos provenientes do derretimento podem contaminar o solo e lençõs freáticos (Liu et al. 2020). Além disso, os pneus podem acabar como reservatórios de pragas urbanas, como ratos e insetos (Jang et al. 1998; Fiksel et al., 2011; Sienkiewicz et al. 2017).

Em questão de saúde pública no Brasil, pneus acabam como criadouros do mosquito *Aedes aegypti*, transmissor da dengue e outras doenças. Com os vírus da Zika e Chikungunya, a preocupação com a prevalência do *A. aegypti* triplicou, visto que essas doenças também causam grande morbidade e podem levar o paciente a óbito; e no caso da Zika, há a possibilidade de causar microcefalia de fetos quando a gestante é infectada (Weaver et al. 2018).

O ano de 2019 fechou com 10.768 casos prováveis e três óbitos por Zika confirmados; e 132.205 casos prováveis e 92 óbitos confirmados por Chikungunya (MS, 2020). Quanto aos casos de dengue, até dezembro de 2019 foram notificados 782 óbitos confirmados e 1.419 casos de dengue grave, 18.740 casos de dengue com sinais de alarme e 1.544.987 casos prováveis, sendo que chegou a atingir caráter endêmico entre a 28ª e a 36ª semana de 2019. O número de casos prováveis representa aumento de mais de 100% em relação ao ano anterior, que registrou mais de 62 mil casos (MS 2020).

O vírus causador da dengue é predominantemente urbano e nos casos graves causa hemorragia, podendo levar o paciente a morte. Almeida & Silva (2018) realizaram um estudo relacionando objetos descartados em terrenos baldios com a prevalência de casos de dengue em três cidades do estado da Paraíba, onde a quantidade de casos era maior quando havia menos fiscalização e conseqüentemente, mais locais propícios para o desenvolvimento do culicídeo, correlacionando assim a prevalência de casos de dengue com o acúmulo e descarte inadequado de pneus (MS, 2020).

Ademais, a febre amarela, malária e filariose são transmitidas por mosquitos e também possuem casos sendo notificados (MS, 2019). A febre amarela inclusive é transmitida pelo *A. aegypti* e permaneceu endêmica nas últimas décadas na região amazônica, no entanto, em 2016 foram documentados casos na região sudeste do país (Abreu et al. 2019). Já malária, cujo agente etiológico é o protozoário do gênero *Plasmodium* tem como vetor os mosquitos *Anopheles* permanecendo endêmica na região da Amazônia legal, onde os mosquitos têm grande disponibilidade de água limpa e parada decorrente das chuvas (Baroni et al. 2019).

Por fim, menos comum, mas ainda presente na região do nordeste brasileiro, a filariose linfática é transmitida pelo *Culex quinquefasciatus*, vetor do agente *Wuchereria bancrofti*, responsável pela morbidade de cerca de 893 milhões de pessoas não tratadas em todo o mundo (MS 2018; WHO 2019). Essas são doenças consideradas negligenciadas, pois atingem geralmente populações pobres, mais sujeitas às baixas condições sanitárias. Portanto, essas doenças recebem pouco investimento para tratamentos, restando apenas melhorar as condições dos locais de moradia da população das regiões endêmicas, (Almeida & Silva, 2018) e nestes casos, pneus descartados indevidamente constituem parte do problema, tendo como solução a sua destinação adequada (Silva & Casagrande, 2013).

Assim, a preocupação ambiental e com a saúde pública levou países a comporem regulamentações e iniciaram o incentivo ao descarte correto de pneus inservíveis, aquele que se torna inutilizável para rodagem ou reforma por apresentar danos irreparáveis (Brasil, 2009). Estados Unidos, Austrália, Japão, China e cerca de trinta países europeus possuem regulamentação em vigor, sendo que de acordo com a European Tyre & Rubber Manufactures Association (ETRMA) a taxa de coleta e reciclagem de pneus usados em 32 países atingiu 95% em 2019, permanecendo no mesmo patamar que anos anteriores (ETRMA, 2021).

No Brasil, essa regulamentação foi estabelecida pelo Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) e é constantemente fiscalizada pelo Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA, Brasil 2009). Tem por objetivo reduzir a disposição e descarte de pneus em terrenos baldios, rios e aterros sanitários sendo que, anualmente, cerca de 100 milhões de pneus inservíveis são descartados incorretamente (Vucovic 2021). Assim, atualmente estes atos não são aceitáveis e constituem crime ambiental (?).

As importadoras e manufaturadoras são responsáveis por dar a destinação correta (Vucovic 2021), mas no ano de 2017 apenas as empresas nacionais atingiram a meta recomendada pelo CONAMA (Santos et al. 2020), sendo que as vendas totais pelas fabricantes nacionais foram de cerca de 60 milhões de pneus novos, sendo reciclados 91,6 milhões (ANIP 2017).

De acordo com a RecilANIP, entre 1999 e 2020 foram destinados mais de 5,6 milhões de toneladas de pneus inservíveis, equivalendo a 1,1 bilhão de pneus de passeios que foram descartados corretamente. Essa destinação segue de acordo com a logística reversa, onde, após o descarte os pneus são recolhidos e encaminhados para pontos de

coletas e então são reaproveitados (Lagarinhos & Tenório 2012). A Figura 4 exemplifica os caminhos pelo qual um produto pneumático passa após ter sido produzido até a sua destinação final correta, iniciando com o pneu servível saído da fábrica ou revenda, passando pelo uso e descarte em ponto de coleta, e finalizando com o reaproveitamento.

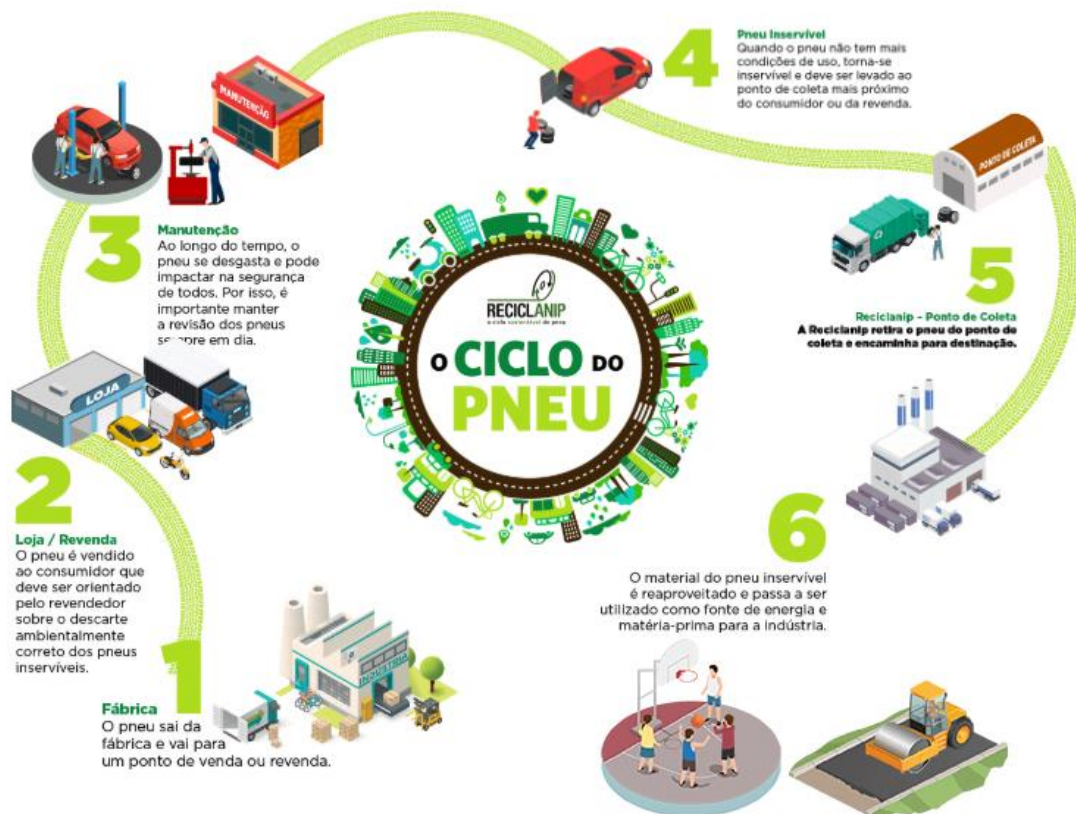


Figura 4. O ciclo do pneu. Após sair da fábrica (1), o pneu é destinado a um ponto de venda ao consumidor (2). Após uso, o pneu é trocado por um novo (3). O pneu inservível é mandado a um ponto de coleta (4), onde é encaminhado para destinação (5). O material do pneu é então reaproveitado como outros bens ou fonte energética (6). Fonte: Reciclanip (2019).

De fato, ainda há um longo caminho a percorrer em se tratando de pneus inservíveis, pois, apesar das campanhas contra a dengue e sua contribuição para a retirada de pneus do ambiente, esta prática ainda carece de incentivo governamental, como aponta o presidente da Associação dos Importadores e Distribuidores de Pneus (ABIDIP). Além da resolução do CONAMA 416/09, não foram conduzidas grandes estratégias para solucionar definitivamente tal problema, sendo que em 2018 foram registrados três casos de incêndios relacionados ao descarte incorreto de pneus (Scott, 2018)

Segundo a Resolução CONAMA 416/09, quando o pneu se torna inservível, o mesmo deve ser encaminhado para empresas de reciclagem. Quando o pneu ainda é servível, ou seja, passível de reforma, pode ser encaminhado para empresas que a realizam, onde serão submetidos aos processos de recauchutagem, recapagem ou remodelagem (Brasil, 2009). A destinação após o pneu se tornar inservível variam e na literatura as teorizações sobre o que seria mais adequado divergem. Ramarad et al. (2015) resumem trabalhos de diferentes autores em três formas de destino aos pneus utilizados:

- a) Reciclagem: quando se faz o uso do pneu todo ou em partes trituradas.
- b) Reutilização/ recuperação: quando se faz cisão das ligações C-C na matriz polimérica visando reduzir o peso molecular para obter maior plasticidade.
- c) Desvulcanização ou dessulfurização: quebra de ligações S-C ou S-S, de modo a desfazer as ligações cruzadas formadas durante a vulcanização, com o intuito de se obter maior plasticidade.

Karger-Kocsis et al. (2013) apontam que a recuperação (*reclamation*) e a desvulcanização estão relacionadas. O resultado de ambos os processos é, como descrito acima, obter borracha similar a não vulcanizada, e a diferença consiste nas ligações alvo a serem desfeitas.

Quanto às formas de reciclagem pode haver a destinação e reaproveitamento dos pneus como um todo para geração de energia direta (queima como combustível) ou indireta (obtenção de óleos contidos na borracha por meio da pirólise); podendo ainda serem utilizados como quebra-mar, recifes artificiais, confecção de brinquedos para parques de recreação, móveis, barreiras contra colisões e outros (De et al. 2005; Forrest 2019). Na forma particulada, após desmembramento e trituração do pneu, a borracha na forma de grânulos pode ser aplicada na fabricação de um novo produto, como móveis ou artesanato, na produção de goma asfáltica e na construção civil para evitar rachaduras no concreto ou em outros materiais que não requerem alto desempenho (Parravicini 2015).

A trituração pode ocorrer de três formas de acordo com a condição de temperatura: temperatura ambiente, criogênica e a base de água. Em todas elas fazendo uso de moinhos trituradores. Os grânulos da borracha podem ser então empregados, dentre outros, na fabricação de nova BV, produto termoplástico, sola de sapato, quadras de esporte (Forrest 2019), pois do ponto de vista ambiental, a melhor solução é aquela que reduz ao máximo a liberação de poluentes e garante o melhor reaproveitamento energético relativo ao custo benefício (Bredberg et al. 2005) e o reuso da borracha como um novo produto plástico

evitaria a poluição ambiental que a queima provoca e reduziria a exploração de recursos naturais (Adhikari et al. 2000)

No entanto, as propriedades da BV impossibilitam uma união adequada em uma nova matriz polimérica, e as partículas adicionadas não formam ligações fortes o suficiente entre si ou entre a matriz do polímero ao qual está sendo incorporada para garantir a estabilidade e um bom desempenho do produto (Karger-Kocsis et al. 2012). Sendo assim, um tratamento é necessário para realizar uma modificação na superfície da borracha usada para que a mesma tenha maior aderência com a matriz, o que é denominado como compartimentalização. Essa estratégia pode ser alcançada por meio químico ou físico, objetivando reduzir a tensão superficial. Assim, um melhor resultado pode ser obtido com a desvulcanização da borracha, pois isso facilita a ligação química entre a borracha reciclável e a nova matriz (Karger-Kocsis et al. 2012; Santos et al. 2020).

Com isso, tem se observado que a desvulcanização, por vezes chamada de dessulfurização, um termo que inclui a retirada do enxofre presente no ambiente ou outros materiais (Babich, 2003), vem a ser interessante no sentido de dar novo uso aos pneumáticos, obtendo-se novos produtos. Uma vez que a degradação natural é difícil de ser alcançada a alternativa é dar um novo destino a borracha.

Pesquisas com biodessulfurização da borracha e outros produtos derivados do petróleo (Grossman et al. 1999, Ismail et al. 2016) são foco em certos grupos, mas não possui grande destaque (Bredberg et al. 2005), provavelmente devido ao pouco conhecimento que se tem do processo e de como abordar as variáveis que envolvem a biodessulfurização, como a via catalítica e a inibição da reação pelo produto (Kilbane 2016).

Alguns ainda abordam a biodessulfurização da borracha, como Li et al. (2005) que estudaram o comportamento de borracha composta por BN e borracha desvulcanizada (BD) e foi observado que a incorporação de até 10 phr (*parts per hundred rubber*) de BD a matriz polimérica não interfere de modo significativo. Quanto ao desempenho, a matriz com BD apresentou melhor resultado que a BN.

Assim, é possível classificar rudimentarmente os métodos de desvulcanização em físico (mecânico, térmico, termomecânico e ondas mecânicas), químico e biológico (microrganismo) (Forrest 2014; Asaro et al. 2018). Tal classificação é apenas didática, pois métodos físicos podem ser usados em conjunto com agentes químicos ou mais de um método físico pode ser empregado durante um processo (Forrest 2014). Assim, a

desvulcanização mecânica e térmica são empregadas geralmente em conjunto (Asaro, 2018; Seghar et al. 2019).

O processo de trituração é considerado desvulcanização mecânica, pois o aquecimento das partículas provocado pelo atrito estimula a quebra das ligações. A desvulcanização térmica pode ocorrer sem ação mecânica, desde que ocorram em altas temperaturas. Sendo assim, o processo termomecânico é a utilização da trituração em conjunto com a injeção de calor, que pode ser com eletricidade. Nos processos envolvendo ondas, temos o ultrassom e micro-ondas, que provoca a agitação e aumento de temperatura do polímero. Os métodos químicos são variados, dependendo das propriedades dos agentes. Alguns podem realizar a quebra seletiva das ligações sulfídricas, enquanto outros podem agredir a matriz de carbono, ou ainda, provocar a vulcanização de enxofre livre (Rajan et al. 2006; Parravicini 2014).

Processos que abrangem um ou mais dos métodos classificados acima ainda não são largamente usados devido à alta demanda energética, principalmente ultrassom, ou devido à poluição, no caso de uso de métodos químicos; bem como possuem baixa seletividade e parece não ser capazes de produzir BD de qualidade (Amari et al. 1999).

Rooj et al. (2011) utilizaram peróxido benzoílico para realizar a desvulcanização em diferentes concentrações do agente e utilizou da combinação de um método físico com peróxido benzoílico em outra etapa do experimento. Observou-se que o método combinado foi mais eficiente para a desvulcanização, sendo que a concentração do agente e o tempo de tratamento influenciam no produto final. Ao realizar um *blend* (mistura) de BD com BN, observaram que a qualidade é melhor quando se usa menos BD. Outra desvantagem para o método testado está no agente químico, que é tóxico e nocivo ao meio ambiente e aos seres vivos, gerando maior contaminação do que os próprios pneus.

Similarmente, De et al. (2006) e Ghorai et al. (2016) combinaram os métodos físicos e químicos, ao utilizarem moinho de dois rolos (*two roll mixing mill*) e dissulfeto de tetrametiluram (TMTD, ou tirex) no primeiro estudo e bis(trietoxisililpropil) tetrasulfeto (TESPT), no segundo estudo. No caso usando TMTD, o agente também teve ação durante a revulcanização, já que o mesmo é usado como acelerador. Em ambos os casos, ocorreu a desvulcanização.

Tao et al. (2013) utilizaram o método termomecânico para realizar a desvulcanização da borracha de pneu triturada (BPT), semelhante a extrusão, assim como Barbosa & Ambrósio (2019). Concluiu-se, no estudo de Barbosa & Ambrósio (2019), que houve grande diminuição da densidade de ligações cruzadas, se tornando semelhante a

borracha não vulcanizada; entretanto, a matriz principal foi danificada, não sendo o ideal. Com exceção do gasto energético, de acordo com Tao et al. (2013), esse viria a ser o método mais indicado, já que é de fácil acesso pelas indústrias do setor.

Outros métodos menos comuns que já foram testados para realização da desvulcanização incluem ultrassom (Elnaggar et al. 2019) e autoclavagem (Dobrotă & Dobrotă 2019), ambos com ação sobre as ligações cruzadas. No entanto, nenhuma destas técnicas é efetivamente usada, pois a borracha resultante não possui qualidade suficiente (Shi et al. 2012) além dos custos já citados anteriormente. Assim, o uso de microrganismos emprega uma abordagem biotecnológica que visa contornar tais problemas para efetivamente se realizar a reciclagem da borracha (Shi et al. 2012), além de que compreende um processo simples, com baixo gasto energético, são requeridos poucos equipamentos e não geram poluição (Yao et al. 2013).

Durante os processos de desvulcanização biológicos, também conhecido como biodessulfurização, são utilizados microrganismos. O número de pesquisas nesse campo vem crescendo, visto que em comparação aos métodos físico e químico, requer menor gasto energético e é efetivamente capaz de reduzir a poluição ambiental uma vez que não gera gases poluentes (Adhikari 2000; Rajan et al. 2006; Yao et al. 2013; Ostad et al. 2016; Tatangelo et al. 2016).

Já é de conhecimento que pesquisas na utilização de microrganismos para o tratamento e remediação de contaminantes estão sendo conduzidas, prática esta que é denominada de biorremediação. Nesse contexto, a biorremediação é um método que se beneficia da capacidade natural de microrganismos em remover contaminantes de um determinado local devido à utilização destas substâncias nocivas como fonte de carbono para o seu crescimento e sobrevivência (Varjani & Upasani 2017; Krzmarzick et al. 2018).

Assim, microrganismos são buscados para este e outros fins, pois existe uma variedade abundante de espécimes, capazes de se adaptarem a qualquer tipo de ambientes, como regiões de baixa pressão, baixa temperatura ou ainda presentes em locais de altas temperaturas como as encostas vulcânicas. Com tamanha capacidade de adaptação, os microrganismos compõem cerca de 60% da biomassa do planeta (Dionisi et al. 2012). É essa diversidade e plasticidade biológica que permite a adaptação aos ambientes de condições extremas, naturais ou provocadas por atividades humanas (contaminação) fazem dos microrganismos, principalmente as bactérias por serem mais propensas a sofrerem mutações, alvos de bioprospecção (Tanner et al. 2017; Bailon-Salas et al. 2018).

A bioprospecção é, portanto, a exploração da biodiversidade com foco na identificação, extração e uso de compostos biológicos ou de um organismo completo para o uso como recursos de valor social e/ ou econômico (Beattie et al. 2011; Bentzon-Tilia & Gram, 2017). A facilidade de manutenção em meio de cultivo, necessidade de pouco espaço e a possibilidade de cultivo a partir de pequena amostra inicial, assim como são benefícios ao se utilizar microrganismos como agentes de biorremediação (Maduranga et al. 2018). Nestes casos, Tanner et al. (2017) comentam que locais que causam grande estresse são os mais promissores quando se busca um agente par biorremediação e como Andrade et al. (2010) afirmam, quanto mais rico com o substrato que se deseja degradar é o local de bioprospecção, mais propício é de se encontrar microrganismos adaptados capazes de remediar aquele substrato.

Li et al. (2011) isolaram de uma mina de ferro a bactéria *Thiobacillus ferrooxidans* usada em teste de dessulfurização. Foi observado que ao crescer a bactéria em meio de sais para metabolismo de enxofre elemental (Li et al. 2011), e então adicionar a BV houve queda inicial do crescimento; no entanto, a biomassa voltou a aumentar após o sétimo dia e continuou a crescer até o dia 21. Ademais, observaram o aumento da concentração de sulfato no meio, indicando que as ligações dissulfídricas estavam sendo quebradas, demonstrando potencial de dessulfurização.

Jiang et al. (2009) similarmente realizaram estudos com *T. ferrooxidans*, assim como Christiansson et al. (1998). No estudo de Jiang foi observado ainda que além da dessulfurização, a bactéria não danificou a cadeia polimérica principal e que compósitos utilizando a BD tratada apresentou menor densidade de ligações. Christiansson et al. (1998) além de *T. ferrooxidans*, também utilizaram as bactérias *T. thioparus* e *Acidianus brorley* e um isolado de archea denominada por eles TH2 Lund, concluindo que dos quatro espécimes testados *T. ferrooxidans* apresentou o melhor desempenho.

A archea *Pyrococcus furiosus* foi investigada por Bredberg et al. (2001), sendo determinado que foi capaz de utilizar o enxofre presente na BV e que o tratamento melhorou as propriedades da borracha reciclada. *Gordonia amicalisa* foi empregada no tratamento de dois tipos de BSV (borracha sintética vulcanizada) e após 20 dias de tratamento, foi observado uma redução em 13,7 e 22,1% da quantidade de enxofre em borracha de isopropeno e de estireno butadieno, respectivamente (Hu et al 2016).

Kim & Park (1999) realizaram a comparação do método químico e biológico utilizando dissulfureto de di-cobenzanido fenilo e a bactéria *Thiomonas perometabolis*, e foi concluído que no tratamento de BV com a bactéria o nível de enxofre foi reduzido em

30%, enquanto que o método químico foi responsável por reduzir a quantidade de enxofre em apenas 10%, portanto, é um indício da eficácia da utilização de microrganismos na dessulfurização.

Sphingomonas sp. foi isolada do solo de uma mina de carvão, selecionada pela capacidade de oxidar enxofre. Ao fim de 20 dias de co-cultivo com borracha vulcanizada triturada (BVT), os autores concluíram que a quebra das ligações sulfídricas foi realizada e apesar de ter ocorrido quebra da cadeia de carbono, os compósitos elaborados com BS e a BD obtiveram melhores propriedades mecânicas e houve melhor interação entre as interfaces (Li et al., 2012). Outros exemplos bacterianos são: *Bacillus cereus* TISTR 265 (Kaewpetch et al. 2019) *Alicyclobacillus* sp (Yao et al. 2013) e *G. polyisoprenivorans* VH2 (Vivod et al. 2017)

Com isso, é evidente que dentre estudos realizados visando a biodessulfurização, as bactérias apresentaram maior destaque, apesar de haver pesquisas realizadas com fungos, sendo estas relacionadas principalmente com a degradação da borracha (Stevenson et al. 2008; Yikmis & Steinbüchel 2012). Borel et al, (1982) relata que fungos isolados de solo e de borracha foram utilizados para determinar a capacidade de degradação de BN, sendo utilizado *Fusarium solani*, *Cladosporium cladosporioides*, *Phoma eupyrena* e *Paecilomyces lilacinus*. De acordo com os resultados obtidos, *F. solani* foi o que apresentou melhor desempenho, pois degradou a borracha em 10 dias, enquanto os demais necessitaram de mais de 20 dias para atingir resultados semelhantes.

Ali Shah et al. (2013) citam que o fungo *P. variotii*, isolado de fonte termal por Zeb (2009) também foi capaz de degradar BV. Porém, em se tratando da biodessulfurização, o ideal é a ação diretamente nas ligações sulfídrica e apenas o fungo basideomiceto e saprófito de madeira, *Ceriporiopsis subvermispora* foi observado em tal feito. Em experimento conduzido por Sato et al., (2004), o espécime foi capaz de reduzir 29% do conteúdo de enxofre presente em BNV em 200 dias.

Por fim, dos processos descritos, o que demonstra melhor custo benefício é a biodessulfurização, pois os demais demandam alto gasto energético, possuem limitado sucesso econômico e também agredem a matriz C-C do polímero, além de gerar maior poluição nos casos em que são utilizados compostos químicos. Por outro lado, é importante que o método realize a quebra das ligações de enxofre seletivamente, sendo assim, o uso de microrganismos, especialmente bactérias é o mais indicado, pois suas características de adaptação podem levar a quebrar as ligações sulfídricas seletivamente (Amari et al. 1999; Shi et al. 2013).

2. JUSTIFICATIVA

Com uma longa meia vida, os pneus atualmente constituem um grande passivo ambiental quando estocados ou descartados a céu aberto. Além da poluição visual, tal prática representa séria ameaça ao meio ambiente e à saúde pública, pois o solo, ar e água podem ser contaminados por óleos e componentes voláteis tóxicos que são usados na fabricação do pneu. Ainda, podem vir a sofrer combustão ou acabar como criadouro de insetos vetores de doenças (Lo Presti 2013; Sofi 2018), pois a geometria, impermeabilidade e resistência dos pneus os tornam abrigos e incubadores perfeitos. Visto que o inseto vetor de maior importância no Brasil, o *Aedes aegypti*, é responsável pela transmissão de três viroses: dengue, zika e Chikungunya; maior atenção deve ser dada ao descarte adequado de pneus.

Ao atingir o fim de sua vida útil, a logística reversa dos pneus é geralmente impossibilitada devido a sua complexa estrutura e diferentes componentes (Parravicini, 2014; Silva et al. 2019), afora que possuem forma tridimensional rígida, conferida pela vulcanização, reforçando o conceito de que a reciclagem da borracha presente no pneu é um investimento sem retorno, fazendo com que eles sejam descartados quando danificados. (Li et al. 2011; Lagarinhos & Tenório 2012). Entretanto, como constituintes fundamentais de meios de transportes a produção não será impedida, pelo contrário. Com incentivos governamentais e melhoria das condições financeira dos brasileiros é esperado que o mercado brasileiro de pneus ultrapasse 6,7 bilhões em 2022 (Miyazu, 2021), o que contribui com a geração de pneus inservíveis.

Assim, o reuso e reciclagem seriam a alternativa ideal: além de salvaguardar a saúde ambiental e humana, Rajan et al., (2006) comenta que reciclar pneus resulta na conservação de energia ao ser reutilizado como matéria prima na indústria; assim como na diminuição dos custos e melhora do processo da confecção de artigos derivados da borracha. Mas como a BP se mescla pobremente quando reutilizada em um novo produto, essa prática não é tão explorada, pois é necessário o uso de métodos de desvulcanização e aqueles existentes e disponíveis atualmente acabam por consumir mais energia e gerar maior poluição.

Deste modo, sugere-se como solução os investimentos em bactérias quimiolitotróficas e o emprego da biotecnologia (Rajan, 2006). Têm se realizado estudos em busca de tais microrganismos, devido a facilidade em se adaptarem a ambientes

extremos e consequentemente, realizam mais facilmente mutações que lhe conferem capacidade de sobrevivência em meio a contaminantes. Portanto, pesquisas se fazem necessárias para que se obtenha espécime com poder de dessulfurização satisfatório, mas que não danifique a matriz principal.

Com base no exposto, o presente estudo foi conduzido com o objetivo de bioprospectar microrganismos dessulfurizadores para realizar a desvulcanização de borracha de pneu inservível com maior custo benefício que os métodos físicos e químicos, pois foi observado que o método biológico possui a vantagem de ser ambientalmente amigável. Isto pode vir a alterar a forma como a indústria e a sociedade trata o descarte de pneus, pois uma vez com um método de reciclagem eficiente, maiores incentivos podem ser despendidos para promover a destinação adequada aos pneus inservíveis, assim como para retirar aqueles já presentes no meio ambiente e terrenos baldios em cidades.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivos Gerais

Bioprospectar microrganismos com capacidade de realizar a dessulfurização de BV de pneus inservíveis promovendo sua desvulcanização.

3.2. Objetivos Específicos

- Isolar bactérias de rejeito de oficina mecânica, utilizando dimetil sulfoxido (DMSO) como componente seletivo;
- Identificar bactérias isoladas pelo método de enriquecimento seletivo;
- Avaliar a tolerância aos metais e aos antibióticos dos isolados bacterianos;
- Identificar fungo contaminante, isolado acidentalmente de borracha vulcanizada de pneu inservível (BP);
- Realizar o tratamento biológico de BVT com os microrganismos isolados;
- Avaliar a dessulfurização da borracha por detecção de SO_4^{-2} no meio de cultivo em variação de tempo;
- Realizar Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) da borracha tratada com os microrganismos e observar o nível de degradação da matriz polimérica;

4. METODOLOGIA

4.1. Bioprospecção bacteriana

Seguindo o exposto por Tanner et al (2017) no que se refere ao local de bioprospecção com fins de remediação, amostras de rejeito de oficina mecânica foram coletadas de maneira aleatória em tanques de lavagem de peças e descarte de óleo para automóveis no estabelecimento JC Auto Mecânica, localizada em Goiânia-GO (16°40'15.5"S 49°13'47.4"W).

Obtiveram-se amostras em dois estados físicos: semissólido (pastoso), coletado do fundo do tanque; e uma amostra líquida, coletada da superfície do tanque. Ambas foram armazenadas em recipientes plásticos esterilizados até o momento do uso.

4.1.1. Isolamento

O isolamento bacteriano foi realizado de acordo com o princípio de isolamento enriquecimento seletivo, onde é adicionado ao meio de cultivo um componente específico, por exemplo um contaminante ambiental, para que deste modo seja obtido microrganismos que sobrevivam naquelas condições e, portanto, que possivelmente tenham mecanismos bioquímicos para a degradação ou anulação do componente desejado.

Em erlenmeyers de 250 mL, uma alíquota da amostra semissólida, quantificada em cerca de 3% (p/v) foi adicionada em 30 mL de meio de Bushnell-Haas (BH): MgSO_4 0,2 g/L; CaCl_2 0,02 g/L; KH_2PO_4 1 g/L; K_2HPO_4 1 g/L; NH_4NO_3 1 g/L; FeCl_3 0,05 g/L. Para realização do enriquecimento seletivo 50 µg/mL de dimetilsulfóxido (DMSO) foi acrescido ao meio (Mohebalí et al, 2008). Uma alíquota de 3% (v/v) foi retirada da amostra semissólida e foi adicionada em 20 mL de meio BH nas mesmas condições, em tubos de ensaio de 20 mL com tampa de rosca, pois desta forma criou-se um microambiente onde o crescimento de bactérias anaeróbias seria propiciado, visto que essas são mais propensas a utilizarem enxofre como fonte de energia, como exemplificado na Figura 5.

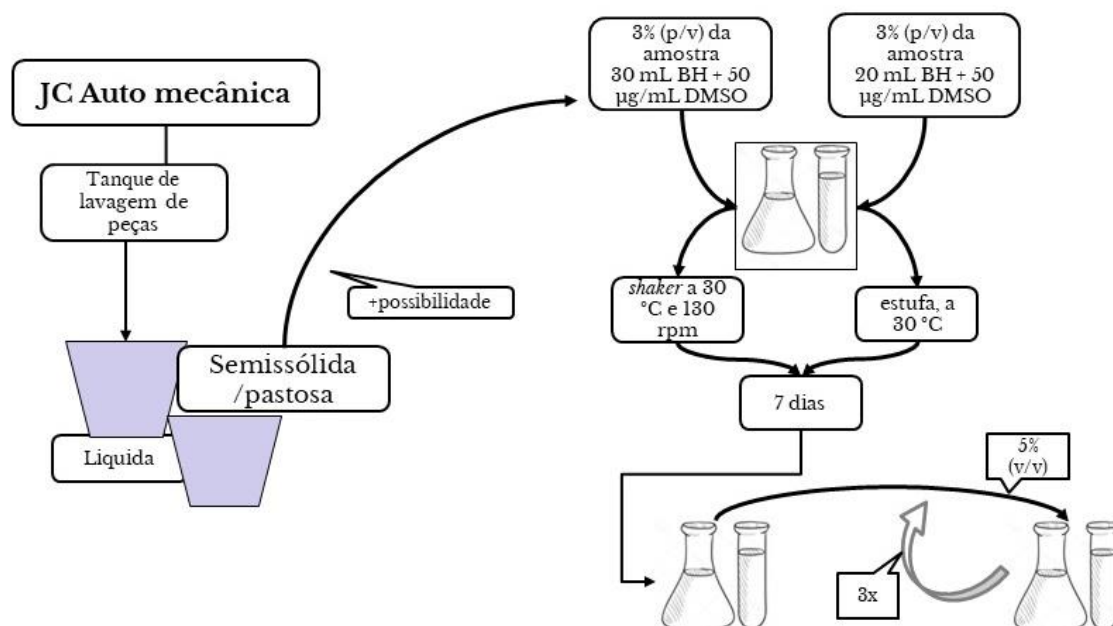


Figura 5. Fluxograma da metodologia do isolamento bacteriano nas etapas de coleta e enriquecimento seletivo. Após coleta na JC Auto mecânica a amostra em estado semissólido foi encaminhada para o enriquecimento seletivo, ao qual seguiu o isolamento. Fonte: autoria própria.

Os erlenmeyers foram incubados sob agitação a 30 °C e 130 rpm, e o tubo de cultivo foi incubado sem agitação em estufa, a 30 °C, os erlenmeyers e tubos foram denominados suspensão mãe aeróbia e anaeróbia respectivamente. Esta etapa foi realizada em triplicata. Após sete dias de incubação, uma alíquota correspondente a 5% (v/v) foram retirados de cada Erlenmeyer e dos tubos de cultura e inoculadas em novos erlenmeyers e tubos de cultivo contendo meio BH, nas mesmas condições descritas anteriormente. Em seguida, foram novamente incubados em *shaker* e estufa por mais sete dias, quando o mesmo procedimento foi realizado. Foram realizadas três transferências para novos meios, de modo que apenas organismos capazes de utilizar o DMSO e consequentemente, enxofre, cresceriam (Figura 5).

Do último cultivo, após o terceiro repique, foi realizada uma diluição seriada de 10^{-1} a 10^{-8} para as amostras dos Erlenmeyer e de 10^{-1} a 10^{-4} do cultivo realizado nos tubos. Em seguida 100 µl das diluições foram adicionadas em meio ágar BH acrescido de DMSO a 50 µg/mL, em placas de Petri, que foram incubadas em estufa a 30 °C por 24 a 48h

(Figura 6). Aquelas advindas dos tubos foram primeiramente colocadas em jarra de anaerobiose para manter a condição de microaerofilia.

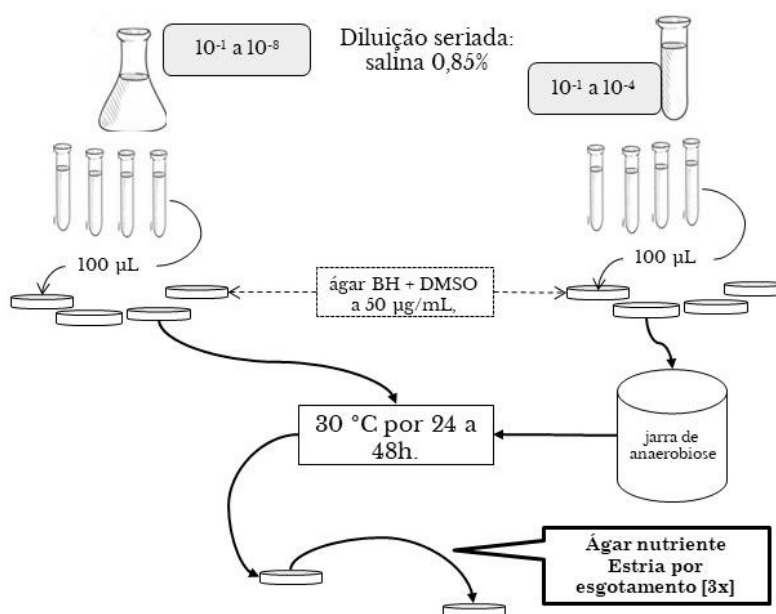


Figura 6. Fluxograma da metodologia do isolamento bacteriano na etapa de purificação das colônias. Após enriquecimento seletivo foi realizada a diluição seriada e distribuídas em placas de cultivo. As colônias observadas foram então purificadas utilizando o método de inoculação de estria por esgotamento em nova placa de cultivo. Fonte: autoria própria.

As colônias crescidas e visualmente identificadas como bactérias foram isoladas com o auxílio de um palito de dente autoclavado e inoculado em placas de meio BH contendo DMSO utilizando da técnica de estria por esgotamento. As placas foram incubadas como descritas anteriormente. Este procedimento foi repetido três vezes. Ao final do terceiro repique os cultivos apresentando de colônias com apenas uma morfologia foram consideradas “puras”.

Após isolamento, foi realizada a coloração de Gram para catalogação morfológica dos espécimes. Em seguida, os eles foram crescidos em caldo de cultivo BHI (Kasvi, Brasil) preparado de acordo com as instruções do fabricante e armazenados

em tubos criogênicos contendo glicerol a 20%, em freezer a -20 °C até o momento de realizar os testes de dessulfurização.

4.1.2. Caracterização bioquímica

Para fins de caracterização das bactérias isoladas, além da coloração de Gram, foram realizadas provas bioquímicas. As bactérias isoladas foram então submetidas aos seguintes testes: Reação de Ryu (com KOH 3%), determinação da enzima catalase, determinação da enzima oxidase, teste de hidrólise da esculina, crescimento em meio OF-glicose (oxidação ou fermentação da glicose), crescimento e fermentação da lactose em meio ágar MacConkey, crescimento a 42 °C e em NaCl 6,5% (m/v) em meio BHI, teste em meio SIM (produção de sulfeto de hidrogênio, indol e motilidade), determinação da enzima DNase, crescimento em meio citrato, ação proteolítica da gelatinase e determinação da enzima uréase; todos realizados de acordo com ANVISA (2013).

4.1.3. Identificação molecular

Após crescimento em meio de cultivo BHI por 24 horas a 30 °C, o DNA dos isolados foi extraído com o kit de extração PowerSoil® DNA Isolation Kit (MO BIO Laboratories, Inc; QUIAGEN). Seguiu-se o protocolo informado pelo fabricante e em seguida foi realizada a amplificação da região 16S do produto da extração utilizando os iniciadores 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') e 1541R 5'-AAGGAGGTGATCCAGCC-3') descritos por Weisburg et al (1991).

As condições para D1 foram: 25,5µL de água (miliQ®), 8,0µL de tampão de amostra (10X), 4,0 de MgCl₂ (50mM) (Ludwig Biotec LTDA), 1,5 µL de cada primer (10mM) (Invitrogen™), 4,0µL de solução dNTP (2,5mM) (Ludwig Biotec LTDA), 8,0µL de Taq polimerase (5U) (Ludwig Biotec LTDA), e 5,0µL de DNA (50ng), volume final de 50µL.

Já para DAF as condições da PCR foram: 31,0µL de água ultra-pura (miliQ®), 6,0µL de tampão de amostra (10X) contendo MgCl₂ (50mM) (Ludwig Biotec LTDA), 1,0µL de cada *primer* (10mM) (Invitrogen™), 4,0µL de solução dNTP (2,5mM) (Ludwig Biotec LTDA), 1,0µL de Taq polimerase (5U) (Ludwig Biotec LTDA), 1,0µL de DMSO e 1,0µL de DNA (50ng), com volume final de 50µL.

A reação foi realizada utilizando termociclador (PTC-100™ Programmable Thermal Controller, MJ Research Inc) e ciclagem de 3min de desnaturação inicial a 94

°C e 30 ciclos de desnaturação 94 °C/1min, anelação 55 °C/30s e extensão 72 °C/30s, extensão final 72 °C/10min. O produto da PCR foi então submetido à corrida de eletroforese em gel de agarose 1% e foi realizada a purificação do produto com o kit Pure Link® Quick Gel Extraction Kit (Invitrogen™), seguindo as orientações do fabricante.

Após a purificação, as amostras foram encaminhadas para o Centro de Recursos Biológicos e Biologia Genômica (CREBIO), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV), Universidade Estadual Paulista (Unesp), Campus Jaboticabal; onde foi conduzido sequenciamento genético, utilizando nas reações os oligonucleotídeos iniciadores universais 27F, 530F (5'-TGACTGACTGAGTGCCAGCMGCCGCGG-3'), 519R (5'-GTNTTACNGCGGCKGCTG-3') e 907R (5'-GTNTTACNGCGGCKGCTG-3').

As seqüências obtidas por meio do sequenciamento foram tratadas e unidas utilizando software CodonCode Aligner e então comparadas com seqüências depositadas no banco de dados genético GenBank *National Center for Biotechnology Information* (NCBI), utilizando-se da plataforma *Basic Local Alignment Search Tool* (BLASTn) para identificação dos isolados. Por fim, a seqüência tratada foi submetida para depósito no GenBank (ID: MZ827660), e o software MEGA X foi utilizado para construção da similaridade filogenética.

4.1.4. Teste de resistência a metais

Como metais pesados podem ser encontrado em locais de descarte de pneus (Horner, 1996), foi realizado o teste para determinação da tolerância dos isolados a metais. Foi utilizado o método de concentração inibitória mínima (CIM), seguido a metodologia elaborada por Filali et al. (2000), com modificações. Assim, foram utilizados cloreto de mercúrio (HgCl₂) e nitrato de prata (AgNO₃), cloreto de cádmio (CdCl₂), cloreto de cobre (CuCl₂) cloreto de níquel (NiCl₂), sulfato de ferro (FeSO₄), zinco elementar (Zn, presente no pneu), cloreto de bário (BaCl₂) e sulfato de cobalto (CoSO₄) para testar a tolerância ao mercúrio, prata, cádmio, cobre, níquel, ferro, zinco, bário e cobalto, respectivamente.

As bactérias foram cultivadas em meio BHI por 24 – 48 horas a 30 °C. Após o crescimento, 100 µl do meio de cultivo foram adicionados em 1 mL de meio BHI novo contendo diferentes concentrações dos metais, previamente preparados, em placa de microtitulação de 96 poços. Em seguida, a placa foi incubada por 24 horas a 30 °C. As concentrações, em mM, dos metais foram: HgCl₂ e AgNO₃ (12000, 6000, 3000, 1500,

750, 375, 187.5, 93.75, 46.87, 23.44, 11.72 e 5.86), CdCl₂, CuCl₂ e NiCl₂ (16000, 8000, 4000, 2000, 1000, 500, 250, 125, 62.5, 31.25, 15.62 e 7.81), FeSO₄ e Zn (8000, 4000, 2000, 1000, 500, 250, 125, 62.5, 31.25, 15.62, 7.81 e 3.91), BaCl₂ (1280, 640, 320, 160, 80, 40, 20, 10, 5, 2.50, 1.25, 0.62) e CoSO₄ (6400, 3200, 1600, 800, 400, 200, 100, 50, 25, 12.5, 6.25 e 3.12).

A tolerância foi determinada pelo crescimento bacteriano no meio contendo o metal, sendo observado pela turbidez do meio e confirmada com a transferência de 5 µl de cada poço para meio ágar nutriente e incubadas em estufa a 30° C por 24 horas. As placas, com a menor concentração do metal, nas quais foram observados crescimento bacteriano representaram a tolerância da bactéria ao metal testado. Para comparação da turbidez e confirmação do crescimento bacteriano na concentração testada dos metais, foi preparada uma placa de microtitulação nas mesmas condições citadas acima, mas sem adição de microrganismos, sendo igualmente incubada a 30 °C por 24 horas para se avaliar a capacidade de recuperação dos isolados.

4.1.5. Antibiógrama

A susceptibilidade dos isolados bacterianos aos antibióticos foi determinada pelo teste de disco-difusão, seguindo orientações de Jorgensen & Turnidge (2015) e o guia *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing* (CLSI, 2016), com adaptações. As bactérias foram cultivadas em ágar nutriente por 24 horas a 30 °C. Após o crescimento, as colônias crescidas foram suspensas em salina (NaCl 0,85% m/v) até atingir 0,5 de turbidez, de acordo com a escala de McFarland. Com a turbidez ajustada, utilizando-se de um swab estéril, foi realizado o inóculo da suspensão em placa de Petri contendo meio ágar de Muller-Hilton, pelo método de varredura. Discos de antimicrobianos foram adicionados sobre o meio, dispostos com espaçamento equidistantes, e a placa foi incubada em estufa a 30 °C por 24 horas.

Os antimicrobianos testados foram escolhidos de forma aleatória, sendo: Amicacina (AMI 30), Amoxicilina + clavulanato (AMC 30), Ampicilina (AMP 10) Aztreonam (ATM 30), Cefazolina (CFZ 30), Cefepime (CPM 30), Cefoxitina (CFO 30), Ceftazidima (CAZ 30), Ceftriaxona (CRO 30), Ciprofloxacina (CIP 05), Cloranfenicol (CLO 30), e Gentamicina (GEN 10), Tetraciclina (TET 30) e Meropenem (MPM 10). O resultado de sensibilidade ou de resistência foi determinado pela formação de zonas de inibição do crescimento bacteriano em torno do disco, que então foi medido e comparado

com dados já estabelecidos para cada antimicrobiano disponibilizado pelo *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST, 2021).

4.2. Um microrganismo não previsto

Durante o desenvolvimento do protocolo para o teste de dessulfurização, um dos frascos contendo meio e borracha apresentou contaminação com crescimento característico de fungos. Assim, 100 µL deste crescimento foram assepticamente tomados e adicionados a lâmina de microscopia e observados ao microscópio óptico (40x), onde foi possível visualizar estruturas semelhantes a esporos. Considerando que o meio não possuía adição de fonte energética além da borracha, uma alíquota do mesmo foi retirada, inoculada em ágar nutriente para tentativa de isolamento do microrganismo e inclusão do mesmo ao teste de dessulfurização.

4.2.1. Isolamento

Alíquotas de 10 e 100 µL do meio com a contaminação foram retiradas, após vigorosa agitação, e adicionados em placas de Peri contendo ágar nutriente previamente autoclavados. O líquido foi espalhado pelo ágar com auxílio de alça de Drigalski assepsiada com álcool 70% e chama do bico de Bunsen. Em seguida, as placas foram então incubadas em estufa por 24/48 horas 30 °C. Suspeitando que o microrganismo seria proveniente da borracha, alguns grânulos da BP-III foram então adicionados em meio líquido BHI e em ágar nutriente e incubados nas mesmas condições.

Após período de incubação, foi observado o crescimento de micélio nas placas inoculadas com o meio onde se constatou a contaminação, confirmando se tratar de um fungo desconhecido. Nos meios onde a BP-III fora adicionada o crescimento micelar também foi observado.

4.2.2. Identificação molecular

A extração de DNA foi realizada utilizando o micélio como material biológico. Foi inoculado um pequeno fragmento do micélio fúngico, cultivado em meio Ágar Nutriente, em tubo de ensaio contendo 10 mL de Caldo Extrato de Malte (MEB), que é constituído de: 2% de extrato de malte, 2% de glicose e 1% de peptona. O MEB inoculado foi incubado durante 72h a 30 °C, no escuro e agitação de 130 rpm. O micélio foi recolhido

por filtração a vácuo em filtro de celulose estéril e em seguida lavado duas vezes com 10 mL de NaCl 0,85% 9 (m/v). O micélio foi coletado e utilizado para extração de DNA.

A extração de DNA foi procedida com a utilização da solução Tampão de Lise SDS, conforme descrito em Rodrigues et al. (2017) e o DNA obtido foi ressuspenso em 100 µL de água ultra-pura. Posteriormente, o DNA teve a região ITS1-18S-ITS2 amplificada por PCR, utilizando os primers ITS1 (5'-GAACCGGCGGARGGATCA-3') e ITS2 (3'-GCTGCGTTCTTCATCGATGC-5') (White et al. 1990; Schmidt et al. 2013). A reação foi preparada para o volume total de 20 µL, contendo 50 ng de DNA, 4 µL de HOT MOLPol Blend Master Mix (Molegene, Germany) e 0,5 µM de cada primer. Em termociclador, a reação foi realizada nas seguintes condições: desnaturação inicial de 95 °C/15 min, seguidos por 35 ciclos de 95 °C/30 s, 55°C/30 s e 72 °C/30 s. O alongamento final foi realizado a 72 °C por 5 min.

O produto da PCR foi então purificado utilizando de esferas magnéticas Agencourt AMPure XP SPRI. Os produtos da PCR foram normalizados após quantificá-los com um fluorômetro Qubit 2.0 (Invitrogen), com o kit de ensaio Qubit dsDNA HS (Invitrogen); sendo o produto purificado encaminhado para o sequenciamento. Este foi realizado o método de sequenciamento *single-end* utilizando o equipamento MiSeq Sequencing System (Illumina Inc., USA), juntamente com os reagentes do kit MiSeq Reagent Kit v2 (Illumina Inc., USA).

As sequências foram analisadas por meio do *pipeline* Sentinel, onde os arquivos fastq foram avaliados quanto à qualidade Phred (QP) usando o programa FastQC v.0.11.8 (Andrews, 2010). A seguir, os arquivos fastq foram tratadas utilizando *software* proprietário construído em Python v.3.6, inspirado nas funcionalidades do projeto BioPython (Cock et al. 2009). Por fim, utilizou-se a ferramenta BLAST, disponível em: <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>, para comparação das semelhanças da sequência de ácidos nucleotídicos com as sequências da região ITS1-18S-ITS2 de espécies fúngicas depositadas no GenBank. Posteriormente, foi realizado depósito das sequências geradas ao GenBank, e utilizou o *software* MEGA X para construção da similaridade filogenética.

4.3. Desvulcanização

4.3.1. Obtenção e preparo da borracha

A BP a ser utilizada para os testes de dessulfurização foi cedida pela empresa Ecotire®, que realiza reciclagem de pneus usados. Para os testes realizados, foi utilizada

a borracha vulcanizada em grânulos (BP-III), pela maior área de superfície e maior facilidade de manuseio.

Previamente ao início dos testes, a BP-III foi submetida a um processo de assepsia. 1% (p/v) da BP-III foi adicionado a frascos erlenmeyers de 250 mL, e em seguida foi adicionado álcool 70% até cobrir a BP-III completamente. Manteve-se os frascos em agitação a 50 rpm por 24h em temperatura média de 30 °C para ocorrer a assepsia da BP-III.

Posteriormente o álcool foi retirado e os frascos mantidos em capela de segurança biológica com bico de Bunsen aceso até que a BP-III estivesse completamente seca e os frascos livres de álcool.

4.3.2. Preparo do inóculo

Primeiramente as bactérias foram reativadas em meio BHI líquido e após crescimento foram inoculadas em 50 mL de meio BH sem $MgSO_4$ e acrescido de 0,1% (m/v) de extrato de levedura e 1% (m/v) de glicose adicionado em erlenmeyers de 100 mL previamente esterilizado. Em seguida, os frascos contendo as bactérias inoculadas foram incubados em *shaker* a 130 rpm, 30 °C por 72 – 96 horas para induzir privação de nutrientes (*starvation*).

Após o período de incubação, 10 mL do caldo de cultivo foi distribuído em tubos do tipo Falcon de 15 mL, previamente esterilizados por autoclavagem e realizou-se a centrifugação dos cultivos a 4000 rpm, por 15 min e 4 °C. O sobrenadante foi descartado, 10 mL de solução salina (NaCl 0,85%) foi adicionada e o *pellet* foi ressuscitado, sendo realizada uma nova centrifugação. Por mais duas vezes o sobrenadante foi descartado, o *pellet* foi ressuscitado com solução salina. Após a terceira centrifugação, a lavagem estava completa e foi adicionado 10 mL de meio mínimo BH sem $MgSO_4$, (BH-s) como representado na Figura 7.

Para o fungo, o inóculo foi realizado ao adicionar 10 µl da solução de estoque em glicerol 20% diretamente ao meio de teste.

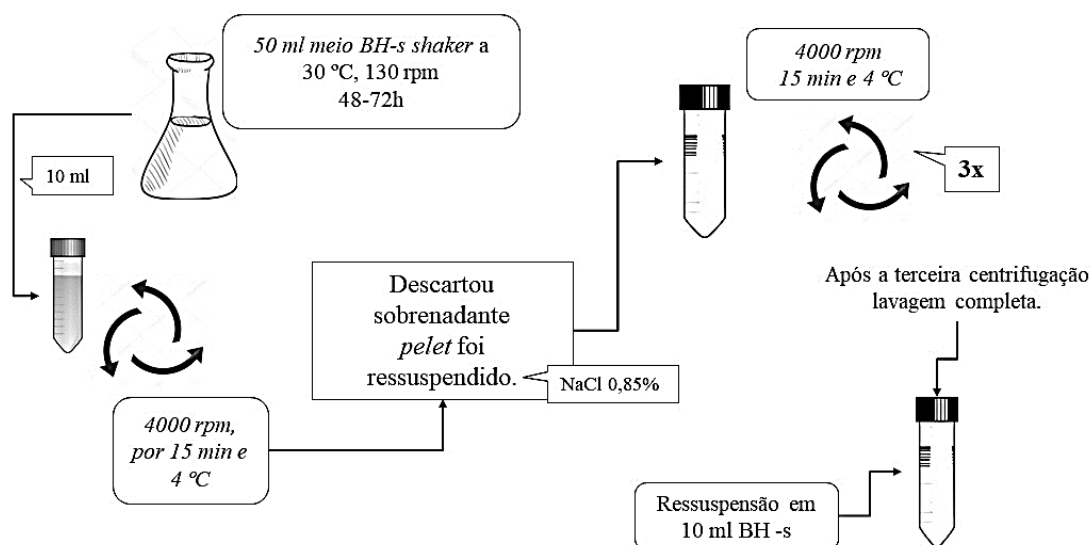


Figura 7. Fluxograma do protocolo de preparo do inóculo bacteriano para o teste de desvulcanização. Primeiramente, as bactérias foram cultivadas em meio mínimo de sais em fonte de enxofre até a privação de nutrientes e as células foram lavadas do meio de cultivo com solução salina por centrifugação e ressuspendidas em novo meio de cultivo. Fonte: autoria própria.

4.3.3. Tratamento de desvulcanização

Meio mínimo BH-s foi utilizado para realização do teste de dessulfurização. Em frascos erlenmeyers de 250 mL já contendo a BP-III após realização da assepsia, foram adicionados 90 ou 100 mL do meio BH-s, previamente autoclavado a 120 °C, 1 atm por 15 min e contendo 0,1% m/v de glicose. Por fim, os 10 mL do inóculo bacteriano e 10 µl de solução de estoque contendo o fungo foram acrescidos aos meios, respetivamente. Foram preparados quatro frascos erlenmeyers para cada microrganismo, sendo que cada frasco seria analisado em diferentes tempos: imediatamente após o inóculo (0 d), 07, 14 e 21 dias após o inóculo um para cada tempo de não contendo inoculo bacteriano, e todos os fracos foram pesados.

Também foram preparados dois frascos erlenmeyers para comparação com os frascos com microrganismos: um contendo BP-III e meio, sem microrganismos para controle (-M) e o outro contendo apenas o meio (BM), que também foram pesados.

A análise do crescimento microbiano e presença de SO_4^{-2} foram realizadas como descrito a seguir.

Primeiramente, os frascos foram pesados e em seguida 10 mL foram retirados dos frascos e adicionados em tubos do tipo Falcon de 15 mL esterilizados e levado para

centrifugação a 4000 rpm, 4 °C por 13 min. O sobrenadante foi descartado e ao tubo foi adicionado salina para recuperação de células microbianas ali presentes, que foram então destinadas para a análise do crescimento celular por densidade óptica (DO) a 600nm para os cultivos com bactérias (Li et al. 2012) e 630 nm para o cultivo com o fungo (Amich et al. 2013). Logo após o inóculo este procedimento foi realizado com o frasco destinados a análise no dia do inóculo (0 d), para zero dias após inóculo, assim como para os 07, 14 e 21 dias após o inóculo; após pesagem dos frascos.

O procedimento descrito foi realizado também para os frascos -M e BM, no entanto o sobrenadante da centrifugação não foi descartado, sendo este destinado para análise de SO_4^{2-} .

Para os demais frascos, o meio restante após a alíquota retirada para a centrifugação foi filtrado por filtração a vácuo utilizando membrana celulose de 0,22 micrometros (MF-Millipore™ Filtros em Membrana, Merck, Darmstadt, Alemanha). Cerca de 10 mL do conteúdo da filtração foi destinado para a análise de SO_4^{2-} e a membrana contendo a BP-III foi encaminhada para secagem em recipiente contendo sílica gel e armazenada para análise em MEV. Após os 21 dias a BP-III do frasco -M também foi recuperada e submetida ao MEV. Na Figura 8, observa-se o fluxograma representando o procedimento realizado para o teste de dessulfurização.

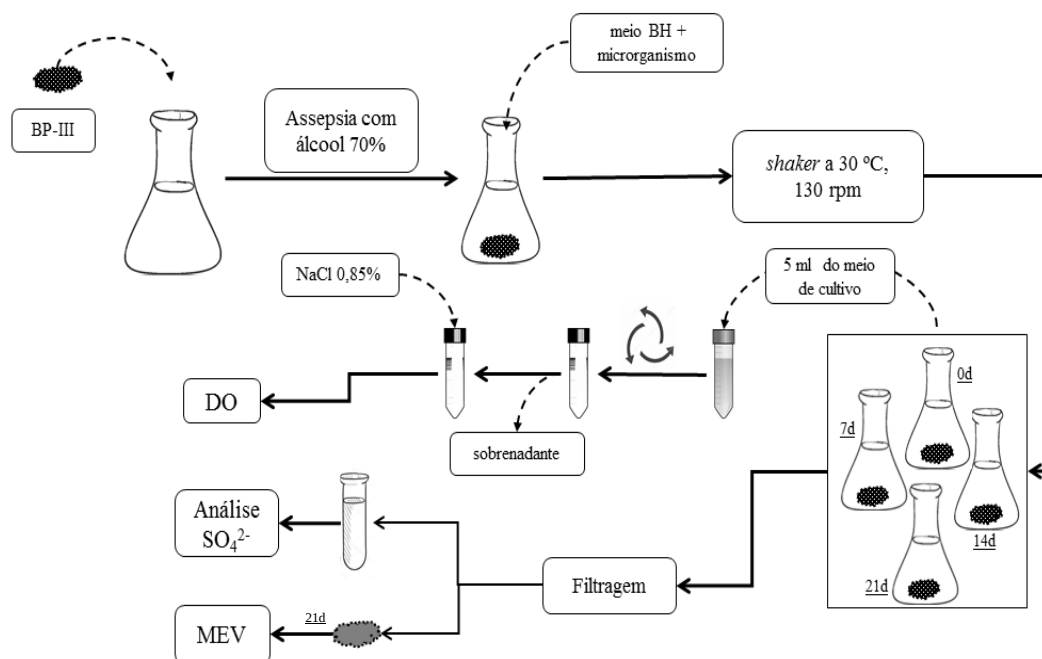


Figura 8. Fluxograma para o teste de dessulfurização. Iniciando com a assepsia da borracha, o teste de dessulfurização seguiu-se com a adição do meio do

microrganismo a cada frasco de cultivo. Após período de incubação, os frascos foram processados para as análises de DO, SO_4^{-2} e MEV. Fonte: autoria própria.

4.3.4. Quantificação de SO_4^{-2}

Para a detecção de SO_4^{-2} no meio foi utilizado o Spectro Kit Sulfato (Alfakit Ltda, Santa Catarina, BR). Primeiramente, foi utilizado meio BH preparado nas mesmas condições do teste para calibragem do equipamento. Em seguida, 5 mL do meio recuperado após a filtração foi adicionado em tubo de ensaio e a adição dos reagentes e a análise em Fotocolorímetro AT 100P Multiparâmetro (Alfakit Ltda, Santa Catarina, Brasil) seguiram de acordo com as orientações do kit.

5. RESULTADOS

5.1. Bioprospecção de microrganismos

5.1.1. Bactérias

Após cultivo em aerobiose foi isolada uma bactéria, denominada como D1, com uma característica morfológica da colônia de coloração branca, opaca e de borda regular. A mesma foi incubada em microaerofilia, mas seu crescimento não foi observado. Do cultivo inicialmente em microaerofilia foi também isolada uma bactéria, denominada DAF, com coloração branca, cremosa e de borda levemente irregular. Esta também foi incubada em aerobiose sendo observado o seu crescimento nessa condição, sugerindo ser uma bactéria aeróbia facultativa.

Pela coloração de Gram foi possível observar a morfologia celular e classificar de acordo com a composição da parede celular. O isolado D1 foi classificado como gram-negativa, apresentando morfologia de bacilo e o isolado DAF foi classificado como gram-positiva e morfologia de coco (Tabela 1).

Após incubação em ágar MaccConkey foi observado o crescimento da bactéria D1 neste meio de cultivo, enquanto o mesmo não pode ser observado para a bactéria DAF. Os resultados dos testes bioquímicos podem ser observados na Tabela 1.

Tabela 1. Caracterização bioquímica

Item	D1	DAF
MacConkey	P	N
DNase	N	N
Gelatinase	-	N
Motilidade	P	N
Indol	N	N
H ₂ S	N	N
Catalase	P	P
Citratro	P	N
Urease	N	P
Lactose	N	N
Oxidase	N	N
KOH	P	-
Oxidação	P	N
Fermentação	P	N
Esculina	P	N
Gram	N	P
NaCl 6,5%	P	P
42° C	P	P

Descrição dos resultados obtidos pela caracterização bioquímica dos isolados bacterianos, P representa resultado positivo e N representa resultado negativo. (-) representa resultado inconclusivo. MacConkey: crescimento em meio ágar MacConkey; DNase: determinação da enzima DNase; Gelatinase: ação proteolítica da gelatinase; Indol: produção de indol; H₂S: produção de sulfeto de hidrogênio; Catalase: determinação da enzima catalase; Citratro: crescimento em meio citrato; Urease: determinação da enzima uréase; Lactose: fermentação da lactose em meio ágar MacConkey; Oxidase: determinação da enzima oxidase; KOH: reação de Ryu; Oxidação: oxidação da glicose em meio OF-glicose; Fermentação: fermentação da glicose em meio OF-glicose; Esculina: hidrólise da esculina; Gram: determinação do gram; NaCl 6,5% e 42°: crescimento a 42 °C e em NaCl 6,5% em meio BHI.

Com a identificação molecular foi possível identificar apenas o isolado DAF, devido à baixa qualidade da sequência do isolado D1 obtida após o tratamento com o *software* CodonCode Aligner. Sendo assim, com os dados das provas bioquímicas analisados com o *software* IDENTAX - *Bacterial Identifier* (Flores et al. 2009) este isolado é uma provável *Pseudomonas* sp.

Após a realização do BLAST a bactéria DAF obteve 99,96% de similaridade com a sequência para *Staphylococcus warneri*, sendo possível observar na Figura 9 a proximidade filogenética. A sequência obtida após tratamento e alinhamento está descrita em Apêndice 1, juntamente com o número de identificação da submissão realizada na plataforma GenBank (ID: MZ827660).

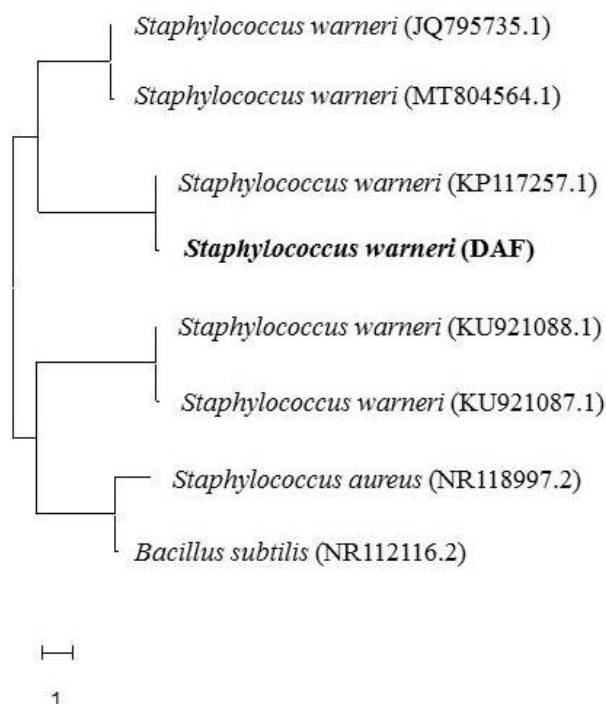


Figura 9. Dendrograma da similaridade genética do isolado DAF baseado no rRNA do gene 16S. Dendrograma construído utilizando o método Neighbor-Joining. Análise realizada no *software* MEGA X.

5.1.2. Um microrganismo não previsto

O microrganismo isolado da contaminação apresentou-se um fungo, possuindo micélio de coloração branca, que se torna rosada após cerca de 48h de crescimento em meio nutritivo. Por microscopia 40x observou-se que os esporos possuíam forma fusiforme, com as extremidades alongadas. O resultado obtido pelo BLAST revelou que o fungo isolado pertence ao gênero *Fusarium*, com 98% de semelhança com *F. chlamydosporum*, sendo representado na Figura 10 onde observa-se o dendrograma da similaridade genética. A sequência obtida após tratamento e alinhamento está descrita em Apêndice 2, juntamente com o número de identificação do depósito da mesma realizado na plataforma GenBank (ID: MZ836005).

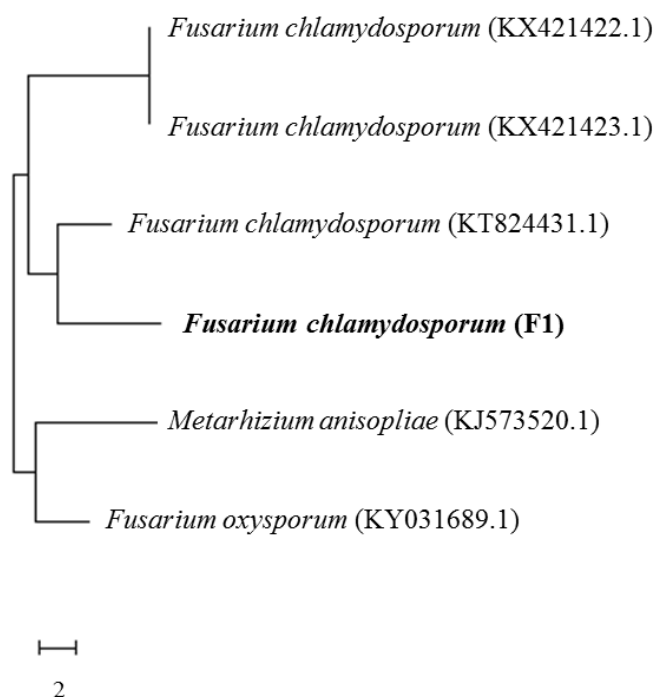


Figura 10. Dendrograma da similaridade genética do fungo F1 baseado na região ITS1-18S-ITS. Dendrograma construído utilizando o método Neighbor-Joining. Análise realizada no *software* MEGA X.

5.2. Antibiógrama e teste de resistência a metais

Após identificação das bactérias, o resultado do antibiógrama foi comparado com a tabela de ponto de corte com base no gênero dos isolados e disponível pelo EUCAST (2021). Assim, para D1 havia dados relacionados a apenas cinco dos antibióticos testados, sendo que se revelou sensível para dois e intermediária para os três restantes. Já DAF se revelou resistente para dois dos antibióticos, sendo sensível a oito daqueles testados e para um obteve resultado de intermediária.

Na Tabela 2 pode-se observar a que o isolado D1 foi sensível a Amicacina e Aztreonam, e a DAF foi sensível a Amicacina, Cefazolina, Cefepime, Cefoxitina, Ceftriaxona, Gentamicina, Tetraciclina e Meropenem.

Tabela 2. Antibiógrama dos isolados bacterianos.

Antibiótico	D1	DAF
Amicacina	S	S
Amoxicilina + clavulanato		R
Ampicilina		R
Aztreonam	S	-
Cefazolina		S
Cefepime	I	S
Cefoxitina		S
Ceftazidima	I	-
Ceftriaxona		S
Ciprofloxacina	I	I
Gentamicina		S
Tetraciclina		S
Meropenem		S

Determinação da resistência e susceptibilidade dos isolados bacterianos a antibióticos, onde R representa resistente, S sensível e I representa intermediária.

Com o teste de resistência a metais realizados apenas para os isolados bacterianos (Tabela 3), observou-se que ambas as bactérias são resistentes a todos os íons metálicos testados. A D1 cresceu nas concentrações mais altas de CdCl, BaCl₂, FeSO₄ e Zn; e a DAF também suportou a concentração mais alta de BaCl₂, mas para HgCl a DAF foi capaz de crescer apenas na menor concentração.

Tabela 3. Concentração Inibitória Mínima de metais em que houve crescimento bacteriano.

Item	CIM (mM)	
	D1	DAF
HgCl	23.44	<i>11.72</i>
CdCl	16000	125
AgNO ₃	46.87	1500
BaCl ₂	1280	1280
CoSO ₄	3200	3200
FeSO ₄	8000	4000
Zn	8000	4000
CuCl ₂	4000	31.25
NiCl ₂	2000	31.25

Concentração Inibitória Mínima (CIM) de metais pesados para ambos isolados bacterianos. Em negrito, maior concentração testada e suportada pela bactéria. Em itálico, menor concentração testada.

5.3. Teste de Dessulfurização

Entre os isolados bacterianos, a maior quantidade de SO_4^{-2} foi observada nos frascos de meio de cultivo contendo a bactéria D1, no entanto, o fungo F1 apresentou maior quantidade de SO_4^{-2} final quando comparado com ambas as bactérias, como observado na Figura 11. Como observado, no meio onde não houve adição de microrganismo também foi detectada a presença de SO_4^{-2} . No entanto, como os valores de D1 e F1 ao final dos 21 dias são superiores ao de M-, temos que os microrganismos de fato atuaram sobre a borracha.

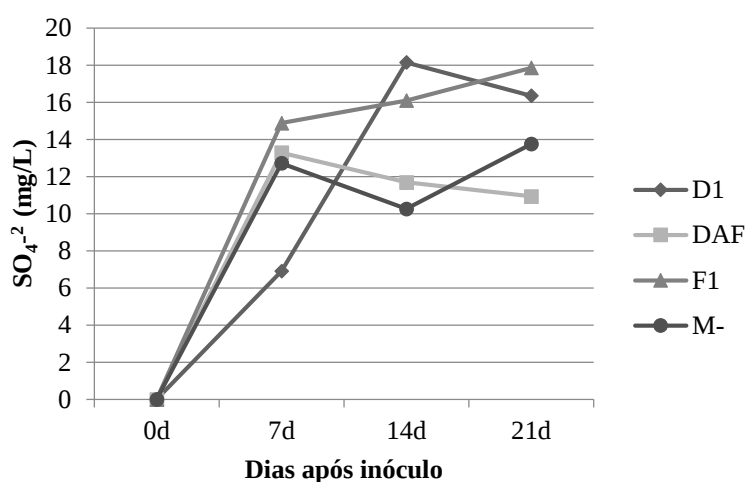


Figura 11. Análise de SO_4^{-2} no meio de cultivo. Conteúdo de SO_4^{-2} detectado no meio de cultivo, determinado em quatro momentos diferentes após o inóculo, onde (d) representa dias após o inóculo e M- é o meio contendo borracha sem microrganismo.

Com os dados obtidos pela análise da DO dos meios de cultivos, expresso pela absorbância e representados na Figura 12, observa-se que D1 demonstrou crescimento inicialmente mais lento, porém estável e o isolado DAF apresentou crescimento rápido inicialmente, com leve queda no dia 15, mas aumenta novamente alcançando valores semelhantes a D1 no dia 21.

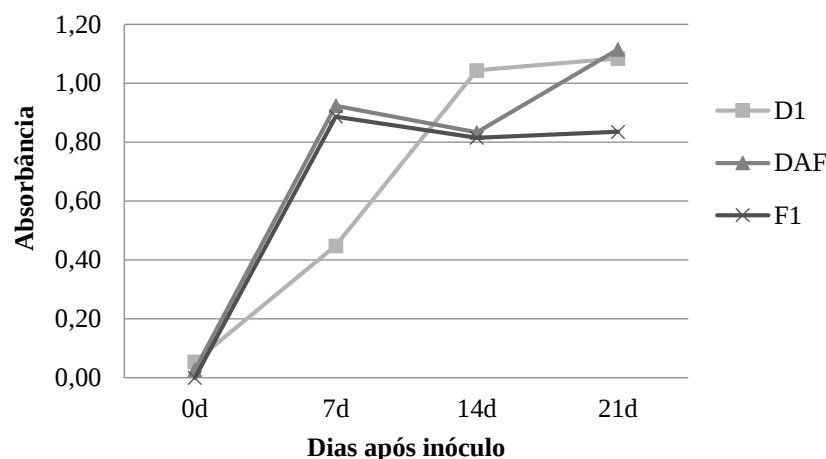


Figura 12. Análise do crescimento celular expressa em absorbância. Observa-se a multiplicação celular para as bactérias *Pseudomonas* sp e *S. warneri* (DAF), e para o fungo *F. chlamydosporum* detectada pela DO e expressa em absorbância em quatro momentos durante o decorrer do teste de dessulfurização.

Na Figura 13 apresenta-se a representação gráfica da relação entre o peso inicial e final dos frascos de cultivo nos dias 7, 14 e 21 após o inóculo, obtido pela diferença entre o valor da pesagem inicial e pesagem final. O gráfico mostra que com o decorrer dos dias a diferença de peso aumenta, ou seja, o peso aferido no primeiro dia do teste foi maior que o valor obtido nos demais dias, sendo que a queda foi progressiva ao decorrer dos dias, e no 21º dia a diferença entre os pesos iniciais e finais é mais pronunciado. Assim, infere-se que houve perda de massa, sendo provável que a BP-III estava sendo utilizada pelos microrganismos, sendo que a bactéria DAF apresenta maior diferença entre o peso inicial e final.

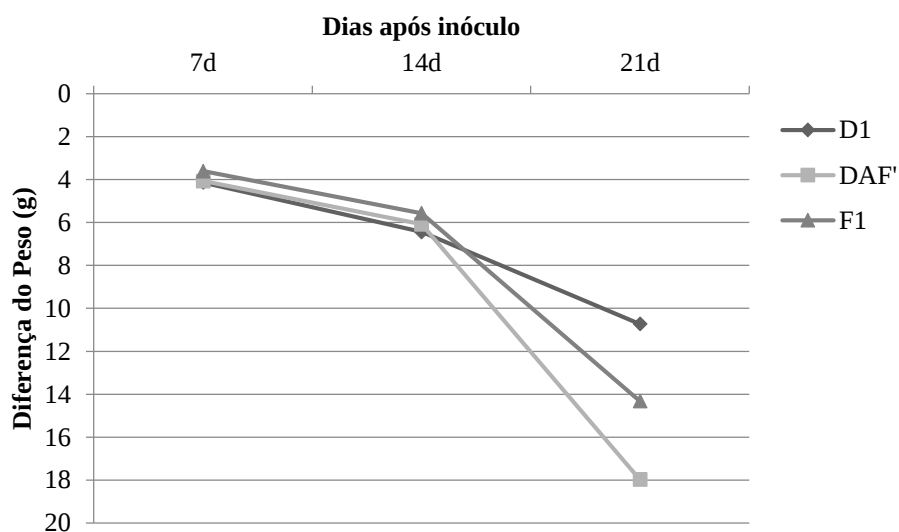


Figura 13. Diferença entre o peso inicial e final dos frascos de cultivo. Representação gráfica do aumento da diferença entre o peso inicial e final dos frascos de cultivo, indicando que quanto maior a duração do teste, maior foi a perda de conteúdo do frasco.

A análise com MEV da BP-III tratadas com as bactérias (Figuras 14 e 15) mostra que a D1 (Figuras 14C, 15A e 15B) foi menos agressiva a matriz polimérica, conservando melhor a mesma se em comparada com a DAF (Figuras 14D, 15C e 15D) e o fungo F1 (Figuras 14E, 16A e 16B). Na Figura 14A vemos a BP-III não tratada e não assepsiada, ou seja, a BP-III triturada no estado original, na qual se observa a estrutura da borracha íntegra.

A Figura 14B apresenta a BP-III submetida ao meio de cultivo teste sem a adição microrganismos, M- e considerado como controle. O estado da matriz polimérica é semelhante em ambos os casos. Nas Figuras 14C, 15A e 15B, temos o resultado do tratamento da BP-III com a bactéria D1 e vemos que a mesma provocou alterações na matriz, mas não tanto quanto a DAF (Figuras 14D, 15C e 15D), estando mais propensa à degradação. Também se observa que ambas possuem dois tipos de células bacterianas, o que pode advir da própria borracha.

Na Figura 14E observa-se a BP-III tratada com o fungo, e visualizamos a rede hífica formada pelo crescimento fúngico. Em conjunto, é possível observar o dano realizado pelo fungo, que deixou a superfície da borracha com orifícios e irregularidades pronunciadas.

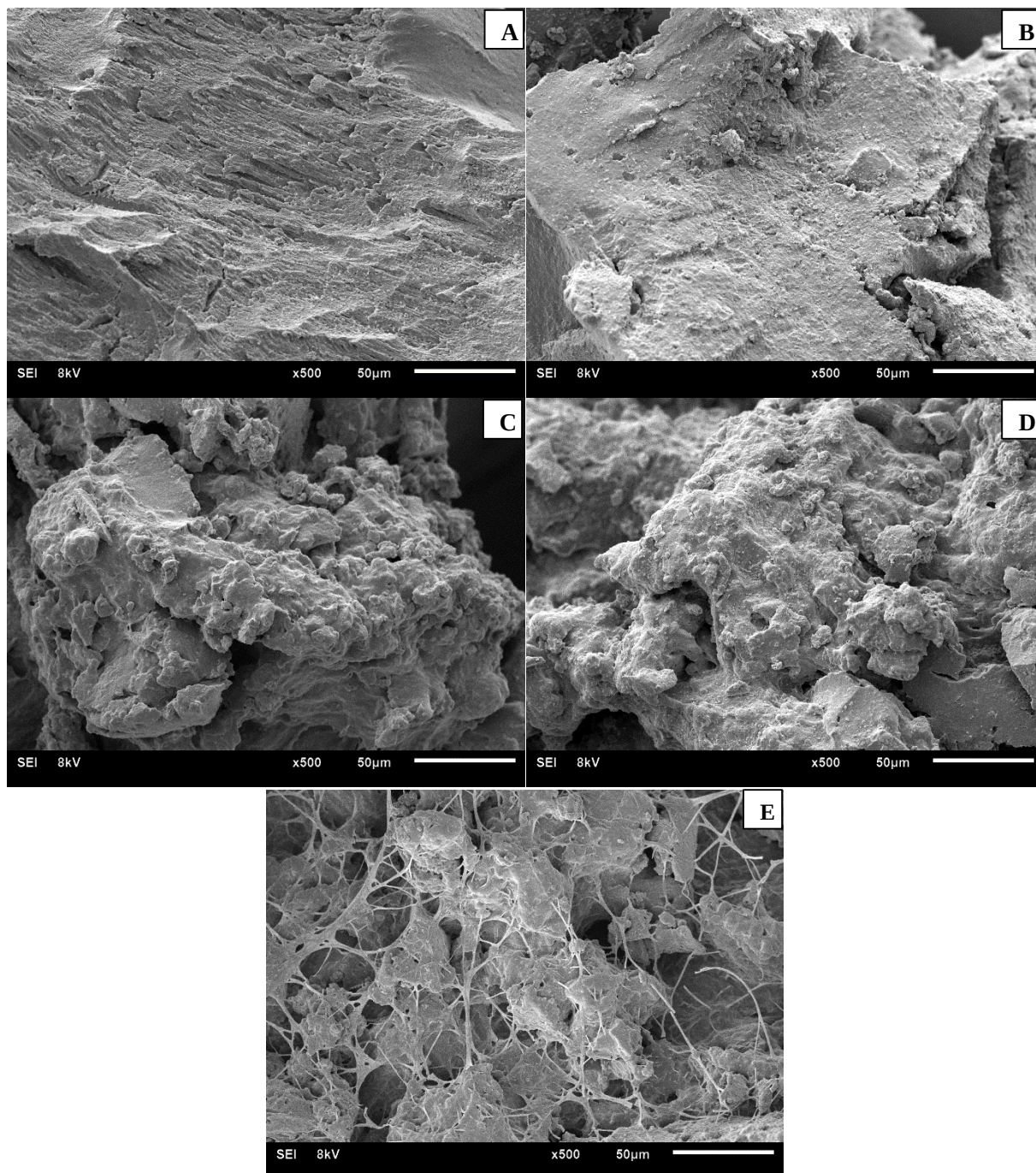


Figura 14. Micrografia Eletrônica de Varredura da borracha não tratada e tratada. Imagens obtidas por MEV realizado pelo LabMic/UFG. A: BP-III não tratada e não assepsiada; B: borracha de pneu granulada assepsiada, inoculada em meio de cultivo sem microrganismos após 21 dias de incubação; C: borracha de pneu granulada tratada com isolado bacteriano D1 após 21 dias de incubação; D: borracha de pneu granulada tratada com isolado bacteriano DAF, após 21 dias de incubação; E: borracha de pneu granulada tratada com o fungo F1, após 21 dias de incubação. Aumento de 500x.

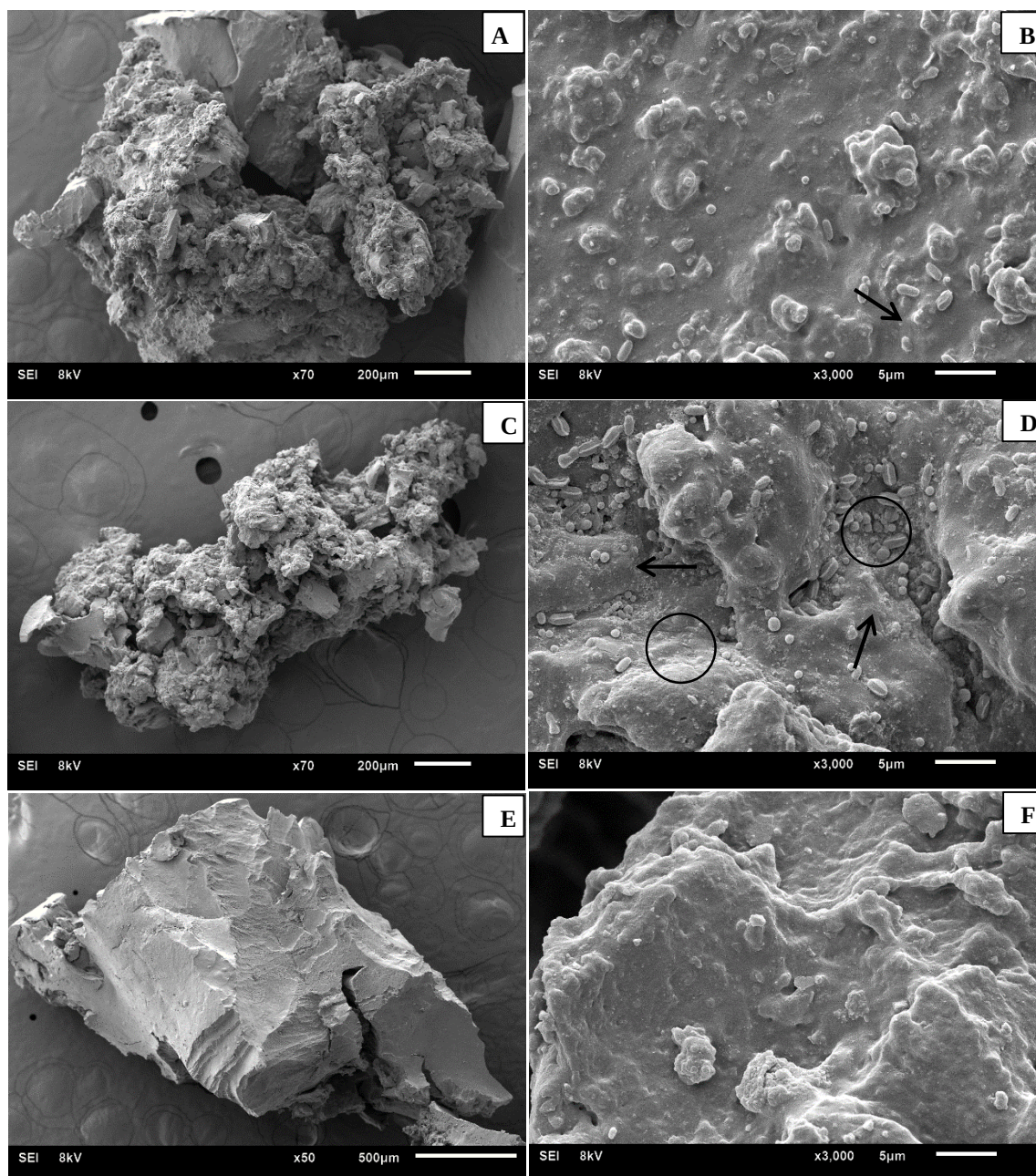


Figura 15. Micrografia Eletrônica de Varredura da borracha de pneu granulada tratada com os isolados bacterianos. Imagens obtidas por MEV realizado pelo LabMic/UFG. A-B: BP-III tratada com isolado bacteriano D1 após 21 dias de incubação em aumento de 70x e 3000x respectivamente; C-D: BP-III tratada com isolado bacteriano DAF após 21 dias de incubação em aumento de 70x e 3000x respectivamente. No aumento de 70x observa o dano realizado ao grão da BP-III e no aumento de 3000x observa-se a presença de bactérias (seta) assim como reentrâncias causadas pela degradação bacteriana (círculo). E-F: BP-III não tratada em aumento de 70x e 3000x

O tratamento com o fungo demonstra degradação da matriz polimérica. Vale ressaltar a capacidade de colonização de F1, pois como observado nas figuras 14E, 15B e 16C, a superfície da BP-III foi recoberta por hifas e é possível observar falhas no polímero onde a BP-III foi degradada, indicando que o fungo atacou a matriz polimérica e a utilizou como suporte para crescimento, além da provável utilização de seus compostos como fonte de carbono.

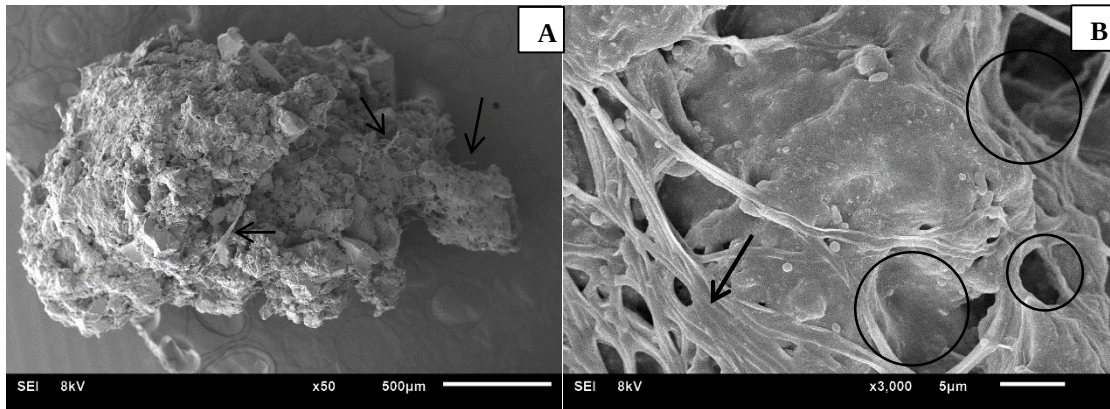


Figura 16. Micrografia Eletrônica de Varredura da borracha de pneu granulada tratada com o fungo F1 em menor e maior aumento. Imagens obtidas por MEV realizado pelo LabMic/UFG. A-B: BP-III tratada com fungo F1 após 21 dias de incubação em aumento de 50x e 3000x respectivamente. No aumento de 50x observa o dano produzido pelo fungo ao grão da BP-III e algumas estruturas de hifa (seta), e no aumento de 3000x observam-se hifas (seta) e a deterioração da BP-III (círculo).

6. DISCUSSÃO

Apesar de possuírem importância para diferentes setores da indústria, pneus também são causa de preocupação ambiental, pois seu descarte direto no meio ambiente pode acarretar na contaminação do ambiente e gera risco para a saúde pública. Mesmo sendo de difícil reciclagem devido a vulcanização da borracha e outros componentes estruturais, medidas governamentais foram instauradas para incentivar a retirada de pneus inservíveis do meio ambiente e reutilizá-los em novos produtos.

Dentre as possíveis formas de reciclagem do pneu, a mais interessante é o reuso da borracha que é impossibilitado pela estrutura rígida conferida pela vulcanização. Assim pesquisas que visam a quebra das ligações cruzadas da matriz polimérica pela desvulcanização da borracha foram conduzidas em diferentes grupos, sendo a desvulcanização microbiana recebeu mais interesse por ser mais ambientalmente amigável. Portanto, este durante estudo foi realizada a bioprospecção de microrganismos e a capacidade de dessulfurização dos isolados obtidos foi testada, de forma a observa o potencial de serem empregados no processo de reciclagem da borracha.

A identificação molecular do isolado nomeado DAF, obtido pelo método de enriquecimento seletivo com DMSO e incubação microanaerobiose, resultou em 99,66% de similaridade com *Staphylococcus warneri*. Esta foi primeiramente isolada de pele humana, por Kloos & Schleifer em 1975, anteriormente conhecida por *S. epidermis* e atualmente relatadas por causarem endocardite e colonizarem próteses e cateteres (Kuvhenguhwa et al. 2017). São bactérias cocos, gram-positivas, sem motilidade e apresentam capacidade de aerobiose facultativa em meio de tioglicolato. Dentre as cepas estudadas pelos autores, todas apresentaram atividade de catalase fraca ou moderada e 95% apresentaram atividade fraca ou nenhuma para DNase (Kloos & Schleifer, 1975). Tais características também foram apresentadas pelo isolado DAF com os resultados das provas bioquímicas realizadas.

Por não ter sido possível identificar o isolado D1 com o método de sequenciamento genético, foi utilizado os dados do teste bioquímico para inferir o gênero com o software IDENTAX, resultando que D1, provavelmente, pertença ao gênero *Pseudomonas*. Este compreende bastonetes gram-negativos não fermentadores capazes de se adaptarem a qualquer ambiente, mas encontrada mais comumente em locais úmidos, sendo pouco exigentes em relação aos nutrientes (Brooks et al. 2012).

O teste de resistência a metais indicou que ambos os isolados bacterianos toleram múltiplos metais pesados, o que pode indicar propensão para resistência a antibióticos. Tais características são geralmente relatadas em conjunto, pois a ocorrência de um implica na ocorrência de outro devido a co-seleção de genes de resistência e a localização de tais genes serem próximas (Gullberg et al. 2014; Pal et al. 2015; Feßler et al. 2016; Li et al. 2016).

De acordo com Owolabi & Hekeu, (2014), a tolerância a metais é uma característica adquirida em condições de estresse metabólico. Sendo assim, a tolerância aos metais pesados pode ser devido ao local escolhido para a realização do isolamento, pois o mesmo pode ser considerado como ambiente de condições extremas devido à presença de produtos derivados do petróleo. A possibilidade de encontrar microrganismos resistentes à alta concentração de contaminantes é alta em tais locais (Li et al 2012) foi motivo de escolha do local, pois esta característica é desejável em termos de biorremediação. A possibilidade de eliminar tais metais ou compostos que estão na presença dos mesmos, como no caso da BP que possui zinco, do meio ambiente por microrganismos se torna de maior viabilidade quando o agente é capaz de tolerar o estresse.

Durante a elaboração e otimização do protocolo do teste de dessulfurização foi isolado da borracha granulada um fungo, posteriormente identificado pelo método molecular como *Fusarium chlamydosporum*. Espécies de *Fusarium* são conhecidas por sua fitopatogenicidade, sendo que algumas espécies são capazes de produzir grande variedade de metabólitos secundários e outras podem vir a causar micoses oportunistas (Suga & Hyakumachi, 2004). *F. chlamydosporum*, não é considerado de importância fitopatogênica, podendo ser classificado como patógeno secundário em folhas de mangueira (Omar et al. 2018).

O teste conduzido com objetivo de avaliar o potencial dos microrganismos isolados em realizar a quebra das ligações sulfídricas presente na borracha granulada de pneu inservível demonstrou que os isolados D1 e DAF são capazes de realizar conversão do enxofre em SO_4^{-2} , demonstrado pela presença do mesmo no meio de cultivo após período de incubação. Assim como em Jiang et al (2010), não houve adição de sais contendo SO_4^{-2} no meio, portanto, o S convertido estava presente na superfície da borracha.

Dentre os dois isolados, D1 apresentou conteúdo de SO_4^{-2} final mais elevado, mas os resultados apresentados pelo fungo F1 demonstraram que este espécime possui maior

potencial para realizar a dessulfurização. No entanto, também degradou a matriz polimérica, característica que pode vir a ser explorada ao objetivar a degradação de pneus existentes no meio ambiente, mas que para o reuso da borracha não é interessante pois há a perda do polímero. A degradação pelo fungo já foi relatado, sendo que estudos com resultaram na degradação da borracha. Ali Shah, (2013) comenta sobre os resultados de Zeb, (2009), onde é possível observar a rede de hifas do fungo *Paecilomyces variotii*, observando que fungos possuem maior propensão de crescer em materiais com superfície rugosa e mais danificada devido a maior facilidade de adesão.

Também foi detectado SO_4^{-2} no meio onde não foi realizado inóculo microbiano, não sendo possível acessar o motivo deste ocorrido. Conjectura-se que tenha sido ação de microrganismos que permaneceram na borracha mesmo após assepsia com álcool. Assim, é provável que apenas a higienização não seja suficiente pois a superfície da borracha é irregular e impossibilita a assepsia profunda, sendo que nas imagens de MEV das borrachas tratadas foram observadas células bacterianas de dois tipos.

No entanto, autoclavagem também não promove esterilização da borracha, pois Tatangelo (2019) caracterizou a comunidade microbiana de borracha de pneu granulada, antes e depois de realizar a autoclavagem da borracha e demonstrou que mesmo após autoclavagem comunidades microbianas foram encontradas. Ademais, este processo promove a desvulcanização da borracha (Rajan et al. 2006, Dobrotă & Dobrotă 2019) e, portanto, não foi considerado para redução da microbiota da borracha de pneu a ser testada.

Como a detecção de SO_4^{-2} foi realizada em frascos independentes para cada tempo de análise, não foi possível observar o aumento da conversão de enxofre de forma linear, como em Jiang et al (2010) que conduziu a desvulcanização por 20 dias utilizando *Thiobacillus ferrooxidans*. Porém, com as imagens em MEV é possível afirmar que houve ação microbiana na borracha, devido ao dano na estrutura polimérica, assim como observado em Hu et al. (2016), porém de forma mais acentuada. De fato, o fungo isolado por Zeb (2009) (Ali Shah et al. 2013) aderiu a borracha e causou erosão também observada em MEV, sendo que fungos são mais propensos a aderir e danificar a borracha (Ali Shah et al. 2013).

A degradação da borracha afetou no peso dos frascos de cultivos, onde no dia final a massa foi menor que a do dia inicial, com destaque para o isolado DAF. Considerando o crescimento celular, observado por meio da DO, esperava-se que houvesse aumento da massa. Mas como houve diminuição, infere-se que os microrganismos utilizaram a

borracha em seu metabolismo. Bosco & Mollea (2021) relata que já foi demonstrado que para microrganismos capazes de secretar enzimas a BN representou uma fonte de carbono e Li et al.(2012) propõe que a reação de oxidação realizada por *Sphingomonas* sp. durante a dessulfurização de grânulos de borracha foi catalisada por enzimas.

No âmbito da biorremediação ambiental, sabe-se que espécies de estafilococos podem degradar hidrocarbonetos de petróleo (Xu, Liu, et al., 2018; Hentati et al., 2021), componentes também presentes no pneu. Ademais, Srivastava et al. (2012) isolou *Staphylococcus* sp de solo contaminado com arsênico e comprovou a capacidade da cepa em remover o metaloide do meio de cultivo, e Ayed et al. (2010) relata a capacidade de *S. epidermidis* em degradar corantes. Quanto ao uso biotecnológico de *S. warneri* há estudos relatando a extração de lipases (Volpato et al. 2010; Yele & Desai, 2014) e produção de nanopartículas de ouro (Nag et al. 2017). Similarmente, há relatos com *Pseudomonas*, sendo que *P. putida* foi utilizada em teste de comparação quanto a desvulcanização de pneus, juntamente com outras dez bactérias e apesar de ter apresentado conteúdo de SO_4^{-2} no meio, teve a menor ação de desvulcanização dentre todas as espécies avaliadas (Ghavipankeh et al. 2018). Em reporte compilado por Andler (2020), é relatado que *P. citronellolis* realizou degradação de borracha sintética rubber Bode et al., 2000 e *Pseudomonas* sp. degradou borracha natural e borracha vulcanizada.

Em relação às pesquisas com biodegradação, há dados referentes a outras espécies de *Fusarium*. Xu et al., (2018) relata sobre cepa de *F. solani* que, dentre 18 cepas pertencentes a diferentes gêneros, apresentou maior atividade quando testada para degradação de enxofre inorgânico. Ademais, *F. solani* já foi relatado por usar um hidrocarboneto aromático policíclico, benzo(a)pireno, como única fonte de carbono após ter sido isolado de composto orgânico contaminado por combustível (Rafin et al. 2000; Veignie et al. 2004; Verdin et al. 2005) Ademais, *F. oxysporus* foi isolado de vitrais que aparentavam biodegradação microbiana (Corrêia Pinto et al. 2019) e *F. oxysporus* e *F. falciforme*, isolados de contaminação por plástico, apresentaram em conjunto com duas outras espécies fúngicas as melhores atividades em degradar polietileno (Spina et al., 2021). Assim, podemos observar que espécies fúngicas apresentam grande plasticidade metabólica e podem ser empregados como agentes de biorremediação.

O método de enriquecimento seletivo utilizando DMSO para bioprospectar microrganismos resultou em duas bactérias, *Pseudomonas* sp e *S. warneri*. Inesperadamente foi isolado o fungo *F. chlamydosporum* da borracha de pneu granulada

e todos os microrganismos foram utilizados para avaliação do potencial de dessulfurização.

O melhor resultado foi apresentado por *F. chamydosporum*, que também apresentou maior degradação da matriz polimérica, o que mostra a possibilidade de ser usado na remediação do pneu pela sua degradação, reduzindo assim os riscos que este passivo ambiental representa para o meio ambiente e a saúde pública. Por fim, os resultados apresentados são estimuladores para o avanço das pesquisas referentes à reciclagem e remediação de pneus inservíveis, e demais usos de microrganismos como agentes de biorremediação de contaminantes ambientais.

7. CONCLUSÕES

Duas bactérias foram isoladas de local considerado como ambiente extremo por conter derivados de petróleo. A identificação molecular foi possível apenas para um dos isolados, identificado como *S. warneri*. Posteriormente, foi isolado da borracha o fungo *F. chlamydosporum* e todos demonstraram potencial de dessulfurização. As bactérias foram avaliadas para resistência a metais e antibióticos, sendo observada a tolerância de ambas para todos os metais testados.

S. warneri apresentou menores níveis de SO_4^{-2} no meio, o que pode indicar menor potencial de dessulfurização. Como foi possível observar a degradação da BP-III por este isolado, utilizá-lo em pesquisas futuras de biorremediação de pneu ainda é uma possibilidade, assim como é este o caso para o fungo, pois foi observado que o mesmo possui potencial tanto para a dessulfurização quanto para a degradação da BP-III. Inclusive, os níveis de SO_4^{-2} encontrados no meio de cultivo foram maiores que o das bactérias e é possível que ainda realize a detoxificação de outros compostos presentes na BP.

A detecção de SO_4^{-2} no meio sem inóculo e a presença de bactérias na borracha deste meio torna necessário aperfeiçoar o protocolo de assepsia para melhor observar a ação dos microrganismos isolados. Ademais, é interessante avaliar a dessulfurização utilizando de consórcio, analisar como o processo seria afetado utilizando de biorreator, e a viabilidade tanto prática quanto econômica do processo em novas condições. Além disso, são necessárias pesquisas em relação ao mecanismo de dessulfurização e/ou degradação da borracha realizada pelas bactérias e pelo fungo, assim como para determinar o possível uso em escala industrial nas melhores condições ou se pode ser aplicado em pneus presentes no ambiente, aterros e depósitos.

REFERÊNCIAS

- Abreu FVS, Delatorre E, Santos AAC, Ferreira-de-Brito A, Castro MG, Ribeiro IP, Lourenço-de-Oliveira R. Combination of Surveillance Tools Reveals That Yellow Fever Virus Can Remain in the Same Atlantic Forest Area at Least for Three Transmission Seasons *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 114, 2019. <https://doi.org/10.1590/0074-02760190076>
- Adhikari B, De D, Maiti S. Reclamation and Recycling of Waste Rubber *Prog. Polym. Sci.*, 25(7), 909–948, 2000. [https://doi.org/10.1016/s0079-6700\(00\)00020-4](https://doi.org/10.1016/s0079-6700(00)00020-4)
- Akiba M, Hashim AS. Vulcanization and crosslinking in elastomers. *Prog. Polym. Sci.*, 22(3), 475–521, 1997. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S00796700\(96\)000159](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S00796700(96)000159)
- Ali Shah A, Hasan F, Shah Z, Kanwal N, Zeb S. Biodegradation of natural and synthetic rubbers: A review *Int. Biodeterior. Biodegradation*, 83, 145–157, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.biod201305004>
- Allied Market Research 2020. Disponível em: <https://www.alliedmarketresearch.com/brazil-automotive-tire-market-A07485>. Acesso em: 20/05/2021,
- Almeida CAP, Silva RM. Análise da Ocorrência dos Casos de Dengue e Sua Relação com as Condições Socioambientais em Espaços Urbanos: os Casos de João Pessoa, Cabedelo e Bayeux, no Estado da Paraíba – Brasil - *Hygeia*, 14(27), 56–79, 2018. <https://doi.org/10.14393/hygeia142705>
- Amari T, Themelis NJ, Wernick IK. Resource recovery from used rubber tires *Resources Policy*, 25(3), 179–188, 1999. [https://doi.org/10.1016/s0301-4207\(99\)00025-2](https://doi.org/10.1016/s0301-4207(99)00025-2)
- Amich J, Schafferer L, Haas H, Krappmann S. Regulation of Sulphur Assimilation Is Essential for Virulence and Affects Iron Homeostasis of the Human-Pathogenic Mould *Aspergillus fumigatus*. *PloS Pathog*, 9(8), e1003573. 2013. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003573>
- Andler R. Bacterial and enzymatic degradation of poly(cis-1,4-isoprene) rubber: Novel biotechnological applications. *Biotechnol. Adv.* 44:107606. 2020. doi:10.1016/j.biotechadv.2020.107606
- Andrade JA, Augusto F, Jardim ICSF. Biorremediação de solos contaminados por petróleo e seus derivados. *Ecletica Quim J.*, São Paulo, v. 35, n. 3, p.17-43, 2010.
- Andrews, S. FASTQC A quality control tool for high throughput sequence data. 2010. Available online at: <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc>
- ANIP - Associação Nacional da Indústria de Pneumáticos. Dados Gerais, 2021. Disponível em: <https://www.aniporgbr/anip-em-numeros/dados-gerais/> March 17, 2021.
- ANIP - Associação Nacional da Indústria de Pneumáticos. História do Pneu, 2018. Disponível em: <https://www.aniporgbr/historia-e-fabricacao/> April 4, 2021.

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Microbiologia Clínica Detecção e Identificação de Bactérias, 1–150, 2013. Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/centraisdeconteudo/publicacoes/servicosdesaude/publicacoes>

Asaro L, Gratton M, Seghar S, Aït Hocine N. Recycling of rubber wastes by devulcanization *Resour Conserv Recycl*, 133, 250–262, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.resconrec.2018.02.016>

Ayed L, Chaieb K, Cheref A, Bakhrouf A. Biodegradation and Decolorization of Triphenylmethane Dyes by *Staphylococcus Epidermidis*. *Desalination*, 260(1-3), 137–146, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.desal.2010.04.052>

Babich I. Science and technology of novel processes for deep desulfurization of oil refinery streams: a review. *Fuel*, 82(6), 607–631, 2003. [https://doi.org/10.1016/s0016-2361\(02\)00324-1](https://doi.org/10.1016/s0016-2361(02)00324-1)

Bailon-Salas A, Ordaz-Diaz L, Valle-Cervantes S, Miranda L, Urtiz-Estrada N, Paez-Lerma J, Rojas J. Characterization of Culturable Bacteria from Pulp and Paper Industry Wastewater, with the Potential for Degradation of Cellulose, Starch, and Lipids *Bioresources*, 13, 2018. <https://doi.org/10.15375/biores.13350525064>

Barbosa R, Ambrósio JD. Devulcanization of natural rubber compounds by extrusion using thermoplastics and characterization of revulcanized compounds *J. Polym. Res*, 26(7), 2019. <https://doi.org/10.1007/s10965-019-1820-7>

Baroni LR, Paixão B, Chrispino A, Guedes G, Barcellos C, et al. Análise Exploratória da Malária na Amazônia Brasileira por Meio da Plataforma de Ciência de Dados aplicada à Saúde. *Anais do Brazilian e-Science Workshop (BreSci)*. Published online June 24, 2019. doi:10.5753/bresci.2019.10025

Beattie AJ, Hay M, Magnusson B, Nys R, Smeathers J, Vincent JFV. Ecology and Bioprospecting. *Austral Ecol*, 36(3), 341–356, 2010. <https://doi.org/10.1111/j.1442-9993.2010.02170.x>

Bentzon-Tilia M, Gram L. Biotechnological Applications of the Roseobacter Clade In *Bioprospecting: Success, Potential and Constraints* (pp 137–166), 2017. https://doi.org/10.1007/978-3-319-47935-4_7

Borel M, Kergomard A, Renard MF. Degradation of Natural Rubber by *Fungi imperfecti*. *Agric. Biol. Chem.* 46(4), 877–881, 1982. <https://doi.org/10.1080/00021369198210865189>

Bosco F, Mollea C. Biodegradation of Natural Rubber: Microcosm Study. *Water air soil pollut.*, 232(6), 2021. <https://doi.org/10.1007/s11270-021-05171-7>.

Brasil. Resolução CONAMA Nº 416/2009 - “Dispõe sobre a prevenção à degradação ambiental causada por pneus inservíveis e sua destinação ambientalmente adequada, e dá outras providências”, 2009. www.2mm.gov.br

Bredberg K, Christiansson M, Stenberg B, Holst O. Biotechnological Processes for Recycling of Rubber Products *Biopolymers Online*, 2005. <https://doi.org/10.1002/3527600035bpol2011>

Brooks GF, Carroll KC, Butel JS, Morse SA, Mietzner TA. *Microbiologia Médica de Jawetz, Melnick E Adelberg*. AMGH, McGraw-Hill Companies, Inc; 2012.

Christiansson M, Stenberg B, Wallenberg LR, Holst O. Microbial desulfurization for NR ground rubber by *Thiobacillus ferrooxidans* *Biotechnol. Lett.*, 20(7), 637–642, 1998. <https://doi.org/10.1023/a:1005306220566>

CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 26th ed. *CLSI - Supplement M100S*. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2016

Cock PJA, Antao T, Chang JT, Chapman BA, Cox CJ, et al. Biopython: Freely Available Python Tools for Computational Molecular Biology and Bioinformatics. *Bioinformatics*, 25(11), 1422–1423, 2009. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp163>

Coran AY. Vulcanization In: J E Mark, F R Eirich, & B Erman (Eds), *Science and Technology of Rubber*, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/B978-012464786-2/50010-9>

Corrêa Pinto AM, Palomar T, Alves LC, et al. Fungal biodeterioration of stained glass windows in monuments from Belém do Pará (Brazil). *Int Biodeterior Biodegradation*. 2019;138:106-113. doi:<https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2019.01.008>

De D, Das A, De D, Dey B, Debnath SC, Roy BC. Reclaiming of ground rubber tire (GRT) by a novel reclaiming agent. *Eur Polym J*, 42(4), 917–927, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2005.10.003>

De SK, Isayev AI, Khait K. *Rubber recycling* Boca Raton, FL: Taylor & Francis/Crc Press, 2005.

Dionisi H, Lozada M, Olivera N. Bioprospection of marine microorganisms: Biotechnological applications and methods *Rev Argent Microbiol*, 44, 49–60, 2012. <https://doi.org/10.1590/S032575412012000100010>

Dobrotă D, Dobrotă G. Reducing of Energy Consumption by Improving the Reclaiming Technology in Autoclave of a Rubber Wastes *Energies*, 12(8), 2019. <https://doi.org/10.3390/en12081460>

Elnaggar MY, Fathy ES, Amdeha E, Hassan MM. Impact of Gamma Irradiation on Virgin Styrene Butadiene Rubber Blended with Ultrasonically Devulcanized Waste Rubber *Polym Eng Sci*, 59(4), 807–813, 2019. <https://doi.org/10.1002/pen.25014>

ETRMA - European Tyre and Rubber Manufacturers Association. In Europe 95% of All End of Life Tyres Were Collected and Treated in 2019, 2021. Disponível em: <https://www.etrma.org/news/in-europe-94-of-all-end-of-life-tyres-were-collected-and-treated-in-2019/>

EUCAST - The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 11.0, 2021. <http://www.eucast.org>

Feßler AT, Zhao Q, Schoenfelder S, Kadlec K, Brenner Michael G, et al. Complete sequence of a plasmid from a bovine methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*

harbouring a novel ica-like gene cluster in addition to antimicrobial and heavy metal resistance genes *Vet Microbiol* 200, 95–100, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2016.07.010>

Fiksel J, Bakshi Bhavik R, Baral A, Guerra E, DeQuervain B. Comparative life cycle assessment of beneficial applications for scrap tires *Clean Technol Environ Policy*, 13(1), 19–35, 2011. <https://doi.org/10.1007/s1009801002891>

Filali BK, Taoufik J, Zeroual Y, Dzairi FZ, Talbi, M, et al. Waste Water Bacterial Isolates Resistant to Heavy Metals and Antibiotics *Curr. Microbiol.*, 41(3), 151–156, 2000. <https://doi.org/10.1007/s0028400>

Flores O, Belanche LA, and Blanch AR. New multiplatform computer program for numerical identification of microorganisms. *J Clin Microbiol* 47:4133–4135, 2009.

Forrest M. *Recycling and re-use of waste rubber*, 2014. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/304570696_Recycling_and_Re-use_of_Waste_Rubber

Ghorai S, Bhunia S, Roy M, De D. Mechanochemical devulcanization of natural rubber vulcanizate by dual function disulfide chemicals *Polym Degrad Stab*, 129, 34–46, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.polymdegradstab.2016.03.024>

Grossman MJ Lee MK, Prince RC, Garrett K K, George GN, et al. Microbial Desulfurization of a Crude Oil Middle-Distillate Fraction: Analysis of the Extent of Sulfur Removal and the Effect of Removal on Remaining Sulfur. *Appl Environ Microbiol*, 65(1), 181–188, 1999. <https://doi.org/10.1128/aem.65.1.181-188.1999>

Gullberg E, Albrecht LM, Karlsson C, Sandegren L, Andersson DI. Selection of a Multidrug Resistance Plasmid by Sublethal Levels of Antibiotics and Heavy Metals. *mBio*, 5(5), 2014. <https://doi.org/10.1128/mbio.01918-14>

Hentati D, Cheffi M, Hadrich F, Makhloufi N, Rabanal et al. Investigation of halotolerant marine *Staphylococcus* sp CO100, as a promising hydrocarbon-degrading and biosurfactant-producing bacterium, under saline conditions *J Environ Manag*, 277, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2020.111480>

Horner JM. Environmental health implications of heavy metal pollution from car tires. *Rev. Environ. Health*, London, UK, n. 11, p.175–178, 1996.

Hu M, Zhao S, Li C, Wang B, Yao C, et al. The influence of different Tween surfactants on biodesulfurization of ground tire rubber by *Sphingomonas* sp. *Polym Degrad Stab* 107, 91–97, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.polymdegradstab.2014.04.025>

Ikeda Y. Understanding network control by vulcanization for sulfur crosslinked natural rubber (NR) In S Kohjiya & Y Ikeda (Eds), *Chemistry, Manufacture and Applications of Natural Rubber* (pp 119–134), 2014. <https://doi.org/10.1533/97808570969131119>

Ismail W, El-Sayed WS, Abdul Raheem AS, Mohamed ME, El Naya AM. (2016). Biocatalytic Desulfurization Capabilities of a Mixed Culture during Non-Destructive

Utilization of Recalcitrant Organosulfur Compounds. *Front Microbiol*, 7. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00266>

Jain R. Energy and Environmental Implications In: *Handbook of Environmental Engineering Assessment* (p 784) 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-388444-200012-9>

Jang S-H, Yoo T-S, Oh J-H, Iwasaki I. Discarded Tire Recycling Practices in the United States, Japan and Korea *Neophilologus*, 82(4), 607–616, 1998. <https://doi.org/10.1023/a:1004346601687>

Jorgensen J H, Turnidge J D. Susceptibility test methods: dilution and disk diffusion methods. In: Jorgensen J H, Pfaller M A, Carroll K C, Funke G, Landry M L, Richter S S, Warnock D W. *Manual of Clinical Microbiology, Eleventh Edition* (pp. 1253-1273), 2015. American Society of Microbiology.

Kaewpetch B, Prasongsuk S, Poompradub S. Devulcanization of natural rubber vulcanizates by *Bacillus cereus* TISTR 2651. *Express Polym Lett*, 13(10), 877-888, 2019. Department of Polymer Engineering, Scientific Society of Mechanical Engineering. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.3144/expresspolymLett.2019.76>. Acesso em: 20 maio 2020.

Karger-Kocsis J, Mészáros L, Bárány T. Ground tyre rubber (GTR) in thermoplastics, thermosets, and rubbers *J Mater Sci*, 48(1), 1–38, 2012. <https://doi.org/10.1007/s10853-012-6564-2>

Kilbane JJ. Biodesulfurization: How to Make it Work? *Arab J Sci Eng*. 2016;42(1):1-9. doi:10.1007/s13369-016-2269-1

Kim JK, Park JW. The biological and chemical desulfurization of crumb rubber for the rubber compounding. *J. Appl. Polym. Sci*. 1999;72(12):1543-1549. doi:10.1002/(sici)1097-4628(19990620)72:12<1543::aid-app6>3.0.co;2-3

Kloos WE, Schleifer KH. Isolation and Characterization of Staphylococci from Human Skin II Descriptions of Four New Species: *Staphylococcus warneri*, *Staphylococcus capitis*, *Staphylococcus hominis*, and *Staphylococcus simulans* *Int J Syst Bacteriol*, 25(1), 62–79, 1975. <https://doi.org/10.1099/00207713-25-1-62>

Krzmarzick MJ, Taylor DK, Fu X, McCutchan AL. Diversity and Niche of Archaea in Bioremediation. *Archaea*, 2018, 1–17, 2018. <https://doi.org/10.1155/2018/3194108>

Kuvhenguhwa MS, Belgrave KO, Shah SU, Bayer AS, Miller LG. A Case of Early Prosthetic Valve Endocarditis Caused by *Staphylococcus Warneri* in a Patient Presenting with Congestive Heart Failure *Cardiol Res*, 8(5), 236–240, 2017. <https://doi.org/10.14740/cr588w>

Lagarinhos CAF, Tenório JAS. Logística reversa dos pneus usados no Brasil. *Polímeros*, 23(1), 49–58, 2012. <https://doi.org/10.1590/s0104-14282012005000059>

Lagarinhos CAF, Tenório JAS. Tecnologias utilizadas para a reutilização, reciclagem e valorização energética de pneus no Brasil. *Polímeros*, 18(2), 106–118. 2008 <https://doi.org/10.1590/s0104-14282008000200007>

Li L-G, Xia Y, Zhang T. Co-occurrence of antibiotic and metal resistance genes revealed in complete genome collection *ISME J*, 11(3), 651–662, 2016. <https://doi.org/10.1038/ismej2016155>

Li S, Lamminmäki J, Hanhi K. Effect of Ground Rubber Powder and Devulcanizates on the Properties of Natural Rubber Compounds *J Appl Polym Sci*, 97(1), 208–217, 2005. <https://doi.org/10.1002/app21748>

Li Y, Zhao S, Wang Y. Microbial desulfurization of ground tire rubber by *Thiobacillus ferrooxidans* *Polym Degrad Stab*, 96(9), 1662–1668, 2011. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.polymdegradstab201106011>

Liu L, Cai G, Zhang J, Liu X, Liu K. Evaluation of engineering properties and environmental effect of recycled waste tire-sand/soil in geotechnical engineering: A compressive review *Renew Sustain Energy Rev*, 126, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2020.109831>

Lo Presti D. Recycled Tyre Rubber Modified Bitumens for road asphalt mixtures: A literature review. *Constr Build Mater*, 49, 863–881, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.conbuildmat.2013.09.007>. Acesso em: 20 mai. 2020.

Maduranga K, Attanayake RN, Santhirasegaram S, Weerakoon G, Paranagama PA. Molecular Phylogeny and Bioprospecting of Endolichenic Fungi (ELF) Inhabiting in the Lichens Collected from a Mangrove Ecosystem in Sri Lanka *PLoS One*, 13(8), 2018. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0200711>

Ministério da Saúde (BR) (2020) Monitoramento dos casos de arboviroses urbanas transmitidas pelo Aedes (dengue, chikungunya e Zika), Semanas Epidemiológicas 01 a 52 *Bol Epidemiol [Internet]*, 51(02), 1–16, 2020. Disponível em: <http://www.saude.gov.br/boletins-epidemiologicos>

Ministério da Saúde (BR). Monitoramento dos casos de arboviroses urbanas transmitidas pelo Aedes (dengue, chikungunya e Zika), Semanas Epidemiológicas 01 a 52 *Secretaria de Vigilância Em Saúde Bol Epidemiol [Internet]*, 49(49), 1–16, 2018. Disponível em: <http://www.saude.gov.br/boletins-epidemiologicos>

Ministério da Saúde (BR). Secretaria de Vigilância em Saúde Vigilância em saúde no Brasil 2003|2019: da criação da Secretaria de Vigilância em Saúde aos dias atuais *Bol Epidemiol [Internet]* 1-154, 2019 Acesso em: Ago 2021. Disponível em: <http://www.saude.gov.br/boletins-epidemiologicos>

Miyazu H. (2021, September 2). Brazil Tire Market Detailed Analysis of Current Industry Figures with Forecasts Growth - Comserveonline. Acesso em 18 de outubro de 2021. Disponível em: <<https://www.comserveonline.com/news-releases/brazil-tire-market-detailed-analysis-of-current-industry-figures-with-forecasts-growth/10063188>>

Mohebbi G, Ball AS, Kaytash A, Rasekh B. Dimethyl Sulfoxide (DMSO) as the Sulfur Source for the Production of Desulfurizing Resting Cells of *Gordonia Alkanivorans* RIPI90A *Microbiology*, 154(3), 878–885, 2008. <https://doi.org/10.1099/mic02007/013011-0>

Nag S, Pramanik A, Chattopadhyay D, Bhattacharyya M. Green-fabrication of gold nanomaterials using *Staphylococcus warneri* from Sundarbans estuary: an effective recyclable nanocatalyst for degrading nitro aromatic pollutants *Environ Sci Pollut Res Int*, 25(3), 2331–2349, 2017. DOI: 10.1007/s11356-017-0617-7

Omar NH, Mohd M, Nor M, Zakaria L. Characterization and pathogenicity of *Fusarium* species associated with leaf spot of mango (*Mangifera indica* L) *Microb Pathog*, 114, 362–368, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2017.12.026>

Ostad MS, Ansarifar A, Estagy S. A Review of the Reclaiming of Rubber Waste and Recent Work on the Recycling of ethylene-propylene-diene Rubber Waste. *Rubber Chem Technol*, 54-78(89), 2016. <https://doi.org/10.5254/rct.1584850>

Owolabi J, Hekeu M. Heavy Metal Resistance and Antibiotic Susceptibility Pattern of Bacteria Isolated from Selected Polluted Soils. *Int J Appl Sci*, 14, 6–6, 2014 Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/269704588_42206-7373-IJBAS-IJENS_December_2014_IJENS_I_J_E_N_S_Heavy_Metal_Resistance_and_Antibiotic_Susceptibility_Pattern_of_Bacteria_Isolated_from_Selected_Polluted_Soils_in

Pal C, Bengtsson-Palme J, Kristiansson E, Larsson DGJ. Co-occurrence of resistance genes to antibiotics, biocides and metals reveals novel insights into their co-selection potential. *BMC Genomics*, 16(1), 2015. <https://doi.org/10.1186/s12864-015-2153-5>

Parravicini F. *Characterization of Enzymes from Desulfurizing Bacterial Strains* [Tese de Doutorado Doutorado di Ricerca in Scienza dei Materiali], 2015. Disponível em: https://boa.unimib.it/retrieve/handle/10281/76247/112962/PhD_unimib_%20073333.pdf

Rafin C, Potin O, Veignie E, Lounes-Hadj AS, Sancholle M. Degradation of Benzo[a]Pyrene as Sole Carbon Source by a Non White Rot Fungus, *Fusarium Solani*. *Polycycl Aromat Compd*, 21(1-4), 311–329, 2000. <https://doi.org/10.1080/10406630008028542>

Rajan VV, Dierkes WK, Joseph R, Noordermeer JWM. Science and technology of rubber reclamation with special attention to NR-based waste latex products *Prog. Polym. Sci*, 31(9), 811–834, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2006.08.003>

Ramarad S, Khalid M, Ratnam CT, Chuah AL, Rashmi W. Waste tire rubber in polymer blends: A review on the evolution, properties and future *Prog Mater Sci*, 72, 100–140, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.pmatsci.2015.02.004>

ReciclAnip - O Ciclo Sustentável do Pneu, 2019 Disponível em: May 27, 2020, <http://www.reciclaniporgbr/formas-de-destinacao/ciclo-do-pneu/>

ReciclANIP. Indústria Nacional de Pneumáticos coletou mais de 380 mil toneladas de pneus inservíveis em todo o Brasil, 2021. Disponível em: <https://www.reciclaniporgbr/noticia/industria-nacional-de-pneumaticos-coletou-mais-de-380-mil-toneladas-de-pneus-inserviveis-em-todo-o-brasil/>

Rodgers B, Waddell W. Tire Engineering. In: J E Mark, F R Eirich, & B Erman (Eds), *Science and Technology of Rubber*, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/B978-012464786-2/50017-1>

Rodrigues P, Venâncio A, Lima N. Toxic Reagents and Expensive equipment: Are They Really Necessary for the Extraction of Good Quality Fungal DNA? *Lett Appl Microbiol*, 66(1), 32–37, 2017. <https://doi.org/10.1111/lam12822>

Rooj S, Basak GC, Maji PK, Bhowmick AK. New Route for Devulcanization of Natural Rubber and the Properties of Devulcanized Rubber *J Polym Environ*, 19(2), 382–390, 2011. <https://doi.org/10.1007/s10924-011-0293-5>

Santos RG, Rocha CL, Felipe FLS, Cezario FT, Correia, P J, et al. Tire waste management: an overview from chemical compounding to the pyrolysis-derived fuels *J Mater Cycles Waste Manag*, 22(3), 628–641, 2020. <https://doi.org/10.1007/s10163-020-00986-8>

Sato S, Honda Y, Kuwahara M, Kishimoto H, Yagi N, et al. Microbial Scission of Sulfide Linkages in Vulcanized Natural Rubber by a White Rot Basidiomycete, *Ceriporiopsis subvermispora* *Biomacromolecules*, 5(2), 511–515, 2004. <https://doi.org/10.1021/bm034368a>

Schmidt P-A, Bálint M, Greshake B, Bandow C, Römbke, J et al. Illumina metabarcoding of a soil fungal community *Soil Biol Biochem*, 65, 128–132, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2013.05.014>

Scott E. Success for Brazilian Tyre Recycling Sector Tyre & Rubber Recycling, 2018. Disponível em: <https://www.tyreandrubberrecycling.com/latest-news/posts/2018/october/brazilian-tyre-recycling-sector-a-qualified-success/>. Acesso em 25/05/2021

Seghar S, Asaro L, Rolland-Monnet M, Aït Hocine N. Thermo-mechanical devulcanization and recycling of rubber industry waste *Resour Conserv Recycl*, 144, 180–186, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.resconrec.2019.01.047>

Shi J, Jiang K, Ren D, Zou H, Wang, et al. Structure and performance of reclaimed rubber obtained by different methods *J Appl Polym Sci*, 129(3), 999–1007, 2012. <https://doi.org/10.1002/app.38727>

Sienkiewicz M, Borzędowska Labuda K, Wojtkiewicz A, Janik H. Development of Methods Improving Storage Stability of Bitumen Modified with Ground Tire rubber: A Review. *Fuel Process Technol*, 159, 272–279, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.fuproc.2017.01.049>

Silva LS, Mouta JDR, Costa MCB, Gomes LG. Concreto com borracha de recauchutagem de pneu para uso em pavimentação de baixo tráfego. *Matéria (Rio J.)*, 24(2), e12361, 2019. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1517-70762019000200321&lng=en&nrm=iso. Acesso em: 22 maio. 2020. Epub June 10, 2019. <http://dx.doi.org/10.1590/s1517-707620190002.0676>

Silva MAR, Casagrande A. A controvérsia dos pneus, o princípio da prevenção e precaução e o dever de sustentabilidade *RECDUFSM*, 8, 758, 2013. <https://doi.org/10.5902/198136948404>

Sofi A. Effect of waste tyre rubber on mechanical and durability properties of concrete – A review *Ain Shams Eng J*, 9(4), 2691–2700, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.jasej.2017.08.007>

Spina F, Tummino M L, Poli A, Prigione V, Ilieva V, et al. Low density polyethylene degradation by filamentous fungi *Environ Pollut*, 274, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.jenvpol.2021.116548>

Srivastava S, Verma PC, Singh A, Mishra M, Singh N, et al. Isolation and characterization of *Staphylococcus* sp strain NBRIEAG-8 from arsenic contaminated site of West Bengal *Appl Microbiol Biotechnol*, 95(5), 1275–1291, 2012. <https://doi.org/10.1007/s00253-012-3976-5>

Stevenson K, Stallwood B, Hart AG. Tire Rubber Recycling and Bioremediation: A Review *Bioremediat J*, 12(1), 1–11, 2008. <https://doi.org/10.1080/10889860701866263>

Suga H, Hyakumachi M. Genomics of Phytopathogenic *Fusarium*. *Fungal Genom Biol* (Vol 4, pp 161–189), 2004. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S18745334\(04\)800091](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S18745334(04)800091)

Tanner K, Vilanova C, Porcar M. Bioprospecting challenges in unusual environments. *Microb Biotechnol*, [s.l.], v. 10, n. 4, p.671-673, 14 jun. 2017. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/1751-7915.12723>.

Tanner K, Vilanova C, Porcar M. Bioprospecting Challenges in Unusual Environments *Microb Biotechnol*, 10(4), 671–673, 2017. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.12723>

Tao G, He Q, Xia Y, Jia G, Yang H, et al. The effect of devulcanization level on mechanical properties of reclaimed rubber by thermal-mechanical shearing devulcanization *J Appl Polym Sci*, 129(5), 2598–2605, 2013. <https://doi.org/10.1002/app.38976>

Tatangelo V, Mangili I, Caracino P, Bestetti G, Collina E, et al. Microbial desulfurization of ground tire rubber (GTR): Characterization of microbial communities and rheological and mechanical properties of GTR and natural rubber composites (GTR/NR) *Polym Degrad Stab*, 160, 102–109, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.polymdegradstab.2018.12.021>

Tavkhelidze I, Caratelli D, Gielis J, Ricci PE, Rogava M, et al. *On a Geometric Model of Bodies with “Complex” Configuration and Some Movements* In: Gielis J., Ricci P., Tavkhelidze I. (eds) *Modeling in Mathematics*. Atlantis Transactions in Geometry, vol 2. Atlantis Press, Paris. https://doi.org/10.2991/978-94-6239-261-8_10

Varjani SJ, Upasani VN. A New Look on Factors Affecting Microbial Degradation of Petroleum Hydrocarbon Pollutants *Int Biodeterior Biodegradation*, 120, 71–83, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.jbiob.2017.02.006>

Veignie E, Rafin C, Woisel P, Cazier F. Preliminary evidence of the role of hydrogen peroxide in the degradation of benzo[a]pyrene by a nonwhite rot fungus *Fusarium solani* *Environ Pollut*, 129(1), 1–4, 2004. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jenvpol.2003.11.007>

Verdin A, Sahraoui AL, Robinson G, Durand R. Effect of the polycyclic aromatic hydrocarbon, benzo[a]pyrene, on the intracellular protein composition of *Fusarium*

solani and *Fusarium oxysporum*. *Int Biodeterior Biodegradation*, 55(3), 171–174, 2005. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2004.11.002>

Vivod R, Oetermann S, Hiessl S, Gutsche S, Remmers N, et al. Oligo(cis-1,4-isoprene) aldehyde-oxidizing dehydrogenases of the rubber-degrading bacterium *Gordonia polyisoprenivorans* VH2. *Appl Microbiol Biotechnol*, 101(21), 7945–7960, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00253-017-8508-x>. Acesso em: 04 jan. 2020

Volpato G, Filice M, Ayub MAZ, Guisan JM, Palomo JM. Single-step purification of different lipases from *Staphylococcus warneri*. *J Chromatogr A*, 1217(4), 473–478, 2010 <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2009.11.055>

Weaver SC, Charlier C, Vasilakis N, Lecuit M. Zika, Chikungunya, and Other Emerging Vector-Borne Viral Diseases *Annu Rev Med*, 69(1), 395–408, 2018. <https://doi.org/10.1146/annurev-med-050715-105122>

White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor J. *Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics* PCR Protocols, Academic Press 315–322, 1990. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-372180-850042-1>

WHO - World Health Organization. Lymphatic filariasis. 2019 Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/lymphatic-filariasis> Acesso em: 06/06/2020.

Xu H, Tsukuda M, Takahara Y, Sato T, Gu J, et al. Lithoautotrophical oxidation of elemental sulfur by fungi including *Fusarium solani* isolated from sandstone Angkor temples *Int Biodeterior Biodegradation*, 126, 95–102, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2017.10.005>

Yao C, Zhao S, Wang Y, Wang B, Wei M, et al. Microbial desulfurization of waste latex rubber with *Alicyclobacillus* sp *Polym Degrad Stab*, 98(9), 1724–1730, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.polymdegradstab.2013.06.002>

Yele VU, Desai K. A New Thermostable and Organic Solvent-Tolerant Lipase from *Staphylococcus warneri*; Optimization of Media and Production Conditions Using Statistical Methods *Appl Biochem Biotechnol*, 175(2), 855–869, 2014. <https://doi.org/10.1007/s12010-014-1331-2>

Yikmis M, Steinbüchel A. Historical and Recent Achievements in the Field of Microbial Degradation of Natural and Synthetic Rubber. *Appl Environ Microbiol*, 78(13), 4543–4551, 13 abr. 2012. American Society for Microbiology. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1128/aem.00001-12>. Acesso em: 21 maio 2020.

ANEXOS

Anexo 1: Sequencia do gene 16S rRNA do isolado DAF obtido após tratamento e alinhamento utilizando CodonCondon Align. Após depósito no banco de dados genético GenBank a sequencia pode ser encontrada pela identificação MZ827660.

NTAGAGTTTGATCCTGGCTCAGGATGAACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAGC
GAACAGATAAGGAGCTTGCTCCTTTGACGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGATA
ACCTACCTATAAGACTGGGATAACTTCGGGAAACCGGAGCTAATACCGGATAACATATTGA
ACCGCATGGTTCAATAGTGAAAGGCGGCTTTGCTGTCACTTATAGATGGATCCGCGCCGTAT
TAGCTAGTTGGTAAGGTAACGGCTTACCAAGGCAACGATACGTAGCCGACCTGAGAGGGTG
ATCGGCCACACTGGAAGTGAACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATC
TTCCGCAATGGGCGAAAGCCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTCTTCGGATC
GTAAACTCTGTTATCAGGGAAGAACAATGTGTAAGTAACTGTGCACATCTTGACGGTACC
TGATCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCG
TTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGTAGGCGGTTTTTTAAGTCTGATGTGAAAGCC
CACGGCTCAACCGTGGAGGGTCATTGGAAACTGGAAACTTGAGTGCAGAAGAGGAAAGTG
GAATTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGAGATATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGA
CTTTCTGGTCTGTAAGTACGCTGATGTGCGAAAGCGTGGGGATCAAACAGGATTAGATACC
CTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGGGGGTTTTCCGCCCTTAGTGCT
GCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGA
ATTGACGGGGACCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAAC
CTTACCAAATCTTGACATCCTTTGACCGCTCTAGAGATAGAGTTTTCCCTTCGGGGGACAA
AGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCA
ACGAGCGCAACCCCTTAAGCTTAGTTGCCATCATTAAAGTTGGGCACTCTAAGTTGACTGCCGG
TGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGATTGGGCTAC
ACACGTGCTACAATGGACAATAAAAGGGCAGCTAAACCGCGAGGTCAAAGCAAATCCCAT
AAAGTTGTTCTCAGTTCGGATTGTAGTCTGCAACTCGACTACATGAAGCTGGAATCGCTAGT
AATCGTAGATCAGCATGCTACGGTGAATACGTTCCCGGGTCTTGTACACACCGCCCGTCACA
CATGAGAGTTTGTAACACCCGGAGCCGGTGGAGTTACCATTTATGGAGCT

Anexo 2 - Sequencia da região ITS1-18S-ITS2 do isolado F1 obtido após tratamento e alinhamento utilizando. Após depósito no banco de dados genético GenBank a sequencia pode ser encontrada pelo número de identificação MZ836005.

TTACCGAGTTTACAACCTCCCAAACCCCTGTGAACATACCTATACGTTGCCTCGGCGGATCAG
CCCGCGCCCCGTAAAACGGGACGGCCCGCCGCAGGACCCACAAACCCTGAATTTTATTGTAA
CTTCTGAGTTTAAAAAACAAATAAATCAAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTCTG