



Universidade Federal do Rio de Janeiro
Escola Politécnica & Escola de Química
Programa de Engenharia Ambiental

Rosana Maria Juazeiro Caetano

SÍNTESE DE POLI (SUCCINATO DE BUTILENO) (PBS) PARA A
IMOBILIZAÇÃO DE UREIA NA BIODEGRADAÇÃO DE PETRÓLEO EM
SISTEMAS AQUÁTICOS ARTIFICIAIS

Dissertação

Rio de Janeiro

2018



UFRJ

Rosana Maria Juazeiro Caetano

SÍNTESE DE POLI (SUCCINATO DE BUTILENO) (PBS) PARA A
IMOBILIZAÇÃO DE UREIA NA BIODEGRADAÇÃO DE PETRÓLEO EM
SISTEMAS AQUÁTICOS ARTIFICIAIS

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Engenharia Ambiental, Escola Politécnica & Escola de Química, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Engenharia Ambiental.

Orientadora: Selma Gomes Ferreira Leite

Co-orientador: Fernando Gomes de Souza Junior

Rio de Janeiro

2018

Caetano, Rosana Maria Juazeiro.

Síntese de poli (succinato de butileno) (PBS) para a imobilização de ureia na biodegradação de petróleo em sistemas aquáticos artificiais / Rosana Maria Juazeiro Caetano. – 2018.

113 p.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola Politécnica e Escola de Química, Programa de Engenharia Ambiental, Rio de Janeiro, 2018

Orientadores: Selma Gomes Ferreira Leite e Fernando Gomes de Souza Jr.

1. Biodegradação. 2. Liberação controlada. 3. Ureia. 4. Poli (succinato de butileno). 5. Radiação gama. I. Leite, Selma Gomes Ferreira e Souza Jr., Fernando Gomes. II. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química e Instituto de Macromoléculas. III. Título



UFRJ

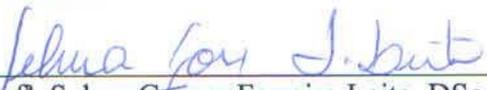
SÍNTESE DE POLI (SUCCINATO DE BUTILENO) (PBS) PARA
IMOBILIZAÇÃO DE UREIA NA BIODEGRADAÇÃO DE PETRÓLEO EM
SISTEMAS AQUÁTICOS ARTIFICIAIS

Rosana Maria Juazeiro Caetano

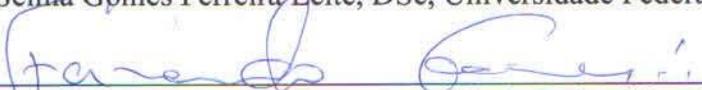
Selma Gomes Ferreira Leite e Fernando Gomes Sousa Jr.

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Engenharia Ambiental, Escola Politécnica & Escola de Química, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Engenharia Ambiental.

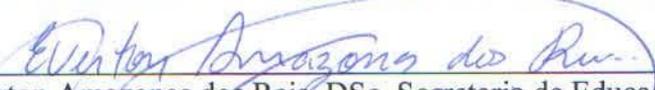
Aprovada pela Banca:



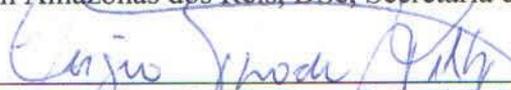
Presidente, Prof.^a Selma Gomes Ferreira Leite, DSc, Universidade Federal do Rio de Janeiro



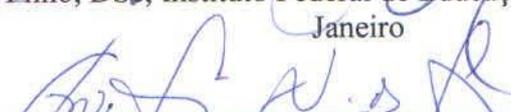
Prof. Fernando Gomes Souza Jr., DSc, Universidade Federal do Rio de Janeiro



Prof. Everton Amazonas dos Reis, DSc, Secretaria de Educação do Estado do Rio de Janeiro



Prof. Sergio Thode Filho, DSc, Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro



Prof.^a Ana Lúcia Nazareth da Silva, DSc, Universidade Federal do Rio de Janeiro

Rio de Janeiro
2018

Ao meu companheiro de vida, Fábio Caetano,
que trilhou incansavelmente ao meu lado
esses anos de intenso trabalho.

Agradecimentos

A Deus pelas possibilidades de imenso aprendizado nesta existência e por manter-me firme no caminho até aqui.

Ao Programa de Pós Graduação em Engenharia Ambiental da Universidade Federal do Rio de Janeiro – PEA/UFRJ), criado a partir da união entre a Escola Politécnica da UFRJ e do Programa de pós graduação em Tecnologia dos Processos Químicos e Bioquímicos da Escola de Química da UFRJ, pela oportunidade de qualificação profissional através do mestrado profissional na área de saneamento ambiental.

À professora Dra. Selma Gomes Ferreira Leite Professor (EQ/UFRJ) pela aceitação imediata da proposta apresentada assim como pelos ensinamentos precisos e condução atenciosa e cuidadosa durante a elaboração deste trabalho.

Ao professor Dr. Fernando Gomes de Sousa Jr. por guiar-me tão generosamente pela área da ciência dos polímeros, fazendo as contribuições e correções necessárias para a melhoria deste trabalho.

Ao professor Dr. Edgar Francisco Oliveira de Jesus do Laboratório de Instrumentação Nuclear COPPE/UFRJ pela contribuição fundamental no preparo e aplicação de radiação gama no material polimérico de estudo.

À engenheira química, Dra. Antonieta Middea do Setor de caracterização do Centro de Tecnologia Mineral – CETEM/RJ pelo preparo e análise dos materiais poliméricos por Microscopia Eletrônica de Varredura essenciais para a discussão deste trabalho.

A Me. Priscilla Bedor pelo companheirismo e participação essencial no trabalho, assim como à toda equipe de acadêmicos do Laboratório de Microbiologia Industrial/EQ/UFRJ pelas contribuições dispensadas.

Ao Dr. Evertom Amazonas dos Reis pelo encaminhamento inicial na proposta de imobilização de ativos para uso na biodegradação de petróleo, fazendo contribuições importantes para o fechamento do tema e do trabalho.

A Me. Fernanda D. Marques pela generosa contribuição em diversas etapas de aprendizado de técnicas e conceitos na área de ciência e caracterização de polímeros assim como à todos os acadêmicos do Laboratório de Biopolímeros e Sensores (LaBioS/IMA/UFRJ), que em vários momentos fizeram contribuições essenciais.

Aos Laboratórios de Apoio Instrumental/IMA/UFRJ, LAPIN 1 pelas análise de FTIR, LAPIN 2 pelas análise de DRX e LAPIN 3 pelas análise de GPC.

Ao professor Dr. Rui Cerqueira (IB/UFRJ) pelo apoio indispensável e autorização, como chefia imediata, para participação deste processo de qualificação e aprimoramento profissional assim como ao meu colega de trabalho Nélio de Barros que altruisticamente colaborou para que eu pudesse realizar esta pesquisa.

Aos meu queridos pais e irmãos e a todos os familiares, amigos e colegas que de alguma forma torceram pelo meu trabalho, incentivando-me a prosseguir na busca pelos meus objetivos.

“(...) Ela acreditava em anjo, e porque acreditava, eles existiam.”

Do livro Hora da Estrela de

Clarice Lispector

RESUMO

CAETANO, Rosana Maria Juazeiro. **Síntese de poli (succinato de butileno) (PBS) para a imobilização de ureia na biodegradação de petróleo em sistemas aquáticos artificiais.** Rio de Janeiro, 2018. Dissertação (Mestrado) – Programa de Engenharia Ambiental, Escola Politécnica e Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2018.

Atividades petrolíferas oferecem riscos de acidentes e os danos socioambientais decorrentes de vazamentos podem ser bastante significativos. Desta forma, pesquisas sobre alternativas de remediação são cada vez mais necessárias, merecendo destaque as baseadas em processos biológicos que são mais seguros e baratos em comparação aos físico-químicos. Uma das técnicas de remediação biológica é o bioestímulo, que consiste na adição de nutrientes ao local contaminado para acelerar o processo de degradação microbiológica. Entretanto, a superdisponibilidade de nutrientes pode gerar efeito inibitório, eutrofização da área afetada e custos relacionados às perdas para o ambiente e como forma de controlar a liberação dos nutrientes durante a biorremediação, estão sendo pesquisadas formas de imobilização desses ativos em diversos polímeros. A proposta deste trabalho foi o uso de ureia imobilizada em polímero biodegradável denominado poli (succinato de butileno) (PBS) na bioestimulação de *Pseudomonas aeruginosa* para biodegradação de hidrocarbonetos de petróleo. Os compósitos PBS-Ureia 10% p/p foram obtidos por fusão a 110°C com posterior aplicação de radiação gama nas doses de 15, 25, 50 e 75 kGy para promover reticulação da cadeia polimérica. As caracterizações físico-químicas indicaram diminuição da cristalinidade após fusão dos materiais, implicando na redução da estabilidade térmica dos compósitos. O aumento da dose de radiação gama promoveu reticulação da cadeia polimérica melhorando a imobilização e retardando a liberação imediata de ureia no intervalo máximo de 24 horas. O desenvolvimento bacteriano foi satisfatório em sistemas contendo compósitos PBS-Ureia 10% p/p irradiados, cujas razões podem estar associadas à liberação gradual de ureia ou uso dos compósitos como superfícies favoráveis de crescimento. No intervalo de análise proposto para avaliar a biodegradação de óleo combustível observou-se discretas reduções de hidrocarbonetos nos sistemas, embora tenha havido crescimento bacteriano e consumo de ureia, indicando que os compósitos PBS-Ureia 10% p/p obtidas por fusão e irradiação gama fornecem condições favoráveis para aplicação em ambientes naturais.

Palavras-chave: biodegradação, liberação controlada, ureia, poli (succinato de butileno), radiação gama.

ABSTRACT

CAETANO, Rosana Maria Juazeiro. **Synthesis of poly (butylene succinate) (PBS) for the immobilization of urea in the biodegradation of petroleum in artificial aquatic systems.** Rio de Janeiro, 2018. Dissertação (Mestrado) – Programa de Engenharia Ambiental, Escola Politécnica e Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2018.

Oil activities offer risks of accidents and the social and environmental damages resulting from leaks can be quite significant. Thus, research on alternative remediation is increasingly necessary, with emphasis on those based on biological processes that are safer and cheaper compared to physico-chemicals. One of the biological remediation techniques is biostimulation, which consists of adding nutrients to the contaminated site to accelerate the microbiological degradation process. However, nutrient over-availability can generate an inhibitory effect, eutrophication of the affected area and costs related to losses to the environment and as a way to control the release of nutrients during bioremediation, ways of immobilizing these nutrients in several polymers have been researched. The purpose of this work was the use of immobilized urea in a biodegradable polymer called poly (butylene succinate) (PBS) in the biostimulation of *Pseudomonas aeruginosa* for the biodegradation of petroleum hydrocarbons. PBS-Urea 10% w/w composites were obtained by melting at 110°C with subsequent application of gamma radiation at the rates of 15, 25, 50 and 75 kGy to promote crosslinking of the polymer chain. The physico-chemical characterization indicated decreased crystallinity after melting of the materials, implying the reduction of the thermal stability of the composites. Increasing the dose of gamma radiation promoted polymer chain crosslinking by enhancing immobilization and delaying the immediate release of urea within the maximum range of 24 hours. Bacterial development was satisfactory in systems containing PBS-Urea 10% w/w irradiated composites, whose results may be associated with the gradual release of urea or use of the composites as favorable growth surfaces. In the proposed analysis interval to evaluate the fuel oil biodegradation, there were discrete hydrocarbon reductions in the systems, although there was bacterial growth and urea consumption, indicating that the PBS-Urea 10% w/w composites obtained by melting and gamma irradiation provide favorable conditions for application in natural environments.

Keywords: biodegradation, controlled release, urea, poly (butylene succinate), gamma irradiation.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Resumo da composição do petróleo e sua classificação (BARCZA, 2017).....	20
Figura 2 - Diminuição do número de acidentes com petroleiros versus aumento do volume transportado. Fonte: “Oil Tanker Spill Statistics 2016”, 2017	24
Figura 3 - Técnicas de remediação de petróleo em ambientes marinhos: (a) dispersante químico, (b) queima controlada in situ, (c) limpeza mecânica, (d) jateamento com água pressurizada.....	27
Figura 4 - Levantamento bibliográfico sobre o número de trabalhos que tratam de remediação em geral e de biorremediação de vazamentos de petróleo. Fonte: Periódicos Capes. Acesso: Set/2017.	28
Figura 5 - Exemplos de hidrocarbonetos do petróleo.....	30
Figura 6- Esquema das rotas aeróbia e anaeróbia da degradação microbiana de hidrocarbonetos do petróleo, mostrando os diferentes aceptores finais de elétrons em cada via metabólica. Adaptado de (VARJANI, 2017).	32
Figura 7 - Exemplar de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> em micrografia eletrônica de transmissão. Célula com aproximadamente 1 µm de diâmetro. Fonte: (MADIGAN, 2015).	37
Figura 8 - Biofilme de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> . Fonte: http://www.imperial.ac.uk/mrc-centre-for-molecular-bacteriology-and-infection/research/research-groups/professor-alain-filloux/ . Acesso em 17/01/2018.....	37
Figura 9 - Esquema dos tipos de interações químicas entre a matriz de revestimento e a substância ativa. Adaptado de ROUXINOL (2009).	41
Figura 10 - Morfologia das micropartículas. Fonte: SILVA et al. (2003).	41
Figura 11 - Esquema da imobilização por oclusão. Adaptado de HOLOWKA; BHATIA (2014).	41
Figura 12 - Fluxograma de obtenção de PBS. Adaptado de XU; GUO (2010).	43
Figura 13 - Esquema da síntese de PBS. Adaptado de GIGLI et al. (2016); WANG; GUO; LI, (2012).	44
Figura 14 - Esquema dos efeitos da radiação gama sobre a cadeia polimérica. Fonte: COSTA (2017).	46
Figura 15 - Montagem do sistema para síntese de PBS em LaBioS. Fonte: (SANTOS, 2014).	49
Figura 16 - Esquema ilustrativo da irradiação gama sobre os materiais poliméricos.	50
Figura 17 - Esquema ilustrativo do protocolo de análise da cinética de liberação de ureia.	55
Figura 18 - Sistemas com ureia livre e ureia imobilizada do ensaio de crescimento bacteriano.	57
Figura 19 - Demonstração do ensaio de biodegradação de óleo combustível: à esquerda os sistemas aquáticos artificiais preparados e à direita os sistemas prontos para agitação.	60
Figura 20 - À esquerda: Extração de óleo do ensaio de biodegradação. À direita: Aparelho de infravermelho para quantificação de hidrocarbonetos	61
Figura 21 - Morfologia superficial do PBS sintetizado antes da fusão.	63
Figura 22 – Amostras sólidas maceradas a pó de PBS puro após fusão (a) a 110°C e (b) a 140°C, com visualização de fragmentos do material polimérico sobre a superfície da matriz.	64

Figura 23 - Microscopia dos compósitos PBS-Ureia 10% p/p obtidas por fusão (a) 110°C e (b) 140°C.	65
Figura 24 - Microscopia dos compósitos PBS/Ureia 10% p/p após ensaio de liberação de ureia. (a) Compósitos obtidos após fusão a 110°C e (b) após fusão a 140°C.	65
Figura 25 - Espectro de infravermelho do PBS puro.	67
Figura 26 - Espectro por infravermelho da Ureia.....	68
Figura 27 - Espectros comparativos do PBS antes da fusão, após fusão a 110°C e irradiado.....	68
Figura 28 - Espectros por infravermelho do PBS, Ureia e compósitos PBS-Ureia 10% p/p.	70
Figura 29 - Análise comparativa das transmitâncias entre PBS puro após fusão e compósitos PBS-Ureia 10% p/p.	71
Figura 30 - Difratoograma do PBS puro.	73
Figura 31 - Difratoograma da ureia.....	74
Figura 32 - Difratoogramas do PBS sob diferentes condições.....	74
Figura 33 – Difratoogramas normalizados da ureia, PBS puro pós-fusão e compósitos PBS-Ureia 10% p/p.....	75
Figura 34 - Termogramas do PBS em diferentes condições.	77
Figura 35 - Derivadas da análise termogravimétrica do PBS em diferentes condições.	78
Figura 36 - Termogramas dos compósitos PBS-Ureia 10% p/p e de seus componentes sob diferentes condições.....	79
Figura 37 - Derivadas da análise termogravimétrica dos compósitos PBS-Ureia 10% p/p e de seus componentes.....	80
Figura 38 - Perfil de liberação de ureia das matrizes poliméricas obtidas por fusão a 110 e 140°C.	85
Figura 39 - Perfil de liberação de ureia das matrizes poliméricas obtidas por fusão a 110°C e submetidas à diferentes doses de radiação gama.....	86
Figura 40 - Crescimento médio bacteriano com ureia livre como fonte de nitrogênio.	89
Figura 41 – Crescimento médio bacteriano e consumo médio de glicose em sistemas com ureia imobilizada.	91
Figura 42 - Quantificação de ureia remanescente em solução durante ensaio de bioestímulo.	94
Figura 43 – Valor médio de hidrocarbonetos totais nos sistemas aquáticos artificiais propostos para avaliar a biodegradação de óleo.	97
Figura 44 - Consumo médio de ureia nos sistemas propostos para biodegradação de óleo.....	99
Figura 45 – Média do crescimento bacteriano nos sistemas propostos para de biodegradação.	100

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Os maiores vazamentos de petróleo da história em ordem cronológica.	23
Tabela 2 - Propriedades físico-químicas e toxicológicas de alguns hidrocarbonetos do petróleo. Adaptado de FUENTES et al., (2014).	31
Tabela 3 - Microrganismos degradadores de hidrocarbonetos de petróleo. Adaptado de :VARJANI, (2017).	36
Tabela 4 - Composição dos meios minerais.	54
Tabela 5 - Protocolo simplificado do ensaio de biodegradação de hidrocarbonetos.	60
Tabela 6 - Resultados da análise de GPC para o polímero PBS.	62
Tabela 7 - Correlação entre PBS sem processamento e PBS fundido e irradiado.	69
Tabela 8 - Correlação entre PBS puro e compósitos PBS-Ureia 10% p/p após fusão a 110°C.	72
Tabela 9 - Cristalinidade por DRX das amostras de PBS.	76
Tabela 10 - Cristalinidade por DRX das matrizes poliméricas PBS-Ureia 10% p/p.	76
Tabela 11 - Propriedades térmicas por TGA do PBS em diferentes condições.	78
Tabela 12 - Propriedades térmicas por TGA da ureia, PBS após fusão e compósitos PBS-Ureia 10% p/p.	80
Tabela 13 - Propriedades térmicas por DSC da ureia, PBS e materiais poliméricos sob diferentes condições.	81
Tabela 14 - Resultados de correlação entre respostas das caracterizações e os parâmetros de obtenção dos materiais poliméricos. Destaque para as correlações com significância estatística (valor-p < 0,05).	83
Tabela 15 – Dados de correlação e constantes da função exponencial aplicada ao teste de liberação de ureia.	88
Tabela 16 - Resultados da análise de variância para os sistemas controle (Ureia livre).	90
Tabela 17 - Resultados do teste de Tukey para os sistemas controle (Ureia livre).	90
Tabela 18 - Velocidade específica de crescimento (μ_m) e tempo de geração (t_g) para <i>Pseudomonas aeruginosa</i> em sistemas com ureia livre e ureia imobilizada.	93
Tabela 19 - Dados de entrada para matriz de correlação dos resultados de bioestimulação versus doses de radiação.	95
Tabela 20 - Matriz de correlação dos efeitos da dose de radiação sobre as variáveis representativas dos resultados de bioestimulação com matrizes poliméricas.	96

LISTA DE ABREVIACÕES E SÍMBOLOS

DRX – Difro de raios X

DSC – Calorimetria Diferencial de Varredura

FTIR/ATR – Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier e Reflexão Total Atenuada

GPC – Cromatografia de Permeao em Gel

HC – Hidrocarbonetos

HPAs – Hidrocarbonetos Poli Aromáticos

kGy – quilo Gray

mg.L⁻¹ – miligrama por litro

mL – mililitro

µg. L⁻¹ – micrograma por litro

Mn – Massa molar numérica

p/p – proporção peso por peso

p/v – proporção peso por volume

PBS – poli (succinato de butileno)

RMSE – raiz do erro médio quadrático

rpm – rotação por minuto

SEM – Microscopia Eletrônica de Varredura

TGA – Análise Trmogravimtrica

T_m – temperatura de fusão

TPH – Hidrocarbonetos Totais de Petróleo

X_c – cristalinidade

θ - theta

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
2. JUSTIFICATIVA	19
3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	20
3.1. PETRÓLEO	20
3.1.1. IMPACTOS AMBIENTAIS DE VAZAMENTOS	22
3.1.2. REMEDIAÇÃO DE AMBIENTES MARINHOS IMPACTADOS POR VAZAMENTO DE PETRÓLEO	26
3.2. BIODEGRADAÇÃO/BIORREMEDIAÇÃO	29
3.2.1. PETRÓLEO COMO FONTE DE CARBONO	30
3.2.2. MECANISMOS DE BIODEGRADAÇÃO DE HIDROCARBONETOS DE PETRÓLEO	32
3.2.3. BIORREMEDIAÇÃO DE PETRÓLEO	34
3.3. SUPLEMENTAÇÃO DE NUTRIENTES EM AMBIENTES MARINHOS	38
3.4. LIBERAÇÃO CONTROLADA DE SUBSTÂNCIAS ATIVAS	39
3.5. POLÍMEROS BIODEGRADÁVEIS COMO MATRIZES DE REVESTIMENTO	42
3.5.1. POLI (SUCCINATO DE BUTILENO)	43
3.6. APLICAÇÃO DE RADIAÇÃO IONIZANTE EM SISTEMAS POLIMÉRICOS	45
4. OBJETIVO GERAL	47
4.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	47
5. MATERIAIS E MÉTODOS	48
5.1. SÍNTESE DO POLI (SUCCINATO DE BUTILENO) - PBS	48
5.2. OBTENÇÃO DOS COMPÓSITOS PBS-UREIA 10% P/P	49
5.3. IRRADIAÇÃO DOS MATERIAIS POLIMÉRICOS	50
5.4. CARACTERIZAÇÕES FÍSICO-QUÍMICAS	51
5.4.1. CROMATOGRAFIA DE PERMEAÇÃO EM GEL	51
5.4.2. ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER	51
5.4.3. MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA	51
5.4.4. DIFRAÇÃO DE RAIOS X	52
5.4.5. ANÁLISE TERMOTERMOMÉTRICA E CALORIMETRIA DIFERENCIAL DE VARREDURA	52
5.5. ESTUDO DA CINÉTICA DE LIBERAÇÃO DE UREIA	53
5.5.4. DETERMINAÇÃO ANALÍTICA DE UREIA	55
5.6. ENSAIO DE CRESCIMENTO BACTERIANO (BIOESTIMULAÇÃO)	56
5.6.4. DETERMINAÇÃO ANALÍTICA DE UREIA	58
5.6.5. DETERMINAÇÃO ANALÍTICA DE GLICOSE	58
5.6.6. DETERMINAÇÃO ANALÍTICA DE PROTEÍNAS PELO MÉTODO DE LOWRY	58
5.7. ENSAIO DE BIODEGRADAÇÃO DE HIDROCARBONETOS DE PETRÓLEO	59
5.7.3. DETERMINAÇÃO ANALÍTICA DE HIDROCARBONETOS TOTAIS DO PETRÓLEO (TPH)	60

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO	62
6.1. TAMANHO DA CADEIA POLIMÉRICA E POLIDISPERSÃO	62
6.1.1. POLI (SUCCINATO DE BUTILENO) - PBS	62
6.2. MORFOLOGIA SUPERFICIAL DOS MATERIAIS POLIMÉRICOS	63
6.2.1. POLI(SUCCINATO DE BUTILENO) –PBS	63
6.2.2. COMPÓSITOS PBS-UREIA 10% P/P	64
6.3. ESTRUTURA QUÍMICA POR ANÁLISE DE FTIR	66
6.3.1. POLI (SUCCINATO DE BUTILENO) - PBS	67
6.3.2. UREIA	67
6.3.3. PBS PURO APÓS FUSÃO E IRRADIAÇÃO GAMA	68
6.3.4. COMPÓSITOS PBS-UREIA 10% P/P	70
6.3.5. ANÁLISE DE ERRO MÉDIO QUADRÁTICO DOS COMPÓSITOS PBS-UREIA 10% P/P	71
6.4. ESTUDO DA ESTRUTURA CRISTALINA POR DRX	72
6.4.1. POLI (SUCCINATO DE BUTILENO) (PBS)	73
6.4.2. UREIA	73
6.4.3. PBS PURO APÓS FUSÃO/IRRADIAÇÃO	74
6.4.4. COMPÓSITOS PBS-UREIA 10% P/P	75
6.4.5. ANÁLISE DA CRISTALINIDADE (XC)	75
6.5. PROPRIEDADES TÉRMICAS DOS MATERIAIS POLIMÉRICOS E DA UREIA	77
6.5.1. ANÁLISE TERMOGRAVIMÉTRICA (TGA)	77
6.5.2. CALORIMETRIA DIFERENCIAL DE VARREDURA (DSC)	81
6.6. ANÁLISE DE CORRELAÇÃO	82
6.7. CINÉTICA DE LIBERAÇÃO DE UREIA	84
6.7.1. COMPÓSITOS PBS-UREIA 10% P/P – PRIMEIRA ETAPA: FUSÃO	84
6.7.2. COMPÓSITOS PBS-UREIA 10% P/P – SEGUNDA ETAPA: IRRADIAÇÃO	86
6.8. ENSAIOS DE BIOESTÍMULO	88
6.8.1 CRESCIMENTO BACTERIANO EM SISTEMAS COM UREIA LIVRE	89
6.8.2. CRESCIMENTO BACTERIANO EM SISTEMAS COM UREIA IMOBILIZADA EM PBS	90
6.8.3. QUANTIFICAÇÃO DE UREIA REMANESCENTE EM SOLUÇÃO	94
6.9. ENSAIOS DE BIODEGRADAÇÃO	96
6.9.1. AVALIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE HIDROCARBONETOS: TOTAIS DE PETRÓLEO	96
6.9.2. AVALIAÇÃO DE UREIA REMANESCENTE EM SOLUÇÃO	99
6.9.3. CRESCIMENTO BACTERIANO	100
7. CONCLUSÕES	102
8. SUGESTÕES FUTURAS	104
9. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA	105

1. INTRODUÇÃO

O petróleo é uma complexa mistura de compostos de ocorrência natural com predomínio de hidrocarbonetos que podem apresentar-se na forma de moléculas alifáticas (cíclicos e acíclicos) e aromáticas e, em menor quantidade, de derivados orgânicos sulfurados, nitrogenados, oxigenados e organo-metálicos (ZÍLIO; PINTO, 2002). É reconhecidamente o maior recurso natural não renovável que a maioria dos países utiliza como matriz energética, além da produção de derivados e de produtos petroquímicos.

Grande parte dos componentes do petróleo, entre 60% a 90%, são biodegradáveis, já que muitas espécies microbianas adquiriram a capacidade de utilizar esses compostos como substrato de crescimento (TONINI; REZENDE; GRATIVOL, 2010). Entretanto, a biodegradação do petróleo pode ser limitada pela falta de microrganismos degradadores naturais, pela presença de condições desfavoráveis a esses microrganismos ou pela baixa disponibilidade dos contaminantes à biota degradadora (JACQUES *et al.*, 2007).

Diante dos riscos inerentes das atividades petrolíferas com possíveis efeitos indesejáveis sobre os ecossistemas atingidos e sobre as atividades socioeconômicas, assim como os elevados custos operacionais de controle e correção de vazamentos (MONTEIRO, 2003), pesquisas com novas alternativas de remediação estão sendo desenvolvidas, em particular aquelas que utilizam processos biológicos, considerados mais seguros, mais eficientes e com custos mais reduzidos quando comparados aos físico-químicos (VARJANI, 2017).

A remediação biológica ou biorremediação pode ser entendida como um processo que utiliza de forma tecnológica organismos vivos tais como microrganismos ou plantas, para remover ou reduzir poluentes do meio ambiente (GAYLARD; BELLINASSO; MANFIO, 2005). Esse tipo de tecnologia tem tido aceitação e interesse nas pesquisas por tratar-se de um tratamento com menos restrições ambientais e por utilizar, na maioria das vezes, processos naturais locais (REIS, 2015).

Os microrganismos degradadores de hidrocarbonetos do petróleo estão distribuídos ubiquamente nos ecossistemas terrestres e aquáticos, embora haja limitações para a biodegradação devido à falta de nutrientes ou à baixa biodisponibilidade de determinadas frações do contaminante (JACQUES *et al.*, 2007; VARJANI, 2017; YAKIMOV *et al.*, 1998).

Estudos têm demonstrado que as comunidades microbianas são compostas por bactérias degradadores de petróleo (GERTLER *et al.*, 2012) cujo crescimento é influenciado

significativamente pela adição de nitrogênio e fósforo (HASSANSHAHIAN *et al.*, 2014). O estabelecimento de condições favoráveis ao desenvolvimento dos microrganismos é essencial à eficiência da biodegradação e uma das técnicas mais utilizadas na biorremediação é o bioestímulo que compreende a incorporação de agentes estimulantes no sistema impactado para aceleração do processo metabólico (AULENTA *et al.*, 2005).

Prevedo a liberação controlada dos nutrientes na biorremediação de áreas contaminadas, tem-se utilizado diferentes formas de imobilização de agentes ativos (REIS, 2015; VENOSA; ZHU, 2003). A imobilização parte do princípio da retenção ou recobrimento de substâncias ativas por um material de revestimento por meio de técnicas diversas que deverão ser escolhidas de acordo com o objetivo final que se queira alcançar, por exemplo, proteção e conservação de substâncias, melhoria das propriedades organolépticas, redução de ações adversas e de interações com outras substâncias, liberação gradual, diminuição da toxicidade, etc (BRASILEIRO, 2011; ALVIM, 2005). As técnicas de imobilização têm sido extensivamente estudadas e utilizadas em diversas áreas científicas e industriais, buscando otimizar a ação de substâncias bioativas assim como a descoberta por novos materiais de revestimento como os polímeros biodegradáveis (LA MANTIA *et al.*, 2018; LIU; PAN; FENG, 2010; PHUA; CHOW; MOHD ISHAK, 2011).

Os polímeros biodegradáveis sintéticos ou naturais são úteis para a imobilização de diversas substâncias, visto que exercem adequada função de material de revestimento devido a sua capacidade de fácil manipulação durante o processo; habilidade de selar e reter o material ativo dentro da estrutura; são atóxicos e biodisponíveis, possuem baixo custo de aquisição, etc (SILVA *et al.*, 2003; SUAVE *et al.*, 2006). Dentre os polímeros biodegradáveis, destaca-se o poli(succinato de butileno), PBS, que pode ser obtido de fontes petroquímicas ou por uma rota totalmente renovável a partir de bio-intemediários químicos, mais especificamente o ácido succínico e o 1,4-butanodiol, produzidos na fermentação de carboidratos, como sacarose, glucose, maltose e frutose (XU; GUO, 2010). O PBS possui boa processabilidade, biodegradabilidade, baixo valor de produção e sua degradação pela ação microbiana gera como produtos finais CO₂ e H₂O (KIM *et al.*, 2015; FERREIRA *et al.*, 2014; JACQUEL *et al.*, 2011).

Embora o PBS apresente boas propriedades para aplicação como material de revestimento em sistemas de liberação controlada, sua estrutura altamente linear implica em baixa resistência à fusão e baixa viscosidade (WANG; GUO; LI, 2012), assim como baixa propriedade de barreira a gases, entre outras, limitando algumas aplicações finais desse biopolímero (SINHA RAY; OKAMOTO; OKAMOTO, 2003). Dessa forma, estratégias de

melhoria das propriedades termo-mecânicas do PBS e de outros polímeros similares estão sendo usadas, tais como a reticulação entre as cadeias poliméricas, promovida por irradiação eletromagnética (KIM *et al.*, 2015).

A irradiação é usada originalmente como técnica de esterilização para dispositivos médicos termolábeis, mas seus efeitos sobre os polímeros biodegradáveis variam desde a cisão das cadeias até ligação cruzada ou reticulação, muitas vezes ambos os efeitos ocorrendo simultaneamente. No caso da aplicação de radiação gama sobre sistemas poliméricos microparticulados podem ocorrer modificação na morfologia dos materiais, aumento da massa molar e alteração do perfil de liberação de ativos imobilizados (COSTA, 2017).

Este trabalho estudou a aplicação de compósitos de PBS-Ureia 10% obtidos por fusão e irradiação gama na bioestimulação de microrganismos degradadores de petróleo em processo de biodegradação de hidrocarbonetos de petróleo em sistemas aquáticos artificiais.

2. JUSTIFICATIVA

A sociedade contemporânea ainda é bastante dependente do petróleo. Gasolina, gás natural e produtos petroquímicos, usados na fabricação de plásticos, medicamentos, fertilizantes, etc., são alguns exemplos de utilização desse recurso fóssil não-renovável.

Os riscos de danos ambientais são inerentes à atividade petrolífera e por isso há constante preocupação da sociedade em geral com os derramamentos de óleo, principalmente em regiões costeiras (PALADINO, 2000). Vários são os esforços por novas tecnologias de produção e redução de riscos. O “Relatório de Tecnologia Petrobras 2014”, (2015) apresenta resultados de tecnologias para otimização de processos produtivos com ênfase em automação, manutenção de instalações e segurança, além de tecnologias de identificação e recuperação de ambientes degradados. Entretanto, qualquer atividade antropogênica que possa introduzir contaminantes no meio ambiente, oferece riscos à natureza e à saúde humana e como o petróleo ainda é o mais importante recurso energético, torna-se necessário a busca constante por tecnologias de recuperação de áreas impactadas por vazamentos de óleo.

Os custos elevados das descontaminações físico-químicas, os riscos associados a esses tratamentos e a lenta degradação por processos naturais têm impulsionado pesquisas por tecnologias ambientalmente aceitáveis como a biorremediação, que baseia-se na existência de microrganismos degradadores possivelmente presentes no solo e em sistemas aquáticos.

No contexto da aplicação de alternativas biotecnológicas de remediação assim como no uso de sistemas de liberação lenta de nutrientes, que se torna essencial no controle e na eficiência da biorremediação, os polímeros biodegradáveis usados como materiais de revestimento, como exemplo o PBS, têm tido destaque por possuírem características aplicáveis ao que se propõem, tais como facilidade de processamento e biodegradabilidade, além de formarem subprodutos atóxicos e apresentar baixo custo de obtenção (PHUA; CHOW; MOHD ISHAK, 2011; NIKOLIC; DJONLAGIC, 2001; SONG; SUNG, 1995).

A aplicação de radiação eletromagnética em polímeros biodegradáveis para melhorar suas propriedades termo-mecânicas assim como aumentar a imobilização de ativos em sistemas de liberação lenta, apresenta-se como uma alternativa viável economicamente. Considerando dados disponíveis sobre unidades industriais para a irradiação de alimentos, a operação dessas unidades é simples, como pouca manutenção, flexibilidade de produção e boa produtividade anual (40.000 toneladas) (WIELAND; LUSTOSA; MACEDO-SOARES, 2010).

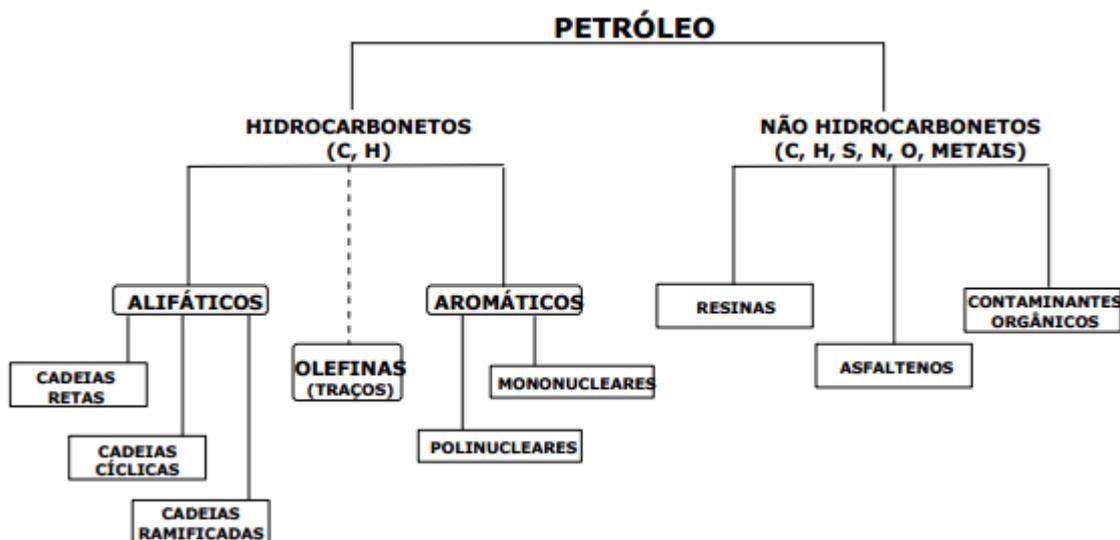
3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1. Petróleo

O petróleo é um material fóssil, oleoso e inflamável, de alto valor energético, geralmente menos denso do que a água, com cheiro característico e coloração que pode variar do incolor até o preto. Extraído em terra (*onshore*) ou abaixo do assoalho do mar (*offshore*), a prospecção e futura exploração comercial do petróleo demandam anos de preparação e grandes investimentos, que são progressivamente mais altos conforme a localização e a forma como os reservatórios se apresentam¹.

O petróleo (conhecido também como óleo bruto ou óleo cru) é formado predominantemente de hidrocarbonetos, que variam de 60 a 90% da sua composição, e de derivados sulfurados (sulfetos, dissulfetos, benzotiofenos, mercaptanas), nitrogenados (piridina e pirrol), oxigenados (ácidos naftênicos) e organo-metálicos (ferro, zinco, cobre, chumbo, molibdênio, cobalto, arsênio, manganês, cromo, sódio, níquel e vanádio) conforme mostrado na Figura 1. Impurezas inorgânicas como água, sais, argila, areia e sedimentos também estão presentes (BARCZA, 2017; ZÍLIO; PINTO, 2002).

Figura 1 - Resumo da composição do petróleo e sua classificação (BARCZA, 2017).



Os hidrocarbonetos do petróleo podem ser divididos em saturados de cadeia normal ou ramificada (parafínicos) e os de cadeia cíclicas (naftênicos) e os hidrocarbonetos aromáticos, com moléculas aromáticas puras ou associadas à hidrocarbonetos saturados cíclicos ou

¹<http://www.anp.gov.br/wwwanp/petroleo-e-derivados2>

compostos cíclicos de enxofre. A fração sem hidrocarbonetos é composta de resinas e asfaltenos, que são moléculas policíclicas de alto peso molecular contendo nitrogênio, enxofre e oxigênio (ver Figura 1) (ZÍLIO; PINTO, 2002).

De acordo com diversos autores, a formação de petróleo acontece a partir do acúmulo de sedimentos ricos em matéria orgânica que sofrem transformações químicas e bioquímicas sob condições específicas de temperatura e pressão. Essas reações costumam acontecer em sítios catalíticos das superfícies de rochas na presença de compostos inorgânicos e água. Devido às condições tão peculiares que variam de região para região, os óleos apresentarão características físicas e químicas distintas. Sendo assim, existem algumas formas de classificar os óleos das diversas reservas no mundo (BARCZA, 2017):

- (i) Quanto a faixa de temperatura de ebulição, Ponto de Ebulição Verdadeiro (PEV), que separa o petróleo em frações de acordo com os tipos de hidrocarbonetos presentes;
- (ii) Quanto ao grau de densidade API, do *American Petroleum Institute*, que usa como referência a água, ou seja, quanto maior °API, mais leve é o composto;
- (iii) Quanto ao teor de enxofre (S), que classifica o óleo com alto teor de S (>1%), com baixo teor de S (<1%), em azedo (>2,5%) ou doce (<0,5%);
- (iv) Quanto a razão dos componentes químicos presentes no óleo que os diferencia entre óleos parafínicos, naftênicos e aromáticos;
- (v) Quanto às grandezas Índice de Acidez Naftênica (TAN), Teor de sal, Ponto de fluidez e Teor de cinzas.

Até a descoberta das reservas do Pré-sal na plataforma continental brasileira, entre 2005 e 2012, a maior parte dos reservatórios no Brasil eram de óleos pesados de baixo grau API (<20°), alta viscosidade e elevada acidez total (FORTUNY *et al.*, 2008). Com a descoberta de reservatórios nas Bacias de Campos e Santos, comprovou-se a existência de petróleo de boa qualidade quanto à densidade, com 28° – 30° API (MORAIS, 2013).

O petróleo é uma importante matéria-prima petroquímica, entretanto seu grande valor na economia mundial é como fonte de energia. A partir do século XX, a indústria de petróleo tornou-se o principal fornecedor de energia, principalmente com o advento do automóvel (ATWATER; RIVA, 2011). Sendo assim, os derivados de petróleo são usados tanto como combustíveis quanto como matérias-primas nos processos industriais para a produção de fertilizantes, plásticos, fibras químicas, tintas, corantes, elastômeros, adesivos, solventes, tensoativos, gases industriais, detergentes, inseticidas, fungicidas, herbicidas, bernicidas, pesticidas, explosivos, produtos farmacêuticos, entre outros.

3.1.1. Impactos ambientais de vazamentos

A contaminação² por óleo, principalmente em ambientes marinhos, é proveniente de fontes naturais ou de origem antropogênica, podendo ser dividida nas seguintes categorias (MONTEIRO, 2003):

- Fontes naturais – exsudações ou afloramentos submarinos causados por processos geotectônicos ou desgastes de rochas sedimentares por lixiviação (rios e correntes subaquáticas);
- Poluição atmosférica – lançamento de SO₂ (dióxido de enxofre), NO_x (óxidos de nitrogênio) e outros gases das refinarias; hidrocarbonetos provenientes da combustão incompleta de combustíveis fósseis; vazamentos de válvulas, juntas de bombas e máquinas, etc.;
- Operações com petroleiros – incidentes (colisões, explosões) durante o transporte de petróleo resultando em derramamento do óleo e ações rotineiras nos terminais que incluem carga, descarga e limpeza de porões e máquinas dos navios;
- Produção *offshore* – lançamento de resíduos durante as operações de perfuração e exploração de petróleo, assim como lavagem das plataformas pelas águas das chuvas, acidentes e explosões;
- Despejos industriais e urbanos – resíduos industriais e de postos de gasolina; resíduos agrícolas como pesticidas e fertilizantes e resíduos domésticos.

Acidentes com vazamento de petróleo são classificados como de pequeno porte (<7 toneladas ou 50 barris), médio porte (7-700 toneladas ou 50-5000 barris) ou grande porte (>700 toneladas ou 5000 barris). Até 2010, registros de mais de 80 acidentes de média e alta gravidade espalharam cerca de 7,4 milhões de litros de petróleo nos mares e oceanos ao redor do mundo, sendo 10 responsáveis por 68% do total de óleo derramado. Mas, de acordo com a *International Tanker Owners Pollution Federation (ITOPF)*, vários destes acidentes causaram pouco ou nenhum dano ambiental já que ocorrem distante da costa (“Oil Tanker Spill Statistics 2016”, 2017; BARBOSA, 2010).

A Tabela 1 mostra um resumo dos maiores acidentes com vazamentos de petróleo pelo mundo e no Brasil, em termos de volumes perdidos, incluindo aqueles provocados por ações de guerra como o do Golfo Pérsico, que não foi propriamente um acidente, visto que as

²Contaminação de um ambiente é quando a concentração de alguma substância encontra-se acima dos níveis naturais (ALLOWAY, 1995).

válvulas dos poços e oleodutos foram abertas propositadamente pelas forças iraquianas ao se retirarem do local no final do ataque. Já no acidente terrestre ocorrido no Uzbequistão, uma região altamente povoada e agrícola foi atingida pelo óleo após a explosão do poço Fergana Valley (BARBOSA, 2010).

Tabela 1- Os maiores vazamentos de petróleo da história em ordem cronológica.

SISTEMA DE ARMAZENAMENTO OU TRANSPORTE	LOCAL	DATA	QUANTIDADE (toneladas)
PETROLEIRO AMOCO CADIZ	Bretanha – França	Março/1978	223.000
PETROLEIRO IXTOC I	Campeche – Golfo do México	Junho/1979	454.000
PETROLEIRO ATLANTICA EMPRESS	Tobago – Caribe	Julho/1979	287.000
PETROLEIRO NOWRUZ	Irã – Golfo Pérsico	Fevereiro/1983	260.000
PETROLEIRO CASTILLO DE BELLVER	Cidade do Cabo – África do Sul	Agosto/1983	252.000
PETROLEIRO ODYSSEY	Nova Escócia – Canadá	Novembro/1988	132.000
POÇOS E OLEODUTOS (Durante a Guerra do Golfo)	Kuwait – Golfo Pérsico	Janeiro/1991	1.360.000
PETROLEIRO HAVEN	Gênova – Itália	Abril/1991	144.000
PETROLEIRO ABT SUMMER	Costa da Angola	Mai/1991	260.000
POÇO FERGANA VALLEY	Uzbequistão	Março/1992	285.000
PLATAFORMA DEEPWATER HORIZON	Golfo do México – EUA	Abril/2010	669.500
BRASIL			
OLEODUTOS DA REFINARIA DUQUE DE CAXIAS	Baía de Guanabara – Rio de Janeiro	Janeiro/2000	1.105
REFINARIA DA PETROBRÁS EM ARAUCÁRIA	Baía do Rio Iguaçu – Paraná	Julho/2000	± 3.250
POÇO DA CHEVRON	Bacia de Campos – Rio de Janeiro	Novembro/2011	± 500

Fontes: (“Oil Tanker Spill Statistics 2017” (2018); PETRONOTÍCIAS, (2015); “Top 5 - Piores vazamentos de petróleo da história” (2013); BARBOSA (2010).

Um acidente de grande repercussão na mídia internacional por seus danos ambientais e por ser o primeiro de grande proporção em águas Americanas, mas que não aparece entre os maiores em termos de volume perdido, é o do petroleiro Exxon Valdez que colidiu com rochas submersas liberando cerca de 42 milhões de litros (37.000 toneladas) de petróleo na

baía do Príncipe William no Alasca, EUA, em março de 1989. Mesmo com todos os esforços de contenção e recuperação, a fase aguda de mortalidade incluiu as mortes de cerca de 250.000 aves marinhas, entre 1000 a 2500 lontras marinhas e mais de 300 focas do porto. Houve morte em massa de macroalgas e invertebrados bentônicos devido à toxicidade química, sufocamento e deslocamento do habitat pela ação de lavagem pressurizada do local. Como efeitos a longo prazo, constatou-se o aumento da mortalidade nos anos seguintes ao acidente pela exposição crônica aos resíduos não degradados, em virtude da diminuição das taxas de dispersão e degradação do óleo (PETERSON, 2003).

A ITOPF é organização, criada em 1968 após o acidente com o petroleiro Torrey Canyon em 1967, com a função original de administração dos esquemas de compensação de vazamentos junto aos membros associados ou a pedido do governo ou de organizações intergovernamentais. Segundo estatísticas recentes levantadas pela ITOPF, o número de acidentes com embarcações que transportam petróleo e derivados vem diminuindo ao longo dos anos, apesar do aumento do volume transportado como mostra a Figura 2.

Figura 2 - Diminuição do número de acidentes com petroleiros versus aumento do volume transportado. Fonte: “Oil Tanker Spill Statistics 2016”, 2017



Ainda assim, acidentes de grandes proporções têm sido registrados nos últimos anos envolvendo plataformas ou poços de petróleo. Em abril de 2010, iniciou-se o maior vazamento de petróleo da história no qual a explosão da plataforma Deepwater Horizon da petrolífera British Petroleum (BP) provocou a morte de onze trabalhadores e espalhou 669.500 toneladas (cerca de 5 milhões de barris) de petróleo ao longo de 1,5 km da costa

norte-americana por um período de 87 dias³. Em 2015, cinco anos após o vazamento, os efeitos ainda eram sentidos pela presença de compostos químicos do petróleo presentes no ambiente e nos animais, inclusive em ovos de pássaros da região, além de impactos sócio econômicos das indústrias de pesca e do turismo locais⁴.

No Brasil, o último acidente de grande repercussão aconteceu em novembro de 2011 em um poço da petroleira norte-americana Chevron. Os relatos são controversos em relação às quantidades de óleo vazado durante a perfuração, mas a Agência Nacional de Petróleo (ANP) avaliou o vazamento em cerca de 4 mil barris de petróleo cru⁵.

A despeito das contribuições inquestionáveis que o petróleo e seus derivados vêm promovendo ao longo dos séculos ao desenvolvimento das nações pelo mundo, vazamentos de óleo podem causar danos extensivos e permanentes nos ecossistemas, já que muitos constituintes são de difícil degradação (recalcitrantes) e altamente tóxicos com efeitos hemotóxicos, carcinogênicos e teratogênicos (VARJANI, 2017).

Os tópicos abaixo resumem os efeitos da poluição⁶ por vazamento de óleo relacionados à qualidade ambiental e à saúde humana com base em BERTI *et al*, 2009:

a) a presença de óleo dificulta a transferência de oxigênio para o corpo hídrico, principalmente em água paradas, levando a escassez de oxigênio, eutrofização, asfixia de animais e diminuição da fotossíntese;

b) o óleo derramado tende a se depositar sobre plantas aquáticas dificultando a absorção de gás carbônico para a fotossíntese;

c) sobre a superfície do solo, pode impedir a entrada de oxigênio favorecendo condições anaeróbicas e comprometendo o metabolismo das raízes;

d) os compostos do óleo, em contato com o sedimento ou no meio aquático, podem sofrer alterações físicas, químicas ou biológicas, transformando-se em compostos mais ou menos tóxicos;

e) organismos de maior nível de energia dentro das cadeias tróficas tornam-se extremamente vulneráveis, pois acumulam contaminantes pelos processos de bioacumulação e biomagnificação, podendo afetar o homem;

³<http://veja.abril.com.br/economia/bp-pagara-us-21-bi-por-vazamento-no-golfo-do-mexico-em-2010/>

⁴<http://www.greenpeace.org/brasil/pt/Noticias/Pior-vazamento-de-petroleo-completa-cinco-anos/>

⁵<https://www.petronoticias.com.br/archives/73744>

⁶“Poluição é uma alteração indesejável nas características físicas, químicas ou biológicas da atmosfera, litosfera ou hidrosfera que cause ou possa causar prejuízo à saúde, à sobrevivência ou às atividades dos seres humanos e outras espécies ou ainda deteriorar materiais”. Sob o ponto de vista legal, as alterações indesejáveis são provocadas pelas atividades e intervenções humanas no ambiente (BRAGA *et al*, 2005).

f) alguns grupos de organismos são bastante afetados por vazamentos de óleo, tais como crustáceos, insetos, artrópodes aquáticos e anfíbios que apresentam mucosa cutânea altamente permeável;

g) peixes em contato direto com óleo sofrem com dificuldades respiratórias, de locomoção, falhas no metabolismo hepático e endócrino, distúrbios neurológicos, etc.;

h) mamíferos e aves em contato direto com óleo têm seus pelos e penas recobertos, dificultando a fluabilidade, o voo e o isolamento térmico. Vapores tóxicos também podem levar a efeitos nocivos no sistema nervoso central, coração, pulmões, entre outros.

Impactos socioeconômicos negativos compreendem outros efeitos relevantes dos vazamentos de óleos. No caso de ambientes marinhos, as atividades econômicas associadas ao mar, como a pesca, o turismo e as indústrias que dependem da qualidade da água, serão suspensas. Além dos riscos à saúde pública, como intoxicação pela ingestão de alimentos contaminados, problemas dermatológicos e oftalmológicos causados pelo contato direto com o óleo e os riscos inerentes de mortes por incêndios e explosões (MONTEIRO, 2003).

Por fim, os vazamentos de óleo acarretam prejuízos financeiros às empresas petrolíferas. Um exemplo considerável foi o da explosão na plataforma da British Petroleum Deepwater Horizon, no Golfo do México, Estados Unidos, em 20 de abril de 2010⁷. Do total de óleo derramado, apenas 20% foi recuperado; a área costeira atingida abrangeu cinco estados e promoveu milhares de pedidos de indenizações e multas que giraram em torno de 18 bilhões de dólares⁸.

3.1.2. Remediação de ambientes marinhos impactados por vazamento de petróleo

Há uma tendência histórica e Legal de aplicar técnicas de remediação que sejam eficientes, ao menos visualmente, e que gerem descontaminação num curto intervalo de tempo. Entretanto, técnicas de limpeza rápida nem sempre resultam em recuperação ambiental (MIRANDA; ANJOS; MOREIRA, 2014).

A escolha das tecnologias de limpeza a serem utilizadas para recuperar uma área contaminada por petróleo deverá considerar as características do local ou ecossistema atingido, tipo, quantidade de óleo vazado e fatores técnicos como acesso e tipo de

⁷<http://www.pensamentoverde.com.br/meio-ambiente/o-vazamento-golfo-mexico-e-suas-consequencias/>

⁸<https://infopetro.wordpress.com/2010/08/23/a-bp-e-as-alternativas-do-desastre-a-esperanca/>

equipamento a ser utilizado, condições climáticas e sazonalidade, padrões de regulamentação local e custos operacionais (PRENDERGAST; GSCHWEND, 2014; CANTAGALLO; MILANELLI; BRITO, 2007).

As técnicas de remediação ou limpeza de petróleo e derivados são classificadas como mecânicas/físicas, químicas e biológicas e estão relacionadas, respectivamente, à contenção ou remoção do óleo; dispersão ou redução da tensão superficial entre óleo e água e; degradação do óleo por meio da atividade biológica de microrganismos locais.

Dentre as tecnologias utilizadas (ver Figura 3) em ambientes marinhos e zonas costeiras estão a limpeza natural, remoção mecânica ou manual, jateamento com água a diferentes pressões, jateamento com areia, uso de dispersantes químicos, barreiras flutuantes, trincheiras, corte de vegetação, biorremediação e outras tecnologias mais novas como queima controlada *in situ*; materiais absorventes para uma máxima remoção do óleo derramado; *skimmers* que são equipamentos para remover o óleo da superfície da água; partículas magnéticas como alternativa para os materiais absorventes e; malhas hidrofóbicas que fazem a separação entre óleo e água sem gasto de energia (PRENDERGAST; GSCHWEND, 2014).

As metodologias tradicionais físico/químicas de descontaminação muitas vezes incorporam os custos de preparação da área para tratamentos *in situ* ou de transporte do contaminante no caso de tratamento *ex situ*, assim como os custos do próprio tratamento químico que podem incluir uso de produtos como dispersantes, surfactantes ou reagentes específicos em grandes quantidades. No caso de outros mecanismos físico-químicos disponíveis naturalmente como diluição, sorção, volatilização, entre outros, a eficiência do tratamento em curto prazo poderá ser prejudicada pelas características relacionadas ao tipo e quantidade do contaminante, local de vazamento e condições ambientais (CRAIG *et al.*, 2012; MONTEIRO, 2003; MILANI *et al.*, 2000).

Figura 3 - Técnicas de remediação de petróleo em ambientes marinhos: (a) dispersante químico, (b) queima controlada *in situ*, (c) limpeza mecânica, (d) jateamento com água pressurizada.



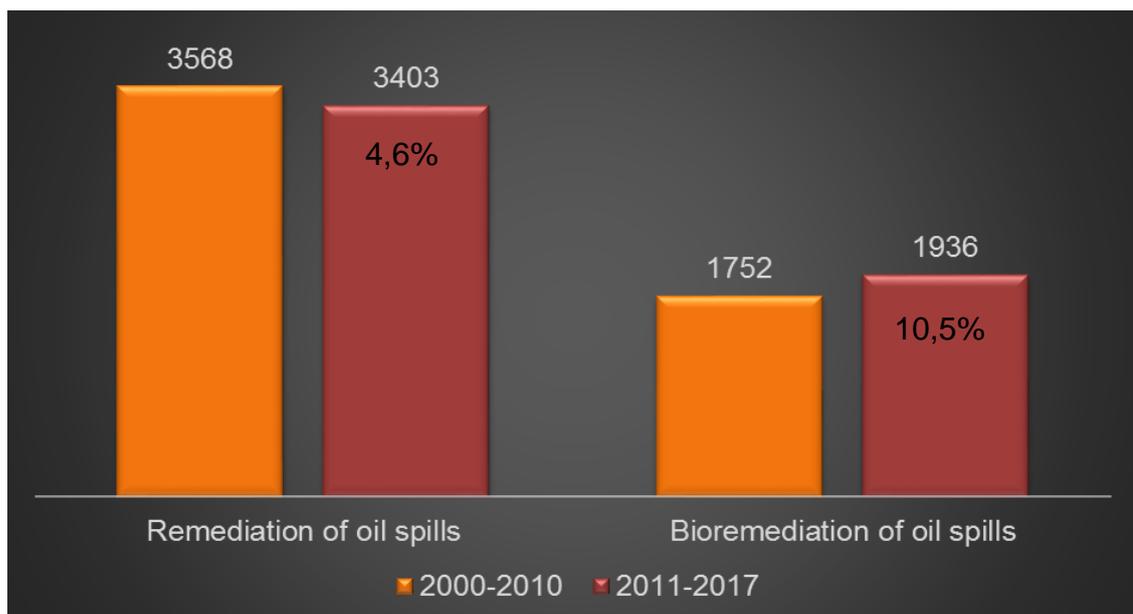
Por outro lado, a biorremediação microbiológica tem despertado cada vez mais interesse nas pesquisas para descontaminação de ambientes poluídos por petróleo e outros

poluentes como inseticidas, por ser uma estratégia biotecnológica com baixo custo de aplicação, segura e eficiente (ZHANG; WANG; YAN, 2011).

A Figura 4 mostra os resultados da pesquisa bibliográfica usando as expressões *Remediation of oil spills* e *Biorremediation of oil spills* para os períodos entre 2000 a 2010 e 2011 a 2017 na base de busca Periódicos Capes. É possível observar que o número de publicações que abordam técnicas de remediação, ou seja, técnicas físicas, químicas e biológicas, ainda é bem superior às técnicas exclusivamente biotecnológicas em ambos os períodos. Entretanto, as publicações sobre biorremediação tiveram aumento de 10,5% do primeiro para o segundo período de pesquisa, enquanto publicações sobre remediação em geral tiveram queda de 4,6% para a mesma correlação de períodos.

Os baixos custos e a segurança da biorremediação estão associados ao (1) uso de mecanismos naturais de degradação; (2) tratamento feito no local atingido, dispensando o transporte do contaminante para locais fora da área atingida e (3) não utilização de métodos físico/químicos onerosos e muitas vezes com maiores riscos de acidentes durante a execução. Outra vantagem da utilização de microrganismos na remediação de contaminantes é a relativa eficiência do método, já que há redução ou total degradação dos compostos tóxicos com formação de substâncias inócuas como dióxido de carbono (CO₂), metano (CH₄), água e biomassa celular (RON; ROSENBERG, 2014).

Figura 4 - Levantamento bibliográfico sobre o número de trabalhos que tratam de remediação em geral e de biorremediação de vazamentos de petróleo. Fonte: Periódicos Capes. Acesso: Set/2017.



3.2. Biodegradação/Biorremediação

Seres microbiológicos são um grupo diverso de organismos microscópicos constituídos de uma ou de várias células. A célula é a unidade básica na qual reações químicas acontecem com o objetivo de fornecer energia para realização de processos vitais.

O conjunto das reações químicas no interior das células é chamado de metabolismo celular e é capaz de rearranjar substâncias em novas moléculas ou macromoléculas para manutenção e crescimento dos indivíduos. Os nutrientes surgem neste contexto como fonte de substâncias essenciais que devem ser oferecidas aos microrganismos para o seu desenvolvimento.

Os nutrientes são classificados como macro ou micronutrientes de acordo com as quantidades necessárias para o crescimento e desenvolvimento dos microrganismos. Os macronutrientes são necessários em grandes quantidades e incluem principalmente carbono, nitrogênio, fósforo e enxofre. Já os micronutrientes são necessários em quantidades muito baixas, sendo considerados elementos-traço. Entre os micronutrientes estão o zinco, o cobre, o molibdênio e o ferro (MADIGAN, 2015).

O carbono é o elemento principal das moléculas orgânicas que compõem as células. É um átomo único que consegue fazer quatro ligações covalentes com outros átomos, incluindo o próprio carbono. Como esses compostos orgânicos são formados por vários átomos de carbono, suas ligações químicas armazenam energia que é liberada e utilizada em outra reação bioquímica, como por exemplo a construção de membranas celulares. Desta forma, compostos orgânicos como carboidratos, aminoácidos, vitaminas, proteínas e ácidos nucleicos são construídos e desconstruídos, necessitando frequentemente de fontes de carbono assim como de outros nutrientes (TORTORA; FUNKE; CASE, 2012; RICKLEFS, 2003).

Dessa forma, podemos entender a biodegradação como um processo natural dos organismos e microrganismos para utilização de substâncias como fonte de energia e suprimento, tornando-se parte essencial nos processos de biorremediação das contaminações.

A biorremediação pode ser entendida como um processo que utiliza de forma tecnológica a atividade metabólica de organismos vivos como microrganismos ou plantas, para remover ou reduzir poluentes do meio ambiente (GAYLARD; BELLINASSO; MANFIO, 2005).

As estratégias de biorremediação como técnica de descontaminação ambiental podem ser usadas individualmente ou de forma a se complementarem, já que variam desde a utilização de microrganismos locais, sem interferência humana, num processo denominado

atenuação intrínseca ou natural, até a alteração proposital e controlada das condições do meio (p. ex. nutrientes, oxigênio) ou da população microbiana em estratégias denominadas bioestimulação e bioaumentação .(VENOSA; ZHU, 2003).

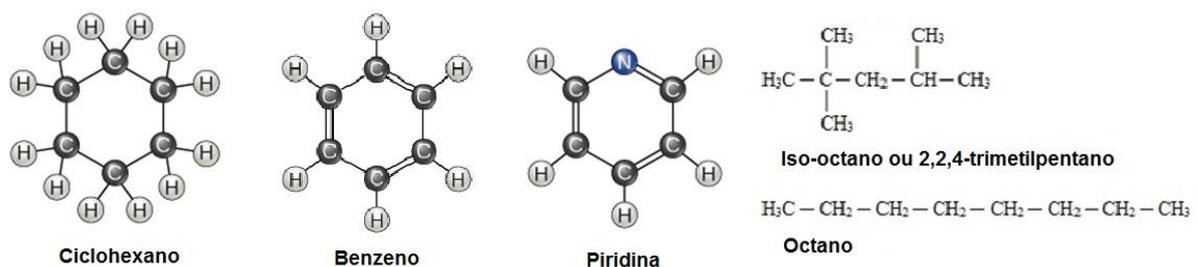
A bioaumentação é a introduz de culturas individuais ou consórcios microbianos para acentuar o processo de biodegradação, já que a abundância de espécies naturalmente capazes de degradar compostos específicos é muito baixa em ambientes marinhos.

A bioestimulação é a inserção de nutrientes ou de outros agentes estimulantes no meio para acelerar a biodegradação. Por exemplo, a correção dos baixos teores disponíveis de nutrientes como nitrogênio e fósforo em áreas contaminadas, já que a presença de petróleo ou derivados aumenta a carga de carbono no meio e consequentemente elevam as taxas de biodegradação até o limite das concentrações de nutrientes presentes naturalmente (ZACHARYASZ; SIEPAK; ROSADA, 2012). A partir do momento que a proporção C:N:P torna-se insuficiente à biodegradação, a adição de fontes externas de nutrientes passa a ser um mecanismo de aceleração da descontaminação. A bioestimulação tem sido uma estratégia mais facilmente aplicável em processos de degradação de óleo em comparação a outras estratégias de biorremediação (WARR *et al.*, 2013).

3.2.1. Petróleo como fonte de carbono

O petróleo tem sua origem a partir de sedimentos ricos em matéria orgânica e por isso sua composição é predominantemente de moléculas de carbono e hidrogênio. Por se tratar de um recurso natural presente em várias regiões da crosta terrestre há milhões de anos, microrganismos autóctones, ou seja, existentes no local, desenvolveram mecanismos de utilização de seus hidrocarbonetos como fonte de energia e substrato de crescimento (DELLAGNEZZE *et al.*, 2014). A Figura 5 mostra alguns tipos de hidrocarbonetos presentes no petróleo.

Figura 5 - Exemplos de hidrocarbonetos do petróleo.



A maioria dos hidrocarbonetos do petróleo, em ambientes marinhos, tem como destino final a biodegradação por comunidades microbiológicas locais, sendo que as taxas de degradação natural são extremamente lentas e difíceis de estimar já que outros processos físicos e químicos atuam conjuntamente. Processos como foto-oxidação, volatilização, dispersão, entre outros, são capazes de degradar frações lineares de baixo peso molecular enquanto frações de maior peso molecular ou altamente ramificados permanecem inalteradas (RON; ROSENBERG, 2014). Dessa forma, muitos hidrocarbonetos complexos tornam-se poluentes orgânicos persistentes, promovendo fenômenos de bioacumulação⁹ e biomagnificação¹⁰ que causam danos severos e persistentes no ecossistema (CHANDRA *et al.*, 2013).

Dentre os constituintes do petróleo que são considerados altamente recalcitrantes e tóxicos estão os pertencentes à sigla BTEX (Benzeno, Tolueno, Etilbenzeno e Xileno) e os HPAs (Hidrocarbonetos Poli Aromáticos). A Tabela 2 resume algumas características físico-químicas e a toxicidade das frações mais comuns do óleo cru.

Tabela 2- Propriedades físico-químicas e toxicológicas de alguns hidrocarbonetos do petróleo. Adaptado de FUENTES *et al.*, (2014).

Hidrocarboneto	Fórmula molecular	Ponto de fusão (°C)	Ponto de ebulição (°C)	Solubilidade em água 25°C (mg/L)	Toxicidade* (mg/kg)
Alifáticos					
n-Hexano	C ₆ H ₁₄	-95,4	68,7	9,5 - 262	25.000
n-Octano	C ₈ H ₁₈	-56,8	125,7	0,5 - 14,0	nd
Ciclohexano	C ₆ H ₁₂	6,6	80,7	50,2 - 88,8	nd
Aromáticos					
Benzeno	C ₆ H ₆	5,5	80,1	1.402 - 2.167	930
Etilbenzeno	C ₈ H ₁₀	-95	136,2	1310 - 208	3.500
HPA					
Naftaleno	C ₁₀ H ₈	80,3	217,9	12,5 - 38,4	533
Antraceno	C ₁₄ H ₁₀	215,8	339,9	0,03 - 0,09	4.900
Benzopireno	C ₂₀ H ₁₂	181,1	495	4x10 ⁻⁵ - 6x10 ⁻³	300
Derivado					
Querosene			205 - 300	4,8 - 10,4	15.000

nd – não determinado; * DL₅₀

⁹Processo pelo qual substâncias são absorvidas pelos organismos.

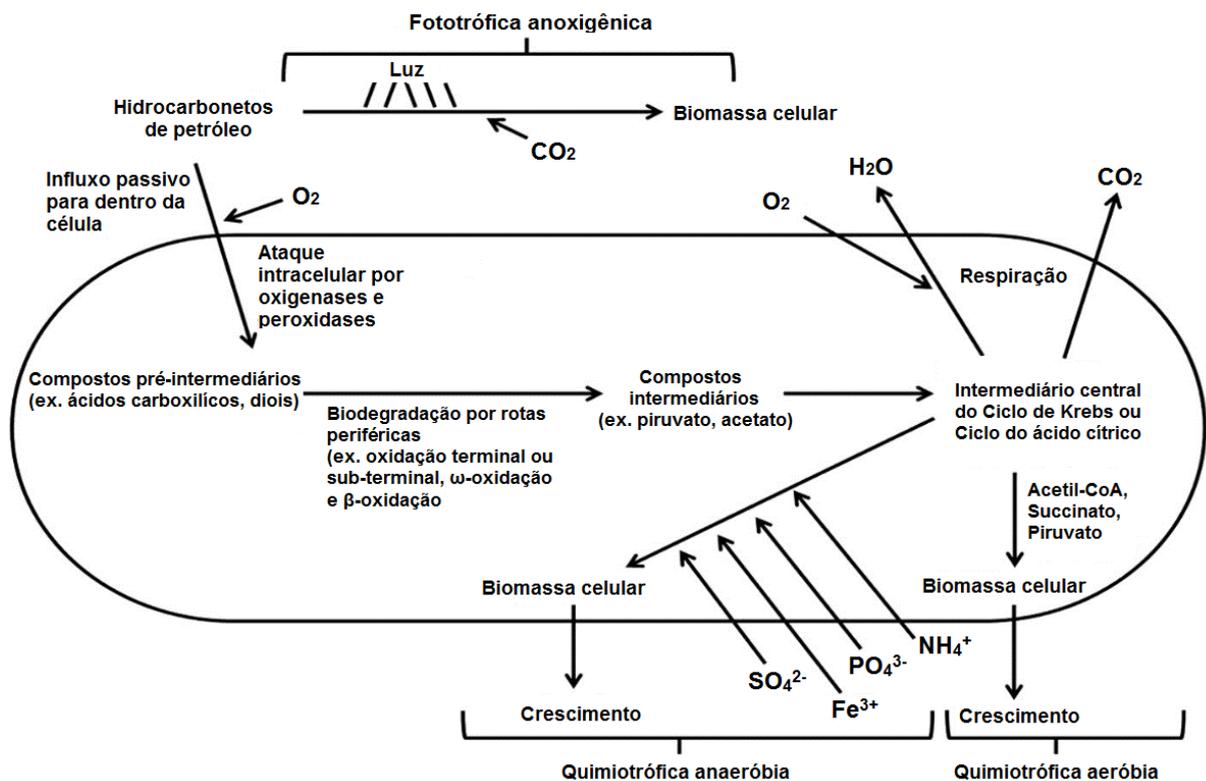
¹⁰Ocorre quando há um acúmulo progressivo de substâncias de um nível trófico para o outro ao longo da cadeia trófica. Fonte: <http://www.io.usp.br/index.php/oceanos/textos/antartida/31-portugues/publicacoes/series-divulgacao/poluicao/811-bioacumulacao-e-biomagnificacao>. Acesso 05/11/2017 às 14:52

3.2.2. Mecanismos de biodegradação de hidrocarbonetos de petróleo

A biodegradação do petróleo é um processo natural no qual microrganismos degradadores de óleo, comumente bactérias, são capazes de transformar hidrocarbonetos em moléculas menores ou mais simples dentro de suas vias metabólicas, sejam elas aeróbias ou anaeróbias, a partir de um conjunto de diferentes enzimas (ABBASIAN *et al.*, 2015; ZANAROLI *et al.*, 2010) com o propósito de obter energia ou constituição de biomassa celular para crescimento (LEAHY; COLWELL, 1990) .

A degradação microbiológica dos hidrocarbonetos do petróleo necessariamente seguirá uma das três possíveis rotas metabólicas descritas a seguir: (a) Fototrófica anoxigênica; (b) Quimiotrófica aeróbia ou (c) Quimiotrófica anaeróbia, mostradas na Figura 6. Os produtos resultantes do catabolismo desses contaminantes muitas vezes são intermediários menos tóxicos ou compostos inócuos tais como CO_2 , CH_4 , H_2O (VARJANI, 2017).

Figura 6- Esquema das rotas aeróbia e anaeróbia da degradação microbiana de hidrocarbonetos do petróleo, mostrando os diferentes aceptores finais de elétrons em cada via metabólica. Adaptado de (VARJANI, 2017).



As oxidações são as primeiras reações que ocorrem durante a biodegradação aeróbia ou anaeróbia com a finalidade de adição de grupamentos hidroxílicos ou oxigênio às cadeias dos

hidrocarbonetos por meio de enzimas denominadas oxigenases ou peroxidases, que facilitam o reconhecimento do composto pela célula (ROJO, 2009).

Na rota aeróbia mais comum de catálise de hidrocarbonetos alifáticos (saturados), o primeiro passo é a oxidação dos grupos metílicos pelas monoxigenases até formação de ácidos graxos que por β -oxidação geram acetil-CoA (ABBASIAN *et al.*, 2015; DAS e CHANDRAN, 2011), intermediário central de um dos principais ciclos do metabolismo celular de microrganismos aeróbios, o Ciclo de Krebs ou Ciclo do ácido cítrico. Para os hidrocarbonetos aromáticos, a degradação pode ser dividida em três partes: (1) adição de grupos hidroxila por enzimas periféricas ao anel aromático, transformando-o em um intermediário central da via de degradação de HPAs, normalmente um catecol; (2) clivagem do anel catecol por enzimas dioxigenases que catalisam a adição de oxigênio molecular ao anel e (3) o produto resultante da abertura do anel (p. ex. acetil-CoA, succinato, piruvato) entra na via comum de degradação de carbono e energia das bactérias (Ciclo de Krebs) (TONINI; REZENDE; GRATIVOL, 2010).

Estudos recentes têm demonstrado que hidrocarbonetos alifáticos e aromáticos estão sendo degradados na ausência de oxigênio por bactérias sulfato-redutoras, ou bactérias desnitrificantes, ou microrganismos do grupo Archae metanogênicas, cujos aceptores de elétrons no final do metabolismo anaeróbio são sulfato (SO_4^{2-}), nitrato (NO_3^-) e dióxido de carbono CO_2 , respectivamente. Em ambientes de metanogênese, bactérias hidrolíticas transformam hidrocarbonetos em acetato que é descarboxilado pelas archae metanogênicas com redução de CO_2 e produção de metano (CH_4) e água. Bactérias sulfato-redutoras transformam alcanos em ácidos graxos e depois por β -oxidação esses ácidos graxos resultam em CO_2 ou são incorporados na biomassa celular. Outra rota anaeróbia possível para degradação de alcanos é por desnitrificação na qual bactérias desnitrificadoras adicionam fumarato ao hidrocarboneto para formar (1-metilalquil) succinato que geram CO_2 no final do processo. Para hidrocarbonetos aromáticos, a rota anaeróbia pode ser dividida em três fases: (1) formação de um intermediário aromático, geralmente benzoil-CoA, (2) abertura do anel aromático, transformando-o em 3-hidroxipimelil-CoA, que sofre a ação de uma enzima desidrogenase com formação de glutaril-CoA ou acetil-CoA e (3) a enzima glutaril-CoA desidrogenase produz crotonil-CoA que é transformado em acetil-CoA e passa a seguir normalmente o ciclo de Krebs. Sobre a biodegradação de hidrocarbonetos poliaromáticos (HPAs), os mecanismos de degradação anaeróbia ainda não estão bem compreendidos. Há dúvidas se os HPAs servem realmente de fonte de carbono e energia para o metabolismo bacteriano ou se são parcialmente oxidados através do co-metabolismo com outros substratos

(LEITE, 2015; FUENTES *et al.*, 2014; TONINI; REZENDE; GRATIVOL, 2010; HARAYAMA; KASAI; HARA, 2004).

As bactérias oferecem vantagem nos processos de biodegradação por metabolizarem muitas substâncias que são tóxicas para a maioria dos animais e plantas e também por apresentarem características como crescimento rápido, versatilidade metabólica, plasticidade genética, rápida adaptação a variações do meio, que as habilitam a estarem naturalmente presentes no solo ou na água (TORTORA; FUNKE; CASE, 2012).

3.2.3. Biorremediação de petróleo

O petróleo quando derramado no mar está sujeito a modificações e sua composição é alterada com o tempo. Sob a ação do intemperismo, o óleo começa a ser decomposto por processos como evaporação das frações de baixo peso molecular, dispersão de componentes solúveis em água, mistura e dispersão do óleo na água, oxidação fotoquímica e biodegradação (HARAYAMA; KASAI; HARA, 2004).

A biorremediação do petróleo envolve a combinação dos fatores citados anteriormente e a biodegradação tem tido papel fundamental na desintoxicação total dos sistemas atingidos. Mas a degradação microbiológica natural em ambientes marinhos ocorre muito lentamente devido às condições ambientais como baixas temperaturas, baixa disponibilidade de nutrientes como nitrogênio e fósforo e a formação de emulsões do poluente com a água que se acumulam no sedimento dificultando a biodegradação (YAKIMOV *et al.*, 1998).

Os microrganismos degradadores de óleo desenvolveram ao longo do tempo características importantes para conseguirem quebrar as ligações químicas dos hidrocarbonetos, entre essas (1) a presença de enzimas específicas (dioxigenases) na membrana celular e (2) produção de substâncias (biosurfactantes) capazes de melhorar a interação entre a célula e o composto hidrofóbico (VYAS; DAVE, 2010).

A concentração do poluente e as características químicas de cada molécula de hidrocarboneto também influenciam na biodegradação (COSTA *et al.*, 2012). Por exemplo, a baixa solubilidade de alguns hidrocarbonetos dificulta sua disponibilidade aos microrganismos e à biodegradação. Dessa forma, várias reações são comuns durante a degradação microbiológica, tais como oxidação, redução, hidroxilação e desidrogenação como forma de aumentar a polaridade desses compostos e melhorar sua interação com a superfície celular e o transporte através da membrana fosfolipídica (TONINI; REZENDE; GRATIVOL, 2010).

Outro mecanismo característico dos microrganismos degradadores de óleo para melhorar a biodisponibilidade dos compostos hidrofóbicos é a produção de surfactantes naturais ou biosurfactantes, sendo a maioria desses compostos produzida por microrganismos cultivados em hidrocarbonetos hidrofóbicos. Os biosurfactantes possuem forte capacidade de emulsificação de compostos imiscíveis em água, melhorando a biodisponibilidade desses compostos através do aumento da área superficial das gotas de óleo e, por conseguinte, o acesso dos microrganismos ao substrato. Os biosurfactantes também melhoram a afinidade das células microbianas pelos contaminantes orgânicos apolares e consequente absorção direta e metabolização (ZHANG; WANG; YAN, 2011).

Levando-se em consideração que os microrganismos degradadores de hidrocarbonetos de petróleo estão naturalmente presentes nos ambientes marinhos, diversos trabalhos têm estudado a biodegradação de petróleo por diferentes grupos de microrganismos em culturas individuais ou em consórcios microbianos. Além disso, vários estudos têm identificado o aumento da abundância de determinadas bactérias em uma área somente após a contaminação com óleo, indicando que esses microrganismos, denominados de bactérias hidrocarbonoclásticas, já evoluíram para usarem o carbono desses contaminantes como única fonte de suprimento e energia (VARJANI, 2017; RON; ROSENBERG, 2014).

ABIOYE; AGAMUTHU; ABDUL AZIZ (2012) registraram e identificaram as bactérias *Acinetobacter sp.*, *Bacillus sp.*, *Micrococcus*, e *Pseudomonas aeruginosa* na região da rizosfera da planta *Hibiscus cannabinus* durante estudo de fitodegradação de óleo lubrificante.

BORAH; YADAV (2014) estudaram a biodegradação de diesel, óleo cru, óleo lubrificante usado e querosene pela bactéria *Bacillus cereus* e encontraram valores de degradação de 71, 64, 52 e 83%, respectivamente, em meio com suplementação de nitrogênio e fósforo.

WALLENIUS et al. (2012) identificaram os gêneros *Acidovorax*, *Aeromonas* e *Pseudomonas* como bactérias degradadoras de naftaleno gasoso.

CERQUEIRA et al. (2012) estudaram o uso de *Stenotrophomonas acidaminiphila*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus cibi*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Bacillus cereus* como microrganismos promissores para inoculação (bioaugmentação) em áreas contaminadas com resíduos petroquímicos.

A Tabela 3 mostra uma série de outros microrganismos isolados e identificados em amostras de água marinha contaminada com hidrocarbonetos. Destaque para o gênero

Pseudomonas que aparece como microrganismo degradador de diferentes contaminantes do petróleo ou de seus derivados.

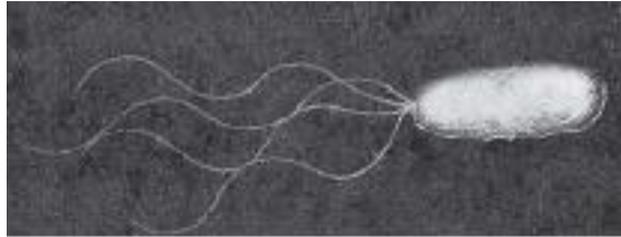
Tabela 3 - Microrganismos degradadores de hidrocarbonetos de petróleo. Adaptado de :VARJANI, (2017).

Fração do petróleo ou derivados	Microrganismos	Referências
Alifáticos	<i>Acinetobacter sp.</i>	Yakimov <i>et al.</i> , 1998; Mittal and Singh (2009) e Foght (2008)
	<i>Alcanivorax sp.</i>	Harayama; Kasai; Hara, 2004 e Brooijmans <i>et al.</i> (2009)
	<i>Bacillus sp.</i>	Ghazali <i>et al.</i> (2004) e Das and Mukherjee (2007)
	<i>Brevibacterium</i>	Leahy and Colwell (1990)
	<i>Marinobacter sp.</i>	Yakimov <i>et al.</i> (2007)
	<i>Micrococcus sp.</i>	Roy <i>et al.</i> (2002) e Ghazali <i>et al.</i> (2004)
	<i>Ochrobactrum sp.</i>	Varjani <i>et al.</i> (2015)
	<i>Oleispira sp.</i>	Harayama <i>et al.</i> (2004) e Brooijmans <i>et al.</i> (2009)
	<i>Pseudomonas sp.</i>	Mittal and Singh (2009), Rocha <i>et al.</i> (2011), Sajna <i>et al.</i> (2015), Varjani <i>et al.</i> (2015) e Varjani and Upasani (2016c)
	<i>Thalassolituus sp.</i>	Brooijmans <i>et al.</i> (2009)
<i>Aspergillus sp.</i>	Wilkes <i>et al.</i> (2016)	
<i>Candida sp.</i>	Leahy and Colwell (1990)	
<i>Penicillium sp.</i>	Atlas (1981)	
HPA	<i>Achromobacter insolitus</i>	Janbandhu and Fulekar(2011)
	<i>Bacillus pumilus</i>	Mittal and Singh (2009) e Patowary <i>et al</i> 2015
	<i>Cycloclasticus sp.</i>	Harayama <i>et al.</i> (2004)
	<i>Pseudomonas sp.</i>	Widdel and Rabus (2001) e Meckenstock <i>et al.</i> (2016)
	<i>Vibrio sp.</i>	Widdel and Rabus (2001)
<i>Penicillium janthinellum</i>	Boonchan <i>et al.</i> (2000)	
Resinas	<i>Pseudomonas sp.</i>	Leahy and Colwell 1990

As bactérias do gênero *Pseudomonas* apresentam-se na forma de bastonetes Gram-negativos e locomovem-se por meio de flagelo polar ou em tufo (ver Figura 7). São microrganismos quimiotróficos¹¹ aeróbios, embora alguns sejam capazes de realizar respiração anaeróbia substituindo o oxigênio pelo nitrato como aceptor final de elétrons. São organismos presentes naturalmente no solo e em sistemas aquáticos. A maioria das espécies utiliza uma grande diversidade de compostos orgânicos como fonte de carbono para o seu desenvolvimento. Muitas espécies causam doenças em plantas e animais, inclusive no ser humano (MADIGAN, 2015).

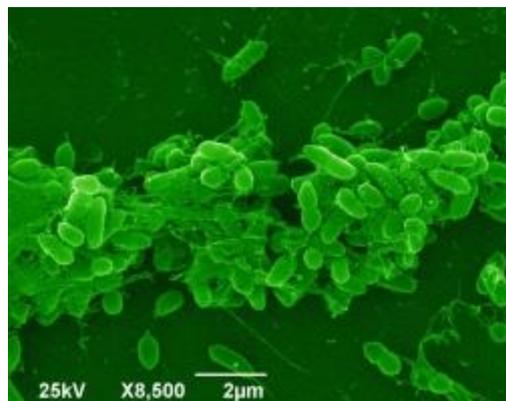
¹¹Utilização de compostos químicos inorgânicos como fonte de energia.

Figura 7 - Exemplar de *Pseudomonas aeruginosa* em micrografia eletrônica de transmissão. Célula com aproximadamente 1 μm de diâmetro. Fonte: (MADIGAN, 2015).



Uma característica interessante de muitas bactérias, entre elas a *Pseudomonas aeruginosa*, é a capacidade de formação de biofilmes (ver Figura 8). Biofilmes são formados por diversos microrganismos, mono ou multiespécies, que se desenvolvem dispersos em uma matriz composta de polissacarídeo extracelular (exopolissacarídeos – EPS), proteínas e ácidos nucléicos. Os biofilmes aprisionam nutrientes e impedem o destacamento de células de superfícies dinâmicas (MADIGAN, 2015; COSTA *et al.*, 2014).

Figura 8 - Biofilme de *Pseudomonas aeruginosa*. Fonte: <http://www.imperial.ac.uk/mrc-centre-for-molecular-bacteriology-and-infection/research/research-groups/professor-alain-filloux/>. Acesso em 17/01/2018



Geralmente os biofilmes começam a se formar sobre uma superfície (pedra, dente, mucosa) na qual uma célula bacteriana livre natatória fixa-se e passa a desenvolver-se em comunidade com outros indivíduos. Dessa forma, as bactérias podem compartilhar nutrientes, protegerem-se de condições ambientais desfavoráveis e trocarem informações genéticas (TORTORA; FUNKE; CASE, 2012).

3.3. Suplementação de nutrientes em ambientes marinhos

Nutrientes inorgânicos como nitrogênio e fósforo são encontrados em baixas concentrações em ambientes marinhos, principalmente em mar aberto (zona pelágica), por haver baixo retorno desses nutrientes das águas profundas para as águas de superfície (TORTORA; FUNKE; CASE, 2012). Quando há um vazamento de petróleo ou derivados nessa região, o aumento da fonte de carbono disponível faz com que os nutrientes inorgânicos tornem-se fatores limitantes à biorremediação natural (FUENTES *et al.*, 2014).

Como as concentrações dos nutrientes essenciais, nitrogênio e fósforo, também são baixas nas amostras de óleo cru, torna-se necessário o ajuste da proporção C:N:P para que haja crescimento microbiano e aceleração do processo de biodegradação dos hidrocarbonetos. Esse balanço entre carbono disponível e nutrientes essenciais pode ser feito por meio da bioestimulação ou adição de fontes de nutrientes como ureia, fosfatos, fertilizantes N-P-K, entre outros (RON; ROSENBERG, 2014; BOOPATHY, 2000; LEAHY; COLWELL, 1990).

A adição de nutrientes nos ecossistemas marinhos, para efeito de biorremediação de petróleo, deve ser feita com muita cautela devido aos riscos dos nutrientes em excesso, p. ex, amônia, provocarem efeito tóxico aos organismos marinhos, além de superestimularem a produtividade de algas (VENOSA; ZHU, 2003).

Embora nitrogênio e fósforo sejam essenciais ao metabolismo microbiano, a quantidade requerida de nitrogênio é cinco vezes maior que a de fósforo para a conversão de 1 grama de hidrocarbonetos em biomassa celular (ROSENBERG; RON, 1996).

REIS (2015) mostrou em seu trabalho que tanto o nitrogênio quanto o fósforo e as interações entre eles são significativos na biodegradação de óleo nos sistemas estudados, sendo que melhores índices de degradação foram obtidos nos sistemas em que as quantidades de fósforo eram menores que as de nitrogênio. HUANG *et al.* (2008) e VIEIRA *et al.* (2009) também demonstraram que o nitrogênio produz maiores efeitos sobre a biodegradação que o fósforo.

Como fonte de nitrogênio em sistemas agrícolas, a ureia tem sido amplamente utilizada por ser um composto com maior teor de N (46%) em comparação a outros compostos nitrogenados. Essa característica faz com que a ureia tenha um valor mais atrativo por tonelada de N, assim como redução dos custos de armazenamento e transporte (PROCHNOW; ABDALLA, 2007).

Apesar da alta solubilidade em água e da facilidade de mistura com outras fontes, a ureia possui forte capacidade de volatilização de amônia (NH₃) principalmente em regiões de

temperaturas elevadas. O processo de volatilização envolve a hidrólise da ureia por meio de uma enzima extracelular denominada urease produzida por diversos microrganismos. Fatores ambientais como temperatura, umidade, pH, entre outros, afetam a hidrólise da ureia e por isso torna-se necessária a busca de alternativas que diminuam as perdas de nitrogênio através que podem ser através do uso de sistemas de liberação lenta ou controlada do nutriente (FRAZÃO *et al.*, 2014).

As pesquisas para desenvolvimento e aplicação de sistemas de liberação controlada de nutrientes na biorremediação de óleo tem avançado objetivando melhorar a interação entre os nutrientes e o óleo no ambiente impactado, evitar perdas de nutrientes em ambientes de alta energia (p. ex. regiões costeiras), evitar acúmulo de nutrientes em ambientes de pouca energia e maior controle sobre o processo de biorremediação (VENOSA; ZHU, 2003).

3.4. Liberação controlada de substâncias ativas

Os sistemas de liberação controlada ou lenta de substâncias ativas surgiram da necessidade de proteger ou isolar substâncias ativas de agentes ou interferentes do meio, assim como possibilitar a liberação do ativo em locais específicos, em taxas controladas e/ou condições específicas (MENEZES *et al.*, 2013; VILLANOVA; ORÉFICE; CUNHA, 2010). Não há diferenciação oficial entre os conceitos de liberação controlada e liberação lenta de ativos; ambos objetivam a liberação gradual das substâncias ativas a fim de aumentar a eficiência do processo a qual se destinam. Entretanto, o termo controlado pressupõem que a taxa, o tipo e a duração sejam conhecidos ao passo que no conceito de “lento” não é possível conhecer ou controlar tais fatores (PEREIRA, 2014).

As primeiras tentativas de aplicação de sistemas de liberação controlada surgiram na década de 1950 com o uso de materiais poliméricos como transportadores de substâncias ativas, inicialmente pesticidas Sobral (1994) citado por (ROUXINOL, 2009). Outro registro de 1954 é sobre a comercialização do primeiro produto microencapsulado comercializado por uma empresa norte-americana, cuja substância ativa era um pigmento para uso em papéis de cópia sem carbono (RÉ, 2000).

A partir de 1980, avançaram as pesquisas sobre sistemas poliméricos que incorporam substâncias ativas para liberação controlada e não somente a área farmacêutica beneficiou-se do desenvolvimento de novos produtos e formulações, mas outras áreas apropriaram-se do conhecimento como a indústria agro-química (fertilizantes e pesticidas), indústria de

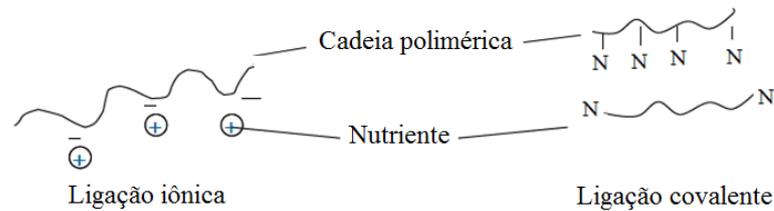
alimentos (vitaminas, aromas), áreas médica e veterinária, cosmética, produtos domésticos e gráfica (ESTEVINHO, 2010; ROUXINOL, 2009; SILVA *et al.*, 2003). Recentemente, pesquisas de imobilização de nutrientes têm sido conduzidas para aplicação na biorremediação de hidrocarbonetos de petróleo (REIS, 2009, 2015; VENOSA; ZHU, 2003).

A constituição de sistemas de liberação controlada parte do princípio da imobilização ou apreensão da substância ativa em um material ou matriz de revestimento que pode ser formado por substâncias de origem natural ou sintética e devem apresentar propriedades como baixa viscosidade, fácil manipulação, ser quimicamente estável e inerte, boa propriedade emulsificante e de formação de filmes, resistência mecânica adequada, biodegradabilidade, baixo custo, entre outras (SUAVE *et al.*, 2006). São exemplos de materiais de revestimento as macromoléculas como carboidratos, gomas, lipídios e proteínas e polímeros sintéticos ou naturais (REIS, 2015; VILLANOVA; ORÉFICE; CUNHA, 2010).

Como citado anteriormente, os sistemas de liberação controlada têm tido aplicação em diversas áreas científicas e industriais que abrangem uma grande diversidade de substâncias como fármacos, corantes, aromatizantes, pesticidas, óleos, sais, enzimas, microrganismos etc. Para constituição desses sistemas de liberação, uma série de técnicas diferentes podem ser usadas de acordo com as propriedades físico-químicas tanto da substância ativa quanto do material de revestimento (p. ex. solubilidade), assim como para o propósito final que se quer alcançar, por exemplo: (I) mascarar propriedades indesejáveis das substâncias ativas como sabor e odor; (II) converter o estado físico das substâncias para melhor manipulação; (III) melhorar formulações para possibilitar liberação controlada de ativos; (IV) proteger o material ativo da ação de enzimas, microrganismos, pH, radiação, temperatura, oxidação e humidade; (V) reduzir ou eliminar o efeito de reações adversas de algumas substâncias no meio de atuação; (VI) diminuir a toxicidade do material ativo; (VII) controlar sua biodisponibilidade; (VIII) aumentar o tempo de conservação, entre outras (MENEZES *et al.*, 2013; BANSODE *et al.* (2010) citado por BRASILEIRO, 2011; SUAVE *et al.*, 2006).

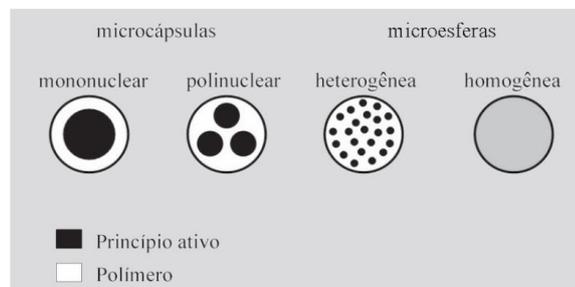
As técnicas de imobilização para obtenção de sistemas de liberação controlada de ativos podem ser divididas em métodos químicos e físicos. Dentre os métodos químicos, as técnicas disponíveis podem promover ligações covalentes ou interações iônicas entre os grupos funcionais do polímero e da substância ativa, conforme mostrado na Figura 9.

Figura 9 - Esquema dos tipos de interações químicas entre a matriz de revestimento e a substância ativa.
Adaptado de ROUXINOL (2009).



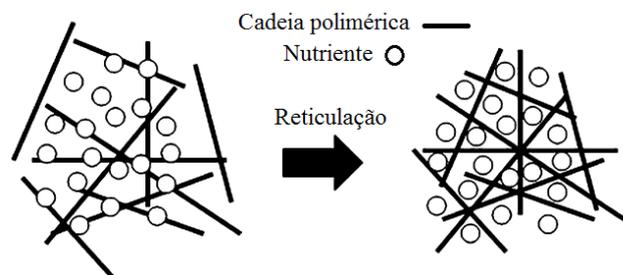
Os métodos físicos incluem a microencapsulação ou nanoencapsulação, que correspondem ao revestimento/recobrimento de uma substância ativa com um material polimérico, formando micro ou nanopartículas com diâmetros variados (ver Figura 10).

Figura 10 - Morfologia das micropartículas. Fonte: SILVA et al. (2003).



Ainda entre os métodos físicos está a oclusão, que consiste no aprisionamento do ativo no interior de uma matriz polimérica que limita sua movimentação pelo grau de reticulação, tamanho dos poros ou propriedades mecânicas do polímero (ver Figura 11).

Figura 11 - Esquema da imobilização por oclusão. Adaptado de HOLOWKA; BHATIA (2014).



De acordo com a técnica de imobilização escolhida, os materiais obtidos ao final do processo podem variar de unidades isoladas como micropartículas ou nanopartículas até agregados de várias partículas como filmes ou matrizes sólidas (ESTEVINHO, 2010; ROUXINOL, 2009).

No contexto da eficiência dos sistemas de liberação controlada associada às restrições quanto ao controle da toxicidade em determinadas áreas de aplicação, a busca por materiais de revestimentos poliméricos biodegradáveis tem se tornado de grande interesse acadêmico e industrial.

3.5. Polímeros biodegradáveis como matrizes de revestimento

Polímeros biodegradáveis são degradados pela ação de microrganismos de ocorrência natural como bactérias e fungos, através de processos de quebra de cadeias moleculares com modificação da massa molar e solubilidade do polímero. Além de mecanismos biológicos, processos físicos e químicos estão envolvidos na biodegradação (VILLANOVA; ORÉFICE; CUNHA, 2010; PRADELLA, 2006).

Os polímeros biodegradáveis podem ser obtidos de matérias-primas renováveis como milho, celulose, cana-de-açúcar, batata, trigo, entre outras, ou serem sintetizados por bactérias. São classificados estruturalmente como polissacarídeos, poliésteres ou poliamidas (BRITO *et al.*, 2011).

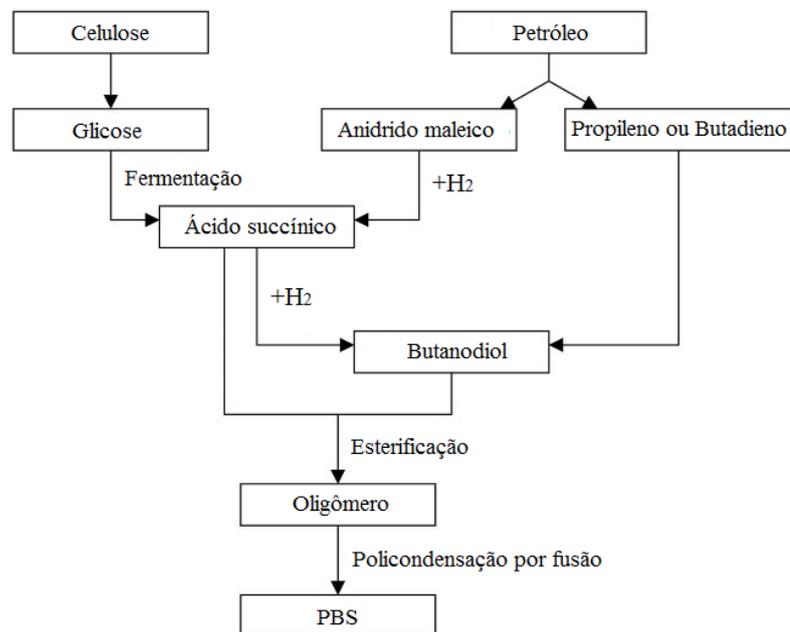
A aplicação de polímeros biodegradáveis ou mistura de polímeros biodegradáveis naturais ou sintéticos tem sido muito utilizada na liberação controlada de fármacos (CERINI A., 2004; HAYASHI T, 1994 citado por SUAVE *et al.*, 2006), assim como na indústria de alimentos e na área biomédica, já que muitos deles possuem as características ideais como materiais de revestimento, dentre elas serem atóxicos, capacidade de modulação para formação de partículas de tamanho desejável, permeabilidade, estabilidade, compatibilidade celular e biodegradabilidade. Como exemplos de poliésteres biodegradáveis temos o ácido poliglicólico (PLGA), que possui aprovação de uso regulamentada e o poli(succinato de butileno) (PBS), cujos produtos de degradação são atóxicos (COSTA, 2017; ETCHEPARE *et al.*, 2015; SILVA *et al.*, 2003; SONG; SUNG, 1995).

3.5.1. Poli (succinato de butileno)

O poli (succinato de butileno) (PBS) é um poliéster alifático biodegradável e comparado a outros poliésteres alifáticos, tais como poli (etileno succinato), poli (adenato de etileno), poli (butileno adipato), possui temperatura de fusão cristalina (T_m) mais elevada, na faixa de 111-115°C, assim como maior resistência à tração e rigidez. Por ser um polímero com estrutura de cadeia altamente linear, o PBS exibe baixa resistência à fusão e baixa viscosidade de fusão, limitando sua aplicação no processamento termoplástico e na formação de filmes (GIGLI *et al.*, 2016; KIM *et al.*, 2015; WANG; GUO; LI, 2012).

O PBS pode ser obtido a partir de derivados fósseis ou de matérias primas renováveis como sacarose, glicose, maltose e frutose. Esses carboidratos quando submetidos ao processo de fermentação por algumas espécies de bactérias, geram ácido succínico e 1,4-butanodiol que são os precursores para a síntese química do PBS (XU; GUO, 2010). A Figura 12 apresenta um esquema das formas de obtenção do PBS.

Figura 12 - Fluxograma de obtenção de PBS. Adaptado de XU; GUO (2010).



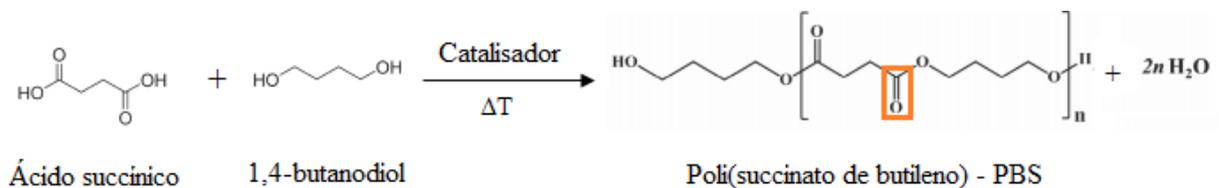
A síntese do PBS ocorre em duas etapas principais, sendo a primeira de esterificação dos precursores ácido succínico e 1,4-butanodiol, cuja reação produz água como subproduto (ver Figura 13). Para que a água seja removida satisfatoriamente do sistema afim de produzir boa conversão e um polímero de alta massa molar, deve ser aplicado vácuo ou gás nitrogênio seco ao sistema reacional. A segunda etapa é a de policondensação dos oligômeros formados

sob altas temperaturas para aumentar a velocidade de reação. O catalisador frequentemente usado na síntese de PBS é o tetrabutóxido de titânio (FERREIRA *et al.*, 2014).

O processo metabólico do qual podem ser extraídos os intermediários dos poliésteres alifáticos é o Ciclo do Ácido Cítrico ou Ciclo de Krebs que em seu curso normal é capaz de oxidar seus intermediários (acetato em acetil-CoA) gerando produtos como gás carbônico e água. Espera-se que a biodegradação de poliésteres alifáticos como o PBS, obtidos de matérias-primas renováveis pela ação de microrganismos, gerem subprodutos biocompatíveis e biodegradáveis com produção de resíduos não tóxicos, fazendo com que estes materiais tenham grande importância na áreas biomédica e ambiental (NIKOLIC; DJONLAGIC, 2001; SONG; SUNG, 1995).

Polímeros como o PBS podem ser degradados sob condições moderadas de temperatura e pressão (BALDISSERA, 2004, VOGELSANGER Jr. *et al.*, 2004) e sua capacidade de biodegradação está diretamente ligada à presença do grupo éster, em destaque na Figura 13, que é facilmente hidrolisado, levando à quebra das ligações. Dessa forma, ocorre a despolimerização pela ação de enzimas do tipo esterase, provenientes de microrganismos encontrados no solo (FERREIRA, 2013).

Figura 13 - Esquema da síntese de PBS. Adaptado de GIGLI *et al.* (2016); WANG; GUO; LI, (2012).



Para ampliar o uso do PBS em diversas aplicações, tem havido esforços na tentativa de melhorar as propriedades térmicas e mecânicas do PBS através de mecanismos como aumento da massa molar através da síntese do polímero na presença de um catalisador altamente efetivo; ramificação da cadeia principal, síntese de co-poliésteres com adição de estruturas aromáticas ou monômeros funcionais, aplicação de radiação ionizante para aumentar a reticulação entre as moléculas poliméricas ou adição de componentes de reforços como fibras naturais ou cargas nanométricas, por exemplo argila (KIM *et al.*, 2015; NIKOLIC; DJONLAGIC, 2001).

3.6. Aplicação de radiação ionizante em sistemas poliméricos

A aplicação de radiação ionizante, entre elas a radiação gama, por feixe de elétrons e raios X, atendem inicialmente ao propósito de esterilização de materiais médicos e de conservação de alimentos, sendo a radiação gama a mais empregada em diversas áreas devido sua maior disponibilidade, menor custo e maior segurança ambiental (VICENTE; SALDANHA, 2012).

No caso do tratamento de alimentos, a irradiação pretende reduzir ou eliminar as bactérias patógenas para o homem tais como *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Listeria* e *Campylobacter*, os fungos formadores de micotoxinas e insetos (por exemplo, moscas-das-frutas dos gêneros *Ceratitis* e *Anastrepha*) que deterioram os alimentos armazenados. Se aplicada na dose correta para cada alimento, a radiação não afeta a estrutura molecular do alimento e, portanto, não modifica as propriedades nutricionais e nem as sensoriais (WIELAND; LUSTOSA; MACEDO-SOARES, 2010). Em produtos médicos, a irradiação destina-se a remover ou destruir toda forma de vida macro ou microscópica, mas deve ser aplicada cuidadosamente (YAMAN, 2001) já que em materiais poliméricos, a radiação tem potencial de penetrar no material promovendo alterações indesejáveis na estrutura do polímero, tais como degradação ou reticulação (SUHARTINI *et al.*, 2003). Dessa forma, têm despontado trabalhos sobre aplicação de radiação ionizante em polímeros biodegradáveis para aumentar sua massa molar a partir da reticulação e melhorar propriedades mecânicas e térmicas (COSTA, 2017).

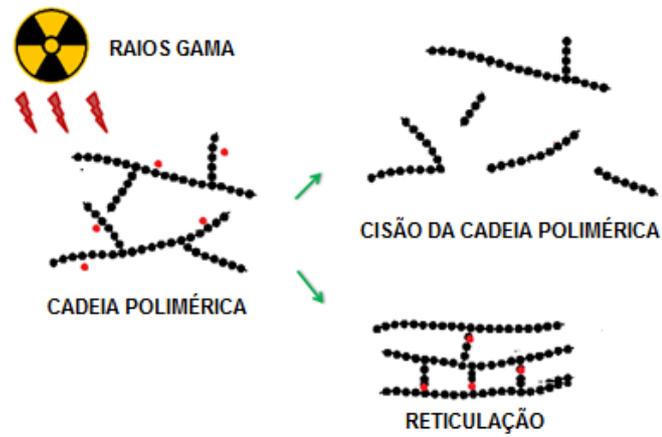
A técnica de irradiação gama consiste na emissão de energia na forma de radiação eletromagnética a partir de uma fonte de cobalto 60 ou césio 137. A radiação gama produzida pela desintegração radioativa desses elementos é altamente penetrante, capaz de atravessar células produzindo radicais livres e diversos efeitos adversos (p. ex. alterações no metabolismo celular). Contudo, os materiais submetidos à radiação gama não se tornam radioativos, pois, os níveis de energia empregados são pequenos (SILVA; SILVA; AQUINO, 2014; VICENTE; SALDANHA, 2012) e no caso de materiais poliméricos, a irradiação eletromagnética não deixa resíduos (ZEMBOUAI, *et al.* (2016) e SEFAT *et al.* (2013) citados por COSTA, 2017). A unidade com a qual a dose absorvida é medida é o Gray (Gy) ou quilogray (kGy), sendo uma unidade Gy correspondente a absorção de 1 J (Joule)/kg.

Nos materiais poliméricos, a irradiação gama pode induzir a cisão entre as cadeias moleculares e a produção de radicais livres que em conjunto podem provocar alterações físicas como fragilização, enrijecimento, descoloração etc. Por outro lado, pode haver

reticulação entre as cadeias poliméricas com consequente aumento da massa molar. A competição entre cisão e reticulação irá depender do tipo de polímero e da quantidade de energia envolvida (COSTA, 2017; KIM *et al.*, 2015).

A Figura 14 mostra um esquema ilustrativo de algumas alterações que a radiação gama pode provocar na cadeia polimérica.

Figura 14 - Esquema dos efeitos da radiação gama sobre a cadeia polimérica. Fonte: COSTA (2017).



4. OBJETIVO GERAL

Este trabalho teve por objetivo usar compósitos de PBS-Ureia 10% p/p na bioestimulação de *Pseudomonas aeruginosa* em sistemas aquáticos artificiais para biodegradação de hidrocarbonetos de petróleo.

4.1. Objetivos específicos

- Sintetizar poli(succinato de butileno) (PBS);
- Preparar compósitos PBS-Ureia 10% p/p por fusão com posterior aplicação de radiação gama para promover reticulação da cadeia polimérica e aumentar a retenção de ureia;
- Caracterizar as matrizes poliméricas quanto às propriedades térmicas e estruturais;
- Estudar a cinética de liberação de ureia das matrizes poliméricas;
- Avaliar o crescimento de *Pseudomonas aeruginosa* usando como fonte de nitrogênio compósitos PBS-Ureia 10% p/p e;
- Avaliar a biodegradação de hidrocarbonetos do petróleo por *Pseudomonas aeruginosa* através do mecanismo de bioestimulação com PBS-Ureia 10% p/p como fonte de nitrogênio.

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1. Síntese do poli (succinato de butileno) - PBS

5.1.1 Materiais e equipamentos:

- Ácido succínico P.A. ACS 99,0% Vetec;
- Tetrabutoxititânio 97% – Ti(OBu)₄ Sigma-Aldrich;
- 1,4 butanodiol P.S. 99,3% Vetec;
- Placa de aquecimento IKA modelo C-MAG HS7;
- Termopar IKA;
- Bomba Primatec modelo 131.

5.1.2. Metodologia

De acordo com a metodologia proposta por Ferreira *et al* (2014) e Santos (2014), a síntese do polímero foi feita no Laboratório de Biopolímeros e Sensores (LaBioS) - IMA/UFRJ e conduzida como descrito a seguir.

- **PRIMEIRA ETAPA – ESTERIFICAÇÃO – DURAÇÃO 5 HORAS**

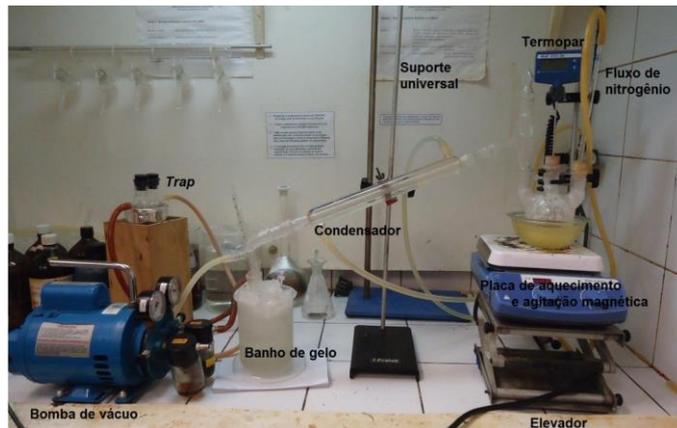
Nesta etapa, quantidades equimolares de 1,4 butanodiol (78 mL) e de ácido succínico (96,4g) foram adicionados a um reator de três bocas sob sistema fechado (a vácuo) com fluxo de nitrogênio de cerca de 0,75 bar e temperatura de 150°C. O reator ficou imerso em banho de silicone e sobre placa de aquecimento com agitação magnética. A temperatura do meio reacional foi controlada com o auxílio de um termopar. A Figura 15 mostra a montagem de um sistema para a síntese de PBS.

A água formada durante a reação foi removida por meio de um dispositivo de *trap*, com sucção a vácuo. Para evitar que gases da reação alcançassem a bomba, o *trap* foi continuamente resfriado com nitrogênio líquido, condensando os vapores removidos do meio reacional. Para condensação da água utilizou-se um condensador e na sua saída um balão imerso em um banho de etanol com gelo, para manter baixa a temperatura da água e mantê-la em estado condensado.

▪ SEGUNDA ETAPA – TRANSESTERIFICAÇÃO – DURAÇÃO 3 A 4 HORAS

Esta etapa conferiu policondensação ao pré-polímero formado na etapa anterior, pela adição ao meio reacional de 0,15 mL de $Ti(OBu)_4$ a 97%. Após adição do catalisador, a temperatura foi gradualmente sendo elevada a 200°C.

Figura 15 - Montagem do sistema para síntese de PBS em LaBioS. Fonte: (SANTOS, 2014).



5.2. Obtenção dos compósitos PBS-Ureia 10% p/p

5.2.1. Materiais e Equipamentos

- Balança Bioscale;
- Banho de Glicerina P.A. Bidestilada Vetec;
- Chapa de aquecimento Corning;
- Irradiador Gama, fonte de $Co60$, MDS Nordion, Gammacell 220 Excel;
- PBS – Massa Molar (Mn) de 5.543 g/mol;
- Termômetro escala Fahrenheit;
- Ureia P.A. Vetec.

5.2.2. Metodologia

A partir de um planejamento experimental inicial para determinação da melhor concentração de ureia (10^{th}) a ser adicionada na matriz polimérica, estimou-se os valores de 0,1, 1 e 10% p/p de ureia na mistura final PBS-Ureia. De acordo com resultados prévios de

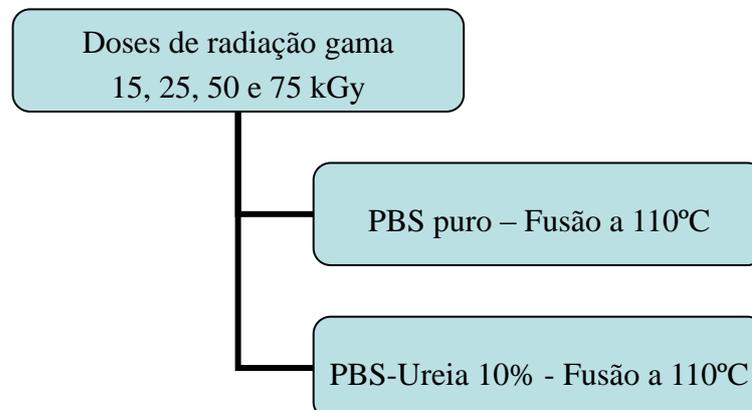
cinética de liberação de ureia assim como de fatores relacionados a operacionalização do uso dos compósitos nas dadas concentrações, optou-se por trabalhar na concentração máxima de 10% p/p de ureia nos compósitos.

O preparo dos compósitos PBS-Ureia 10% foi feito no Laboratório de Microbiologia Industrial/EQ/UFRJ a partir da mistura do PBS sintetizado na etapa anterior com 10% p/p de ureia, sendo preparados 2 (dois) lotes da mistura para a etapa de aquecimento até fusão. O primeiro lote foi aquecido até fusão do PBS em 110°C e o segundo lote até fusão da ureia em 140°C. Ambas as temperaturas foram determinadas previamente na análise termogravimétrica. Após fusão, as misturas foram deixadas para esfriar à temperatura ambiente e maceradas para obtenção de pó.

5.3. Irradiação dos materiais poliméricos

A aplicação de radiação gama foi feita no Laboratório de Instrumentação Nuclear (COPPE/UFRJ) nas doses de 15, 25, 50 e 75 kGy usando com fonte de radiação cobalto isótopo 60 (^{60}Co). As doses aplicadas foram para promover reticulação na estrutura química do PBS, objetivando aumentar a imobilização de ureia na matriz polimérica e consequentemente aumento do tempo de retenção do nutriente durante os testes de cinética de liberação. O compósito escolhido para aplicação de radiação gama foi o PBS-Ureia 10% obtido por fusão a 110°C com base nos resultados de cinética de liberação e microscopia eletrônica de varredura. A Figura 16 mostra um organograma da aplicação da radiação gama nos materiais poliméricos.

Figura 16 - Esquema ilustrativo da irradiação gama sobre os materiais poliméricos.



5.4. Caracterizações físico-químicas

As técnicas de caracterização empregadas para estudar as propriedades dos materiais poliméricos e os equipamentos utilizados estão descritos a seguir.

5.4.1. Cromatografia de Permeação em Gel

A cromatografia de permeação em gel (GPC) é usada para determinar a massa molar numérica média (M_n), a massa molar ponderal média (M_w) e a polidispersão (M_w/M_n). Esta informa sobre a distribuição de massas molares entre as cadeias poliméricas, ou seja, passa-se a conhecer se as cadeias poliméricas são todas do mesmo tamanho ($M_w = M_n = 1$; monodisperso) ou se há variação nos tamanhos de cadeias ($M_w/M_n > 1$) (Canevarolo 2006).

A análise foi feita pelo Laboratório de Apoio Instrumental 3 (LAPIN 3) do Instituto de Macromoléculas (IMA)/UFRJ em cromatógrafo de permeação em gel marca Shimadzu LC, em temperatura ambiente, clorofórmio como fase móvel, coluna série 1200 com colunas MIXED-C, padrões de poliestireno monodispersos, vazão de 1 mL/min, concentração 1 g/L e volume de injeção de 20 μ L.

5.4.2. Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier

A técnica de Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier usando acessório de reflexão total atenuada (FTIR-ATR) foi aplicada nos compósitos poliméricos PBS/Ureia 10% p/p e no PBS puro fundido/irradiado. Essa técnica permite observar bandas características de cada composto.

As análises foram feitas pelo LAPIN-IMA através do equipamento Frontier FTIR/FIR. A faixa analisada foi de 600 a 4000 cm^{-1} , com resolução de 4 cm^{-1} e em atmosfera inerte.

5.4.3. Microscopia Eletrônica de Varredura

A Microscopia Eletrônica de Varredura (SEM) é usada para analisar a morfologia dos materiais a partir da incidência de feixe de elétrons.

As análises foram feitas em microscópio Hitachi TM3030 Plus com ampliação de 2.500 e 5.000 no Setor de Caracterização Tecnológica (SCT) do Centro de Tecnologia

Mineral (CETEM), Rio de Janeiro. As amostras foram retidas em uma fita adesiva e recobertas por uma fina camada de ouro (Au).

5.4.4. Difração de raios X

A caracterização por difração de raios X (DRX) permite observar os picos cristalinos característicos dos compostos em estudo (PBS e ureia) assim como analisar possíveis alterações cristalinas nos compósitos obtidos após processamento por fusão e irradiação.

A partir da difração de raios X, é possível determinar a cristalinidade (X_c) dos materiais pelo método de diferenciação entre fase cristalina e fase amorfa (ver Equação 1) na dispersão dos difratogramas através da separação de picos múltiplos e integração dos pontos (XU et al., 2008; RULAND, 1961).

Neste trabalho, utilizou-se o software Fityk 0.9.8 para obtenção dos valores de área total e área cristalina dos materiais poliméricos.

$$X_c = \frac{\text{área cristalina}}{\text{área total}} \times 100 \quad \text{Equação 1}$$

As amostras foram submetidas à análise em difratômetro da marca Rigaku, modelo Ultima IV, em ângulo 2θ de 2° a 50° , pelo método FT (tempo fixo), sob passo de $0,05^\circ$ por segundo em temperatura ambiente com radiação $K\alpha$ de Cu (comprimento de onda de 0,15418 nm), equipamento de propriedade do IMA/UFRJ.

5.4.5. Análise Termogravimétrica e Calorimetria Diferencial de Varredura

Para estudar a perda de massa e a estabilidade térmica dos compósitos PBS-Ureia 10% p/p em função da temperatura, usou-se a Análise Termogravimétrica (TGA) pelo método de rampa de aquecimento. A Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC) foi aplicada para estudar propriedades térmicas, tais como temperatura de fusão cristalina (T_m) e entalpia de fusão (ΔH_f) e de degradação (ΔH_d). O valor da cristalinidade das amostras pode ser obtido pela aplicação da Equação 2 (PHUA et al, 2001 citado por FERREIRA et al., 2014).

$$X_c = \frac{\Delta H_f \text{ amostra}}{\Delta H_f (100\% \text{ cristalino})} \times 100 \quad \text{Equação 2}$$

na qual o ΔH_f (100% cristalino) corresponde ao valor empírico da entalpia de fusão de uma amostra de PBS 100% cristalino que é 110,3 J/g (PHUA *et al.*, 2001 citado por FERREIRA *et al.*, 2014).

Ambas as técnicas, TGA e DSC, foram feitas simultaneamente no equipamento Perkin Elmer STA6000, em atmosfera inerte de nitrogênio (gás de purga – 20 mL.min⁻¹), faixa de temperatura entre 30°C e 750°C e de taxa de aquecimento de 10 °C/min.

5.5. Estudo da cinética de liberação de ureia

Este ensaio foi conduzido no Laboratório de Microbiologia Industrial/EQ/UFRJ para avaliar o perfil de liberação de ureia dos compósitos poliméricos obtidos por fusão e irradiação gama. A metodologia usada foi proposta por REIS (2015).

5.5.1. Materiais

- Água destilada
- Kit de determinação de ureia (Ureia 500 Doles®)
- Compósito PBS-Ureia 10% p/p
- Meio mineral modificado (ver Tabela 4)
- Ureia P.A. (Vetec)

5.5.2. Equipamentos:

- Autoclave vertical CS Primatec
- Balança analítica Bioscale
- Banho-Maria Fabbe
- Espectrofotômetro Bioespectro SP-220
- Fluxo laminar Biocampo
- Incubadora Shaker New Brunswick Scientific Série 25D
- Pipeta automática 1000 µL
- Pipeta automática 10-100 µL

5.5.3. Metodologia

O meio de cultivo usado, denominado meio mineral modificado (ver Tabela 4), foi preparado com base no meio Bushnell-Haas (BH) (Sigma-Aldrich), largamente utilizado para cultivo. No meio mineral modificado, foram acrescentados todos os sais presentes no BH com exceção do nitrato de amônio que foi substituído pela ureia livre ou imobilizada.

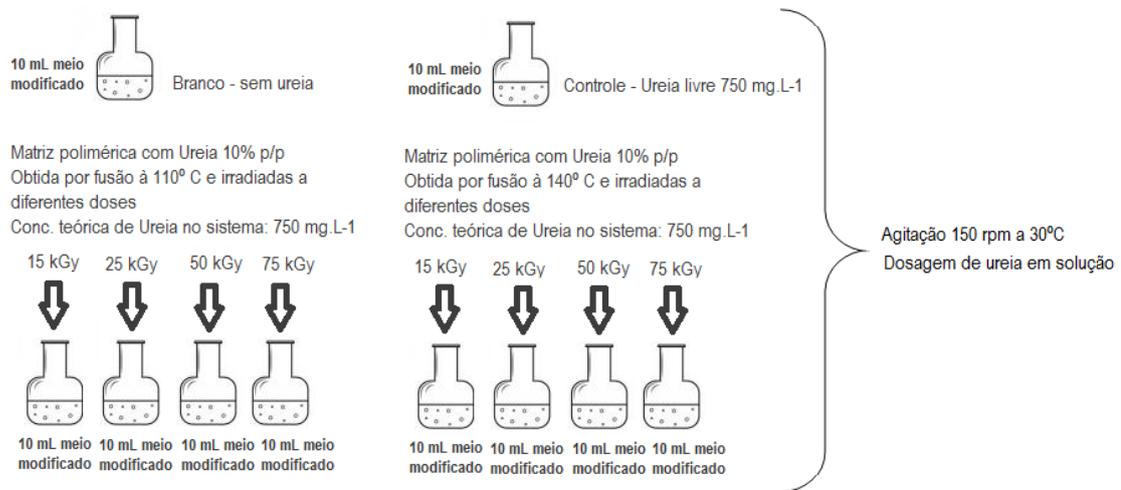
Tabela 4 - Composição dos meios minerais.

BUSHNELL-HAAS	MEIO MINERAL MODIFICADO
Nitrato de amônio – 1,0 g.L ⁻¹	Compósito PBS-Ureia 10% p/p – 0,75 g.L ⁻¹
Sulfato de magnésio (Mg ₂ SO ₄) – 0,2 g.L ⁻¹	
Cloreto de cálcio (CaCl ₂) – 0,02 g.L ⁻¹	
Fosfato de potássio monobásico (KH ₂ PO ₄) – 1,0 g.L ⁻¹	
Fosfato de potássio dibásico (K ₂ HPO ₄) – 1,0 g.L ⁻¹	
Cloreto férrico (FeCl ₃) – 0,05 g.L ⁻¹	

Os sistemas foram montados em frascos de vidro, usando-se 10 mL de meio mineral modificado para cada amostra com concentração inicial de ureia de 0,75 g.L⁻¹ em solução. Paralelamente aos sistemas com matrizes PBS-Ureia 10% p/p, foram feitos sistemas em branco (somente meio) e sistemas controle (ureia livre). Os testes foram conduzidos em triplicata, sob agitação de 150 rpm à temperatura de 30°C.

A cinética de liberação está dividida em duas fases. A primeira consiste na análise dos compósitos PBS-Ureia 10% p/p obtidos após fusão a 110°C e 140°C, com alíquotas para dosagem de ureia retiradas nos intervalos de 0, 24, 48 e 72 horas. A segunda fase compreende a análise dos compósitos obtidos por fusão a 110°C e irradiação gama em diferentes doses, com alíquotas para dosagem de ureia retiradas nos intervalos 0, 4, 24 e 48 horas. A Figura 17 mostra um esquema ilustrativo para a cinética de liberação dos compósitos irradiados.

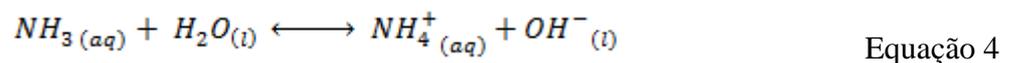
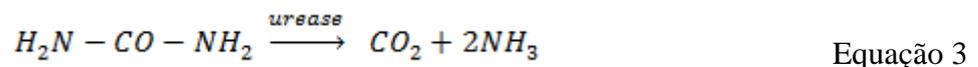
Figura 17 - Esquema ilustrativo do protocolo de análise da cinética de liberação de ureia.



5.5.4. Determinação analítica de ureia

As determinações de ureia foram feitas por espectrofotometria UV/VIS no comprimento de onda de 600 nm com uso de sistema enzimático Ureia 500 Doles® originalmente aplicado na dosagem de ureia do soro, plasma e urina *in vitro*, mas que devido à sua especificidade e sensibilidade, foi adaptado para a determinação de ureia neste trabalho.

O princípio da determinação analítica pelo kit Ureia 500 Doles® baseia-se na reação catalisada pela enzima urease (ver Equação 3), na qual os íons amônio (NH_4^+) formados (ver Equação 4) reagem com salicilato e nitropussiato de sódio em meio alcalino produzindo um composto cromógeno cuja intensidade colorimétrica é proporcional à concentração de ureia no meio.



A quantificação de ureia liberada foi feita por regressão linear a partir de uma solução padrão de ureia 800 mg.L⁻¹ fornecida pelo kit enzimático. A Equação 5 apresenta a equação reduzida da reta para a curva analítica de ureia na qual y representa a absorbância e x a concentração (mg.L⁻¹) de ureia

$$y = 0,0009x + 0,0033 \quad (R^2 = 0,9963) \quad \text{Equação 5}$$

5.6. Ensaio de crescimento bacteriano (Bioestimulação)

Este ensaio foi conduzido no Laboratório de Microbiologia Industrial/EQ/UFRJ para avaliar o crescimento de *Pseudomonas aeruginosa* a partir do uso dos compósitos PBS-Ureia 10% p/p, obtidos por fusão a 110°C e submetidos à radiação gama, como fonte de nitrogênio.

5.6.1. Materiais

- Água destilada
- Albumina Bovina 22% Ebram
- Caldo nutritivo: Extrato de carne Isofar, Peptona Bacto BD, Na₂HPO₄ P.A. Vetec, NaCl P.A. Vetec
- Kit de determinação Glucos 500 Doles®
- Kit de determinação de ureia Ureia 500 Doles®
- Compósitos PBS-Ureia 10% p/p
- Meio modificado (ver Tabela 4) com adição de 0,2% de Glicose Vetec
- NaCl P.A. Vetec 0,9% p/v
- NaOH P.A. Merck 1 M
- *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 INCQS/FIOCRUZ
- Reagente A: solução alcalina de Na₂CO₃ P.A. Vetec 2% + solução de CuSO₄ P.A. Isofar 1% + solução de Tartarato de sódio e potássio P.A. Synth 2%
- Reagente B: Folin-Ciocalteau Phenol TS Spectrum + água destilada 1:1

5.6.2. Equipamentos

- Agitador de tubos AP 56 Phoenix
- Autoclave vertical CS Primatec
- Balança analítica Bioscale
- Banho-Maria Fabbe
- Centrífuga Fanem
- Chapa de aquecimento Corning
- Espectrofotômetro Bioespectro SP-220
- Estufa de cultura Fabbe-Primar
- Fluxo laminar Biocampo

- Incubadora Shaker New Brunswick
- Microcentrífuga Thermo Scientific

5.6.3. Metodologia

O ensaio de bioestímulo foi feito para avaliar a capacidade das matrizes poliméricas contendo ureia 10% p/p de estimular o crescimento bacteriano já que essas matrizes são as únicas fontes de nitrogênio no sistema. O microrganismo usado foi a bactéria *Pseudomonas aeruginosa* cultivada pelo Laboratório de Microbiologia Industrial da Escola de Química da UFRJ. A cepa bacteriana, mantida em caldo nutriente no refrigerador, foi inoculada em novo caldo estéril e mantida à temperatura de 30°C por 24 horas antes dos ensaios.

Os sistemas foram montados em frascos de vidro com volume final de 10 mL de meio mineral modificado em cada tubo (ver Figura 18). A massa de matriz polimérica em cada experimento correspondeu 750 mg.L⁻¹ de ureia no sistema e a inoculação das bactérias foi feita a partir de uma alíquota diretamente do caldo de crescimento. Paralelamente aos sistemas com ureia imobilizada, correram sistemas em branco (apenas meio mineral modificado/sem microrganismo) e sistemas controle (quantidades conhecidas de ureia livre/com microrganismos). Os testes foram conduzidos em duplicata, sob agitação de 150 rpm à temperatura de 30°C. Alíquotas para dosagem de ureia, glicose e proteínas foram retiradas nos intervalos 2, 4, 24, 48 e 72 horas.

Figura 18 - Sistemas com ureia livre e ureia imobilizada do ensaio de crescimento bacteriano.



5.6.4. Determinação analítica de ureia

Vide item 5.5.4.

5.6.5. Determinação analítica de glicose

A dosagem de glicose foi feita por espectrofotometria a 510 nm com uso de sistema enzimático Glucox 500 Doles®, usualmente aplicado na determinação de glicose no soro, plasma e demais líquidos biológicos *in vitro*.

O princípio da determinação analítica pelo kit Glucox 500 Doles® baseia-se nas reações de oxidação da glicose catalisadas pelas enzimas glicose oxidase e peroxidase na presença de um composto cromógeno específico que adquire coloração avermelhada e sua intensidade é diretamente proporcional à concentração de glicose em solução.

As quantificações de glicose foram determinadas a partir de regressão linear de uma solução padrão de glicose 1000 mg/L fornecida pelo kit. A Equação 6 mostra a equação reduzida da reta para curva padrão de glicose na qual y representa a absorbância e x a concentração (mg.L^{-1}) de glicose.

$$y = 0,0004x - 0,0009 \quad (R^2 = 0,9954) \quad \text{Equação 6}$$

5.6.6. Determinação analítica de proteínas pelo método de Lowry

A determinação analítica de crescimento bacteriano foi feita por meio da dosagem de proteínas pelo método de (LOWRY et al., 1951), cujo princípio baseia-se na coloração de complexos formados por substâncias contendo ligações peptídicas. Esse método utiliza o reagente Folin Ciocalteau que sofre redução quando reage com proteínas na presença do catalisador Cu^{2+} produzindo um composto com absorção máxima em 750 nm. É um dos métodos de quantificação de proteínas mais utilizados por ser altamente sensível, apresentar melhor exatidão comparado a outros métodos e utilizar quantidades reduzidas de amostras. As desvantagens são o longo tempo de análise, absorvidade variável para diferentes proteínas, resposta pela lei de Lambert-Beer restrita a uma pequena faixa de concentração de proteínas e a interferência de íons Mg^{2+} e Ca^{2+} (SANTOS, 2012).

As amostras foram centrifugadas a 3.000 rpm, os sobrenadantes descartados e os decantados ressuspenso em 2 mL de solução salina com homogeneização em vórtex.

Retirou-se 1 mL de cada amostra para microtubos e adicionou-se 0,1 mL de NaOH 1M. Os microtubos foram homogeneizados e aquecidos em banho-maria por 10 minutos a 100°C. Após esse tempo, foram centrifugados a 10.000 rpm por 20 minutos. Alíquotas de 500 µL do sobrenadante foram transferidas para tubos de ensaio e adicionou-se 2 mL do reagente A deixando em repouso por 10 minutos. Passado esse tempo, adicionou-se 0,2 mL do reagente B e aguardou-se 30 minutos para quantificação por espectrofotometria UV/VIS a 750 nm.

As concentrações de proteínas foram calculadas pela interpolação de dados de uma curva padrão obtida a partir de uma solução de albumina bovina 22%. A Equação 7 mostra a equação reduzida da reta para uma curva padrão de albumina bovina na qual y representa a absorbância e x a concentração ($\mu\text{g.L}^{-1}$) de proteínas.

$$y = 0,0022 + 0,0056 (R^2 = 0,9986)$$

Equação 7

5.7. Ensaio de biodegradação de hidrocarbonetos de petróleo

Para avaliar a biodegradação de hidrocarbonetos de petróleo pela bactéria *Pseudomonas aeruginosa* em sistemas aquáticos artificiais com matrizes PBS-Ureia 10% p/p como fonte de nitrogênio, utilizou-se o óleo combustível MF 380, classificado como petróleo de base parafínica com grau API de 24,1 (REIS, 2009), como fonte de energia e carbono para o metabolismo bacteriano.

5.7.1. Materiais e Equipamentos

- Materiais e equipamentos do item 5.6
- Hexano P.A. Mistura de isômeros Isofar
- Óleo combustível MF380
- Sulfato de sódio anidro P.A. Vetec
- TOG/TPH Analyzer Infracal Wilks Enterprise

5.7.2. Metodologia

Os sistemas aquáticos artificiais foram postos em frascos de vidro autoclavados com volume final de 10 mL de meio mineral modificado com adição de matriz PBS-Ureia 10% p/p, *Pseudomonas aeruginosa*. e 0,1% p/v de óleo MF 380 conforme Tabela 5.

Tabela 5 - Protocolo simplificado do ensaio de biodegradação de hidrocarbonetos.

Condição/Sistemas Vf = 10 mL de meio modificado	[ureia] teórica (mg.L ⁻¹)	[proteína] inicial (µg.mL ⁻¹)	[óleo] inicial (%) p/v
Branco	-	-	-
Controle negativo (Atenuação natural) = Óleo	-	-	0,1
Controle positivo 1 = Óleo + Ureia livre	750	-	
Controle positivo 2 = Óleo + Ureia livre + microrganismo	750	50±5	
Óleo + PBS-Ureia 10% p/p 110°C/15kGy + microrganismo	750		
Óleo + PBS-Ureia 10% p/p 110°C/25kGy + microrganismo	750		
Óleo + PBS-Ureia 10% p/p 110°C/50kGy + microrganismo	750		
Óleo + PBS-Ureia 10% p/p 110°C/75kGy + microrganismo	750		

Os sistemas foram montados em duplicata e mantidos sob agitação de 150 rpm à temperatura de 30°C durante 30 dias conforme demonstrado na Figura 19.

Figura 19 - Demonstração do ensaio de biodegradação de óleo combustível: à esquerda os sistemas aquáticos artificiais preparados e à direita os sistemas prontos para agitação.



5.7.3. Determinação analítica de Hidrocarbonetos Totais do Petróleo (TPH)

As metodologias analíticas de TPH são usadas para determinar a quantidade total de hidrocarbonetos presentes numa amostra. Os variados tipos de solventes assim como as diferentes metodologias existentes, identificam frações distintas do óleo e por isso torna-se importante a informação sobre a metodologia empregada para fins de comparação de resultados. Entre as técnicas empregadas na avaliação de TPH, destaca-se o método por infravermelho (IR) que mede a transição entre estados vibracionais das moléculas de hidrocarbonetos quando da absorção de energia na região de IR do espectro eletromagnético. O emprego da Espectrometria de Infravermelho por Transformada de Fourier - FTIR possibilitou avaliações quantitativas no monitoramento ambiental, entretanto a complexidade

e os custos operacionais limitam sua utilização em campo, sendo desenvolvidos instrumentos de detecção portáteis tais como o analisador de TOG/TPH (NASCIMENTO *et al.*, 2008).

Os sistemas com óleo foram processados na sequência descrita a seguir, de acordo com o Method 1664, Revision B (2010) da Agência de Proteção Ambiental (EPA) dos Estados Unidos:

- 1- Extração do óleo com Hexano P.A. (Vetec);
- 2- Separação das fases aquosa e orgânica em funil de decantação (ver Figura 20). Fase aquosa seguiu para análise de ureia e proteínas;
- 3- A fase orgânica com o óleo foi filtrada em algodão hidrofóbico coberto com cerca de 500 g de sulfato de sódio e coletada em bécher com cerca de 1 grama do mesmo sal para remover qualquer traço de água (ver Figura 20). Nesta etapa houve lavagem de todo o sistema com o solvente orgânico por pelo menos 3 vezes para assegurar a remoção de todo o óleo;
- 4- O volume final para a dosagem de óleo foi de 50 mL para todas as amostras.

A quantificação foi feita por espectrometria na região do IR em analisador de TOG/TPH (ver Figura 20). Para obtenção da concentração de hidrocarbonetos em cada amostra, usamos a curva analítica de uma solução de óleo combustível MF 380 para interpolação de dados através da Equação 8, onde y representa a absorbância e x (mg.L^{-1}) a concentração de hidrocarbonetos em solução.

$$y = 0,8913 - 6,8144 (R^2 = 0,9994)$$

Equação 8

Figura 20 - À esquerda: Extração de óleo do ensaio de biodegradação. À direita: Aparelho de infravermelho para quantificação de hidrocarbonetos



6. RESULTADOS e DISCUSSÃO

6.1. Tamanho da cadeia polimérica e polidispersão

6.1.1. Poli (Succinato de Butileno) - PBS

Com esta análise foi possível obter a massa molar média e a polidispersão do polímero. Os resultados são mostrados na Tabela 6.

Tabela 6 - Resultados da análise de GPC para o polímero PBS.

Polímero	Massa molar numérica (Mn)	Massa molar ponderal (Mw)	Polidispersão (Mw/Mn)
PBS	5.343 g/mol	7.497 g/mol	1,4031

Segundo CANEVAROLO JR. (2002), polímeros com massa molar média menor que 10.000 g/mol são considerados de baixa massa molar e por isso são denominados oligômeros.

O poli(succinato de butileno) (PBS), sintetizado para este trabalho, apresentou massa molar de 5.343 g/mol e pode ser definido como um oligômero.

O valor de polidispersão de 1,4 indica que as cadeias poliméricas têm tamanhos similares já que polímeros monodispersos com polidispersão igual a 1 apresentam todas as cadeias com mesmo tamanho (CANEVAROLO JR., 2002).

Catalisadores de alta eficiência à base de titânio, como o $Ti(OBu)_4$, têm sido a estratégia mais comum para a síntese de PBS de alta massa molar, pois limitam a exposição do polímero às altas temperaturas, evitando sua degradação no interior do reator (FERREIRA, 2013). Valores de massa molar entre 19.800 e 53.000 g/mol foram citadas por (SANTOS, 2014) para PBS sintetizado com $Ti(OBu)_4$ com diferentes temperaturas e tempos reacionais.

Apesar de ter sido usado um catalisador de alta eficiência, obteve-se um PBS de baixa massa molar e algumas hipóteses podem ser sugeridas, com base em (FERREIRA, 2013), para justificar esse resultado:

(1) pouca remoção de água durante a reação de policondensação pela ineficiência do bombeamento de nitrogênio no sistema. A água é um subproduto da reação de policondensação do PBS e para haver altas conversões com formação de polímero de alta massa molar, a água deverá ser constantemente removida do sistema;

(2) a temperatura pode não ter sido suficiente para estabelecer altas conversões dos reagentes durante a policondensação, resultando em um produto de baixa massa molar e;

(3) o tempo de reação pode não ter sido suficiente para alcançar um grau elevado de polimerização.

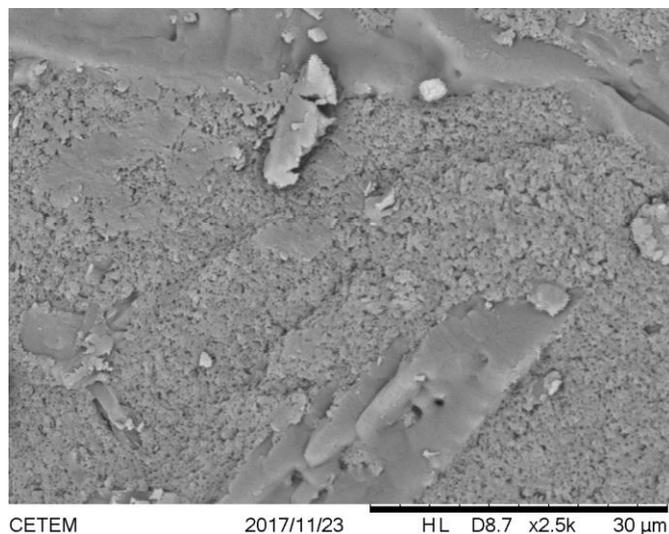
Pesquisas para obtenção de materiais de liberação controlada de ativos têm sido realizadas com materiais poliméricos de baixa massa molar (em torno de 2000 g/mol), com resultados de aplicabilidade adequada (COSTA, 2017; BODMEIER; OH; CHEN, 1989).

6.2. Morfologia superficial dos materiais poliméricos

6.2.1. Poli(succinato de butileno) –PBS

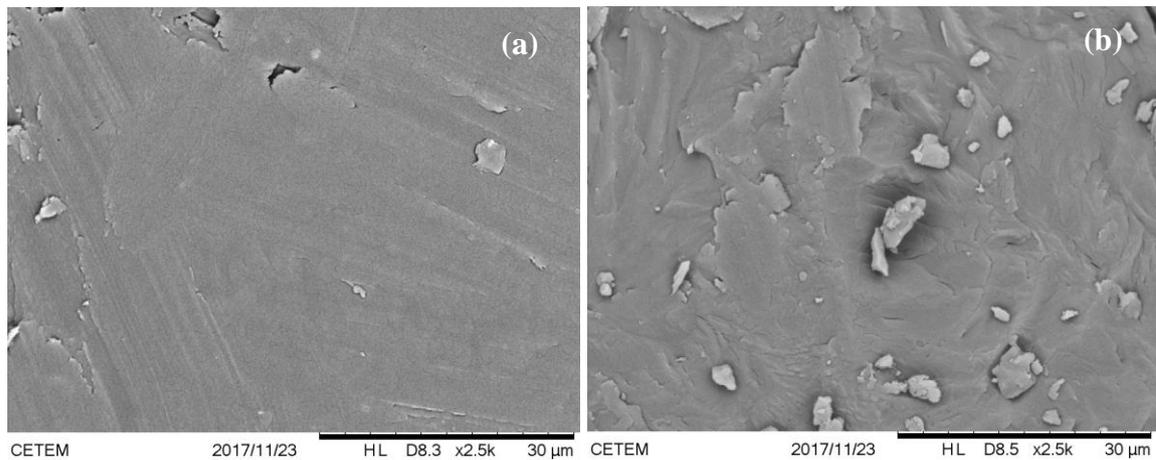
A Figura 21 mostra a morfologia de uma amostra sólida macerada a pó de PBS puro antes da fusão. Observa-se uma superfície irregular com grandes áreas de porosidade.

Figura 21 - Morfologia superficial do PBS sintetizado antes da fusão.



A Figura 22 mostra a morfologia das amostras sólidas maceradas a pó de PBS puro após fusão nas temperaturas de 110°C e 140°C e resfriamento à temperatura ambiente. Após a fusão e resfriamento do polímero puro, passa-se a observar uma superfície mais regular, com pouca ou nenhuma porosidade.

Figura 22 – Amostras sólidas maceradas a pó de PBS puro após fusão (a) a 110°C e (b) a 140°C, com visualização de fragmentos do material polimérico sobre a superfície da matriz.



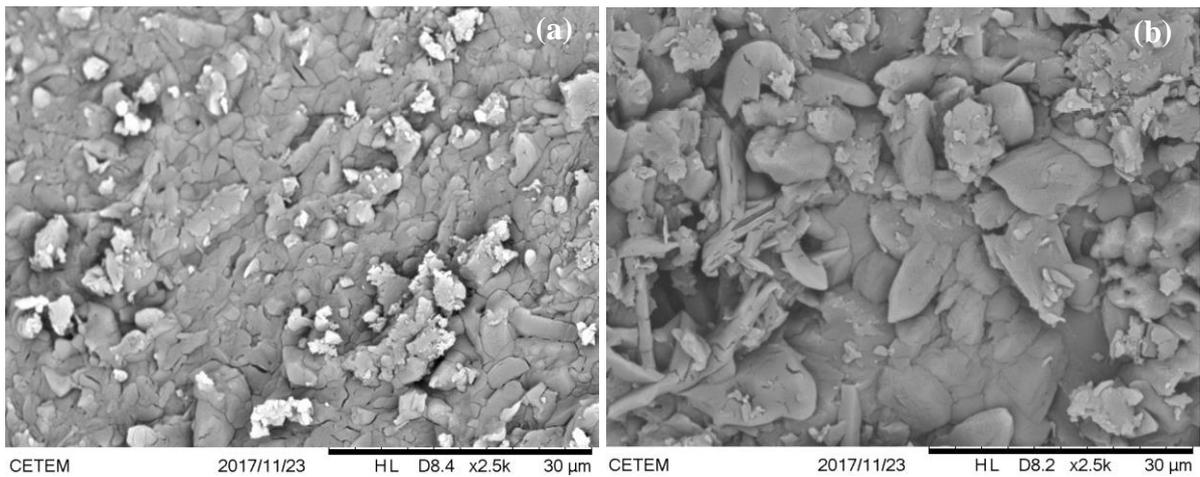
6.2.2. Compósitos PBS-Ureia 10% p/p

A Figura 23(a) apresenta uma amostra sólida macerada a pó de PBS-Ureia 10% p/p após fusão a 110°C e resfriamento à temperatura ambiente. Observa-se uma superfície irregular formada por domínios dispersos na matriz polimérica, que podem ser constituídos de partículas de ureia não fundida, já que este nutriente funde à temperatura maior que 110°C.

Na temperatura de 110°C, próxima à temperatura de fusão do polímero ($T_m = 113^\circ\text{C}$), a energia presente no sistema foi suficiente para provocar fusão parcial da mistura, ou seja, a ureia ($T_m = 135^\circ\text{C}$) parece não ter sido fundido e durante o resfriamento da mistura, o polímero ao solidificar, imobilizou fisicamente as partículas de ureia.

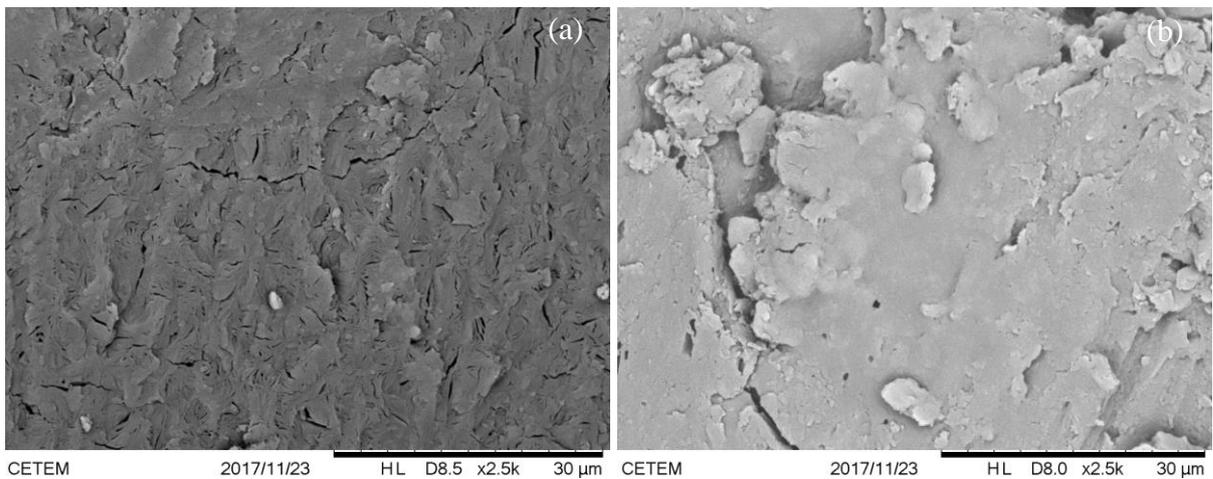
Na Figura 23(b) temos uma amostra sólida macerada a pó de PBS-Ureia 10% p/p após fusão a 140°C e resfriamento à temperatura ambiente. Nesta temperatura, tanto a ureia quanto o PBS mudaram de estado físico e foi perceptível odor característico de amônia no sistema, indicando um possível início de degradação da ureia. É possível observar na imagem que a superfície do material apresenta grandes irregularidades, com formação de domínios volumosos. Estas estruturas são provavelmente cristais maiores de ureia formados por recristalização durante o resfriamento do material. O maior tamanho desses cristais os deixa mais expostos que os análogos preparados em temperatura menor.

Figura 23 - Microscopia dos compósitos PBS-Ureia 10% p/p obtidas por fusão (a) 110°C e (b) 140°C.



A Figura 24 mostra as imagens da morfologia dos compósitos PBS-Ureia 10% p/p após ensaio de cinética de liberação de ureia.

Figura 24 - Microscopia dos compósitos PBS/Ureia 10% p/p após ensaio de liberação de ureia. (a) Compósitos obtidos após fusão a 110°C e (b) após fusão a 140°C.



Na Figura 24(a) observa-se uma superfície com várias fendas, permitindo supor que ocorreu liberação gradual de ureia imobilizada de dentro da matriz. Na Figura 24(b), cuja recristalização da ureia formou domínios volumosos, observa-se uma superfície irregular, não uniforme, permitindo supor não ter ocorrido liberação gradual de ureia imobilizada semelhante ao do compósito obtido a 110°C.

A intercalação/imobilização no polímero fundido é um das técnicas que podem ser usadas para obtenção de compósitos poliméricos pela incorporação de um determinado componente, como por exemplo a ureia, entre as cadeias poliméricas. É uma metodologia de preparo que usa equipamentos comuns de processamento e tem a vantagem de não utilizar solventes ao longo do processo (FERREIRA, 2013).

A escolha das temperaturas de fusão para obtenção dos materiais poliméricos baseou-se nas temperaturas de fusão do PBS puro e da ureia, ou seja, a 110°C teríamos apenas a fusão do polímero enquanto a 140°C teríamos a fusão da ureia juntamente com o PBS. Dessa forma, esperava-se encontrar diferenças morfológicas e/ou estruturais nos materiais obtidos por diferentes temperaturas de fusão.

Com as imagens por microscopia eletrônica de varredura (SEM) das amostras de PBS puro foi possível avaliar que, após a fusão tanto a 110°C quanto a 140°C, aumentou a uniformidade da superfície das amostras. Para os compósitos PBS-Ureia 10%, a mistura dos componentes por fusão proporcionou imobilização da ureia na matriz, caracterizada pela visualização de estruturas ou domínios sobre a superfície dos materiais. No caso dos compósitos formados a 110°C, visualiza-se maior regularidade dessas estruturas formadas por partículas não fundidas de ureia. Nos compósitos obtidos a 140°C, essas estruturas são maiores e apresentam maior irregularidade, provavelmente pela fusão e recristalização da ureia que formou cristais mais imperfeitos e irregulares, passíveis de serem solubilizados de forma mais rápida.

As micrografias da Figura 24 mostram os compósitos após ensaios de liberação de ureia e confirmam comportamentos diferenciados na liberação do nutriente. Enquanto os compósitos obtidos a 110°C mostram uma superfície mais uniforme pressupondo liberação gradual de ureia, os compósitos obtidos a 140°C mostram uma superfície bastante irregular presumindo uma liberação diferente de ureia quando comparada ao compósito PBS-Ureia 10% formado a 110°C.

6.3. Estrutura química por análise de FTIR

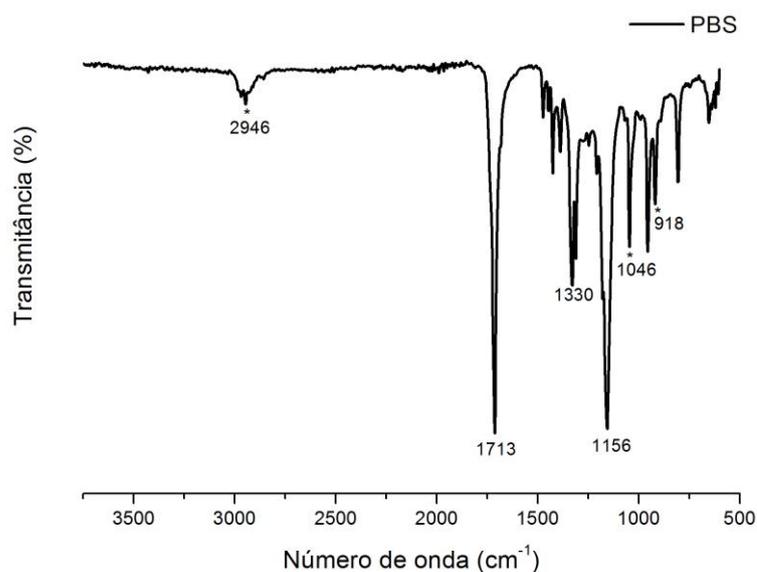
A técnica de Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier usando acessório de reflexão atenuada (FTIR-ATR) permite analisar características das estruturas químicas de diversos compostos a partir da observação de bandas relativas a determinados grupamentos. Dessa forma, é possível confirmar a presença de grupamentos em uma amostra

a partir da comparação entre as bandas típicas obtidas nos espectros com resultados contidos na literatura.

6.3.1. Poli (Succinato de Butileno) - PBS

O espectro do polímero PBS puro é mostrado na Figura 25 e apresenta picos em 2946 e 1330 cm^{-1} relacionados às vibrações assimétricas e simétricas, respectivamente, de deformação de grupos CH_2 na cadeia principal do PBS (FERREIRA *et al.*, 2014). Para o pico 1713 cm^{-1} , atribuem-se as vibrações de alongamento do grupamento éster ($-\text{C}-\text{O}-\text{C}-$). As bandas de absorção 1156 e 1046 cm^{-1} estão relacionadas as vibrações de alongamento das ligações $\text{O}-\text{C}-\text{C}$ (ZHOU (2012) citado por SANTOS, 2014). Reações de cisão da cadeia do PBS podem ser constatadas pelo aparecimento do pico 918 cm^{-1} que relaciona-se aos grupos vinis formados nessas cisões (THIRMIZIR *et al* (2011) citado por FERREIRA *et al.*, 2014).

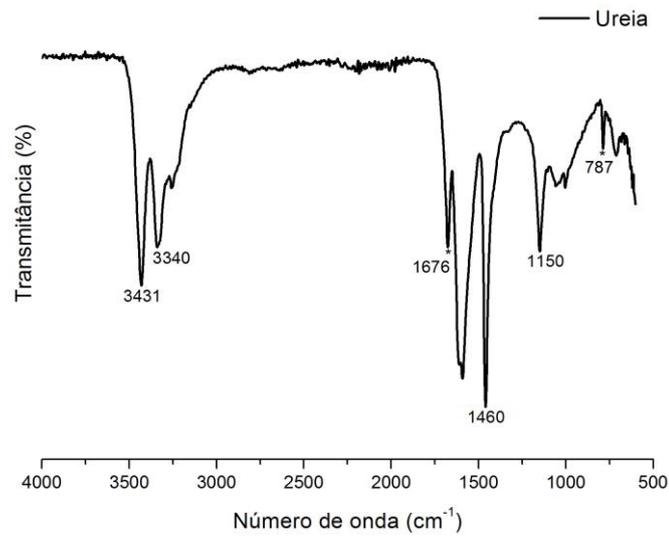
Figura 25 - Espectro de infravermelho do PBS puro.



6.3.2. Ureia

A Figura 26 mostra o espectro da ureia com bandas características em 3431 e 3340 cm^{-1} referentes às vibrações de estiramento simétrico e assimétrico de grupos $\text{N}-\text{H}$. O pico 1676 cm^{-1} refere-se às vibrações das ligações $\text{C}=\text{O}$ e o pico 1460 cm^{-1} à vibração da ligação $\text{C}-\text{N}$. O pico 1150 cm^{-1} tem relação com o grupamento $\text{N}-\text{H}$ e o 787 cm^{-1} às ligações $\text{O}-\text{C}-\text{N}-\text{N}$ (SANTOS, 2014).

Figura 26 - Espectro por infravermelho da Ureia.

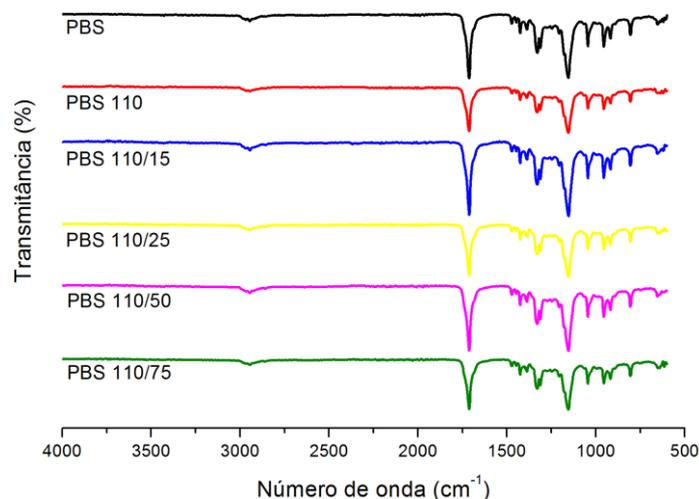


6.3.3. PBS puro após fusão e irradiação gama

Considerando os resultados prévios de microscopia eletrônica de varredura (ver Item 6.2.2) e os de cinética de liberação de ureia (ver Item 6.5), optou-se por fazer as caracterizações físico-químicas apenas das amostras de PBS e compósitos PBS-Ureia 10% p/p obtidas após fusão a 110°C e submetidos à irradiação gama. As matrizes poliméricas carregadas com ureia apresentaram melhores perfis de liberação gradual em 72 horas conforme previsto pela análise morfológica superficial.

A Figura 27 mostra a comparação entre o espectro por infravermelho do PBS puro, antes da fusão, com os espectros do PBS após fusão a 110°C e submetido às doses de radiação gama de 15, 25, 50 e 75 kGy.

Figura 27 - Espectros comparativos do PBS antes da fusão, após fusão a 110°C e irradiado.



Os espectros são muito semelhantes, com as bandas características do polímero aparecendo em todos os espectros e nenhum novo pico. De forma qualitativa, apenas com a observação dos espectros, podemos inferir que não houve nenhuma mudança na composição do polímero após a fusão e/ou irradiação dos materiais poliméricos.

Como forma de analisar estatisticamente se os processamentos de fusão e irradiação gama aplicados ao material polimérico provocaram alguma mudança de estrutura química, foi aplicada a técnica de regressão linear via mínimos quadrados para obter a correlação (R^2) e o erro médio quadrático (RMSE) para comparação do espectro do PBS sem processamento com os espectros do PBS fundido a 110°C e irradiado com diferentes doses. Os valores de correlação e de RMSE obtidos para essas amostras são mostrados na Tabela 7.

O RMSE é uma ferramenta estatística importante, capaz de mostrar a similaridade entre uma amostra modelo e os grupos experimentais (KELLEY; LAI (2011) citado por COSTA, 2017).

Tabela 7 - Correlação entre PBS sem processamento e PBS fundido e irradiado.

Transmitâncias comparadas	R	R²	RMSE
PBS x PBS	1	1	0
PBS x PBS 110	0,994	0,988	0,52
PBS 110 x PBS 110/15	0,997	0,994	0,57
PBS 110 x PBS 110/25	0,997	0,994	0,41
PBS 110 x PBS 110/50	0,997	0,994	0,53
PBS 110 x PBS 110/75	0,997	0,993	0,43

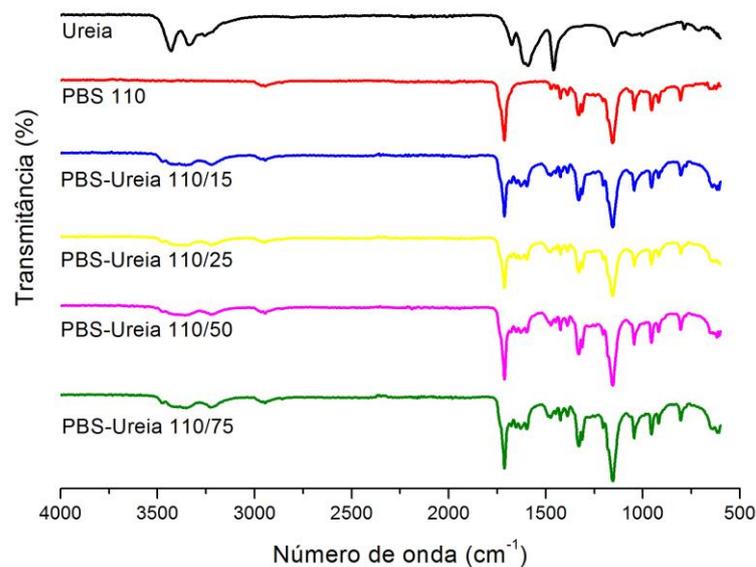
Os resultados da correlação mostram que quanto mais próximo de 1 o valor do coeficiente linear (R^2) estiver, maior a semelhança entre os espectros comparados. Ao mesmo tempo que quanto maior for o valor de RMSE, maior será a dispersão entre os dados comparativos de transmitâncias. Dessa forma é possível inferir que, com a fusão, houve certo grau de alteração da estrutura química do polímero possivelmente pela formação de cristais imperfeitos e mais regiões amorfas durante o resfriamento e recristalização. Em relação à radiação, não se observa clara tendência na diferenciação dos materiais com a diminuição ou aumento das doses de radiação. Mas podemos presumir inicialmente que, a menor dose de radiação (15 kGy) foi capaz de produzir maior efeito sobre o material polimérico quando comparado ao polímero puro sem irradiação ou com os demais materiais irradiados. Pode-se justificar tal resultado pelo efeito degradador que doses mais baixas de radiação gama causam

às cadeias poliméricas, promovendo rompimento (cisão) de algumas ligações químicas e consequente alteração estrutural (COSTA, 2017; KIM *et al.*, 2015).

6.3.4. Compósitos PBS-Ureia 10% p/p

A Figura 28 mostra os espectros por infravermelho dos compósitos PBS-Ureia 10% p/p obtidas após fusão a 110°C e submetidos à radiação gama em diferentes doses.

Figura 28 - Espectros por infravermelho do PBS, Ureia e compósitos PBS-Ureia 10% p/p.



Analisando os espectros dos compósitos PBS-Ureia 10% p/p, observam-se picos característicos tanto do PBS quanto da ureia.

Na região entre 3500 e 3250 cm⁻¹, visualizam-se deformações referentes aos picos 3431 e 3340 cm⁻¹ do espectro da ureia que indicam presença de grupamentos N-H. Ainda próximo à essa região, é possível visualizar um pico antes de 3000 cm⁻¹ que condiz com o pico 2946 cm⁻¹ referente ao grupamento CH₂ da cadeia principal do PBS.

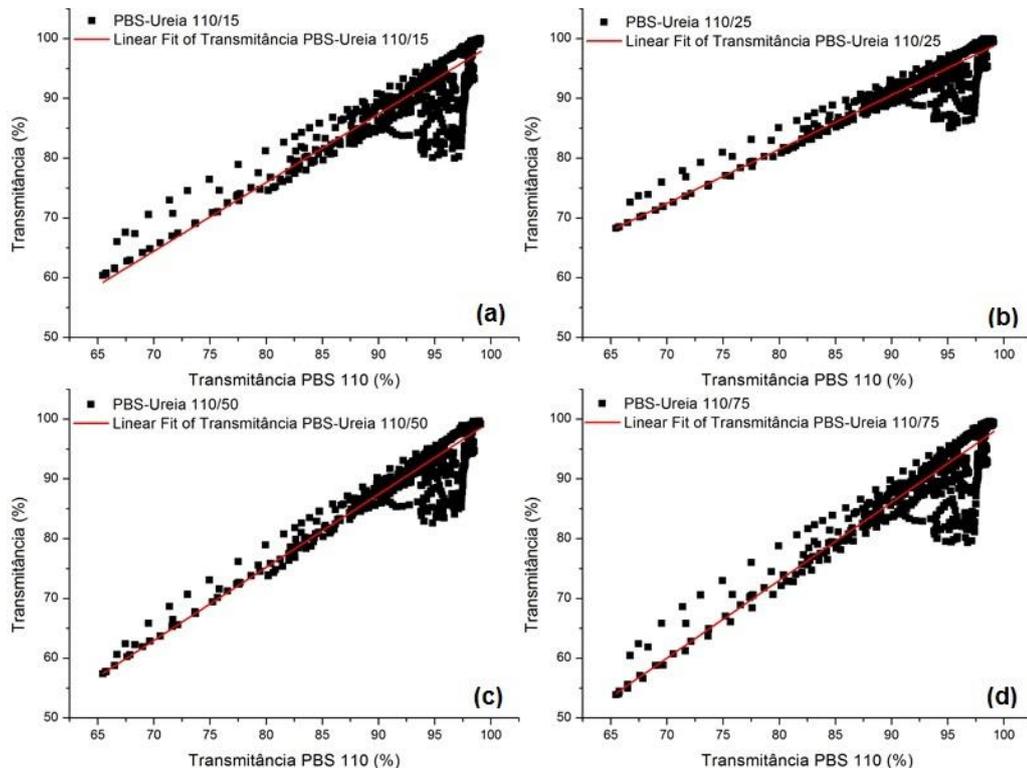
Na região entre 1750 e 500 cm⁻¹ também visualizam-se picos semelhantes aos do espectro do PBS, especificamente próximos a 1713 e 1156 cm⁻¹ referentes aos grupamentos C-O-C (éster) e O-C-C, respectivamente.

Entre 1750 e 1500 cm⁻¹, é possível ver a influência da presença da ureia através das deformações referentes ao grupamento C-N.

6.3.5. Análise de erro médio quadrático dos compósitos PBS-Ureia 10% p/p

Com o propósito de avaliar quantitativamente as alterações nos espectros das matrizes poliméricas carregadas com ureia, calculou-se o coeficiente de determinação (R^2) e o erro médio quadrático (RMSE) entre as transmitâncias do PBS fundido a 110°C e dos compósitos PBS-Ureia 10% p/p obtidos após fusão e irradiação gama (ver Figura 29).

Figura 29 - Análise comparativa das transmitâncias entre PBS puro após fusão e compósitos PBS-Ureia 10% p/p.



A Figura 29 mostra a comparação entre a transmitância do PBS fundido a 110°C contra a transmitância dos compósitos (a) PBS-Ureia 10% p/p com dose 15kGy de radiação gama; (b) PBS-Ureia 10% p/p com dose de 25 kGy; (c) PBS-Ureia 10% p/p com dose de 50 kGy e (d) PBS-Ureia 10% p/p com dose de 75 kGy. Todas as comparações apresentaram diminuição de linearidade, ou seja, os compósitos apresentam diferenças em suas estruturas químicas em comparação com a do PBS puro após fusão. Isso demonstra que houve algum grau de interação entre o PBS e a ureia, com formação de um material com estrutura química diferente do polímero puro fundido.

Na Tabela 8 são mostrados os valores de correlação (R^2) e do erro médio quadrático (RMSE) para o PBS puro *versus* compósitos PBS-Ureia 10% p/p obtidos após fusão a 110°C.

Tabela 8 - Correlação entre PBS puro e compósitos PBS-Ureia 10% p/p após fusão a 110°C.

Transmitâncias comparadas	R	R²	RMSE
PBS 110 x PBS 110	1	1	0
PBS 110 x PBS-Ureia 110/15	0,868	0,754	3,11
PBS 110 x PBS-Ureia 110/25	0,894	0,800	2,15
PBS 110 x PBS-Ureia 110/50	0,924	0,853	2,41
PBS 110 x PBS-Ureia 110/75	0,890	0,792	3,16

A partir dos resultados da análise estatística mostrada na Tabela 8, pode-se observar que o compósito PBS-Ureia 10% p/p submetido à dose de radiação de 15kGy apresentou maior desvio ($R^2 = 0,754$) e baixa similaridade (RMSE = 3,11) em relação ao modelo PBS puro obtido por fusão a 110°C. Já o compósito PBS-Ureia 10% p/p submetido a dose de radiação de 50kGy apresentou menor desvio ($R^2 = 0,853$) e maior similaridade (RMSE = 2,41) com o modelo.

De certa forma, os compósitos PBS-Ureia 10% p/p com doses intermediárias de radiação gama apresentaram tendência de maior similaridade química-estrutural como o PBS puro pós-fusão. Esses resultados podem ser explicados pelo efeito degradador (cisão) que as doses mais baixas de radiação gama exercem sobre a cadeia polimérica, enquanto as doses mais altas exercem efeito contrário de reticulação ou aumento das ligações intermoleculares que podem ter modificado a conformação estrutural dos materiais poliméricos analisados (KIM *et al.*, 2015). Sendo assim, nos compósitos submetidos às doses intermediárias de radiação gama pode ter havido certo equilíbrio entre as forças de cisão e reticulação sobre as cadeias poliméricas (COSTA, 2017) fazendo com que esses compósitos sejam mais similares entre si e com o modelo de comparação.

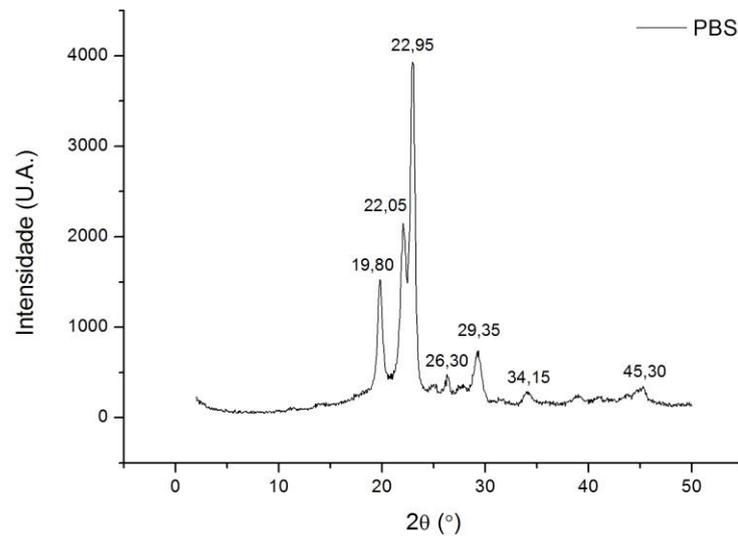
6.4. Estudo da estrutura cristalina por DRX

Neste tópico serão apresentados os resultados das análises por difração de raios X (DRX) do polímero, da ureia e também dos compósitos PBS-Ureia 10% p/p. A difração de raios X é uma técnica de incidência de radiação sobre uma amostra que passa a emitir um feixe de fótons difratados permitindo o estudo da estrutura cristalina da amostra.

6.4.1. Poli (succinato de butileno) (PBS)

Na Figura 30 é mostrado o difratograma correspondente ao PBS puro. Os picos característicos do polímero podem ser vistos nos ângulos 2θ em $19,80^\circ$, $22,05^\circ$, $22,95^\circ$, $26,30^\circ$, $29,35^\circ$, $34,15^\circ$ e $45,30^\circ$. Esses resultados confirmam que a amostra analisada trata-se do poliéster poli(succinato de butileno) com base em dados semelhantes obtidos por XU et al. (2008) que detectaram difração dos cristais monoclinicos desse polímero nos ângulos $19,5^\circ$, $21,7^\circ$ e $22,6^\circ$ e NIKOLIC; DJONLAGIC (2001) que registraram os seguintes picos e planos, respectivamente: $19,71^\circ$ (111 e 002); $22,07^\circ$ (012); $22,80^\circ$ (110); $26,20^\circ$ (121) e $29,09^\circ$ (110).

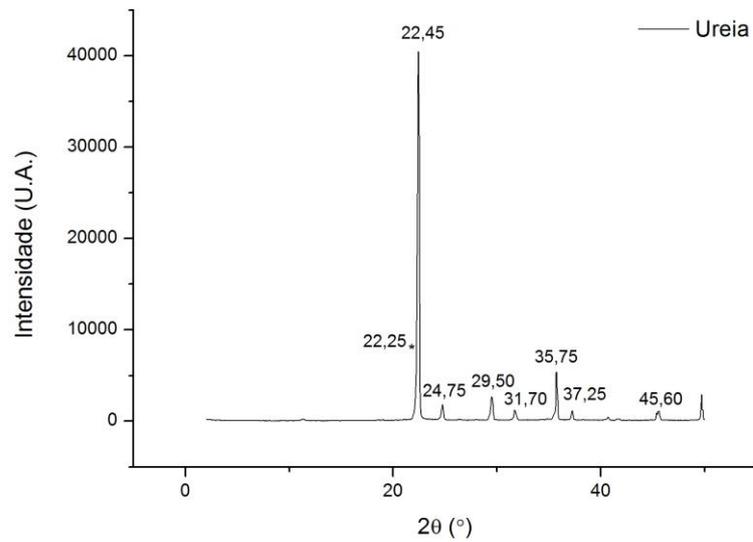
Figura 30 - Difratograma do PBS puro.



6.4.2. Ureia

A Figura 31 mostra picos bem definidos característicos de substâncias altamente cristalinas como a ureia. Foram identificados oito picos principais no ângulo 2θ em $22,25^\circ$, $22,65^\circ$, $24,95^\circ$, $29,6^\circ$, $31,8^\circ$, $35,9^\circ$ e $45,65^\circ$ semelhantes aos encontrados por (SANTOS, 2014) na caracterização por DRX da ureia.

Figura 31 - Difratoograma da ureia.

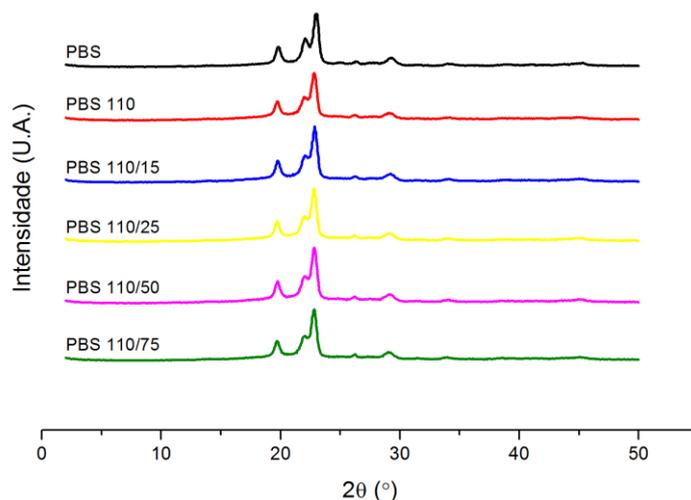


6.4.3. PBS puro após fusão/irradiação

De acordo com os resultados de microscopia eletrônica de varredura (ver Item 6.2.2) e os de cinética de liberação de ureia (ver Item 6.7.1), optou-se por fazer as caracterizações físico-químicas apenas das amostras de PBS puro e dos compósitos PBS-Ureia 10% p/p obtidas por fusão a 110°C e irradiadas com diferentes dose de radiação gama. As matrizes carregadas com ureia apresentaram melhores perfis de liberação gradual em 72 horas conforme previsto pela análise morfológica (SEM).

A Figura 32 apresenta o resultado das análise por DRX do polímero fundido e também sob efeito de diferentes doses de radiação gama. Através dos difratogramas não é possível inferir sobre nenhuma alteração na estrutura cristalina do polímero após a fusão e /ou irradiação.

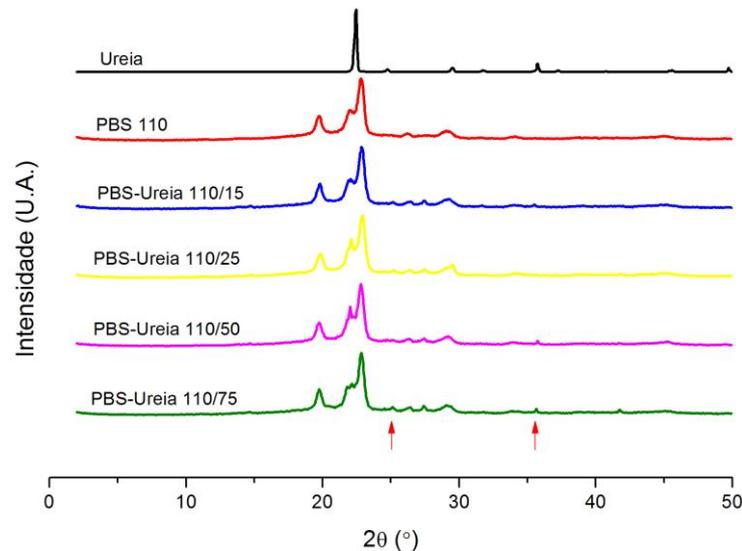
Figura 32 - Difratoogramas do PBS sob diferentes condições.



6.4.4. Compósitos PBS-Ureia 10% p/p

Na Figura 33 são mostrados os difratogramas dos compósitos PBS-Ureia 10% p/p em comparação aos difratogramas do PBS puro após fusão a 110°C e da ureia.

Figura 33 – Difratogramas normalizados da ureia, PBS puro pós-fusão e compósitos PBS-Ureia 10% p/p.



A partir da análise visual dos difratogramas da Figura 33 é possível observar que os compósitos PBS-Ureia 10% p/p apresentam estrutura cristalina muito similar ao do PBS puro pós fusão a 110°C. Embora os difratogramas estejam normalizados, para que fosse possível realizar a comparação na mesma figura visto que a ureia é uma substância altamente cristalina e com intensidade de sinal muito superior ao dos demais difratogramas, é possível observar alterações bastante sutis nos difratogramas dos compósitos nos ângulos 2θ de 25 e 35° relativos à presença da ureia nos compósitos.

6.4.5. Análise da cristalinidade (X_c)

Para analisar as alterações na cristalinidade do PBS puro fundido/irradiado assim como dos compósitos PBS-Ureia 10% p/p promovidas pelo rearranjo estrutural após fusão e resfriamento lento e/ou incidência das diferentes doses de radiação gama, calculou-se o valor da cristalinidade conforme resultados mostrados na Tabela 9 e 10.

Tabela 9 - Cristalinidade por DRX das amostras de PBS.

	PBS	PBS 110	PBS 110/15	PBS 110/25	PBS 110/50	PBS 110/75
Xc (%)	66	40	47	50	49	51

Tabela 10 - Cristalinidade por DRX das matrizes poliméricas PBS-Ureia 10% p/p.

	PBS-Ureia 110/15	PBS-Ureia 110/25	PBS-Ureia 110/50	PBS-Ureia 110/75
Xc (%)	47	42	43	49

A energia presente no sistema alcançada na temperatura de fusão desorganiza toda a cadeia do polímero (SANTOS, 2014). Com o resfriamento do material, o rearranjo pode não ocorrer da mesma forma (CANEVAROLO JR., 2002) e a cristalinidade do material pós fusão pode diferir do material antes da fusão. Por outro lado, a energia proveniente da radiação gama poderá ser capaz de promover cisão ou reticulação das cadeias poliméricas e alterar a estrutura cristalina dos materiais irradiados.

O valor da cristalinidade calculado por DRX para o PBS puro sem processamento ($X_c = 66\%$), ou seja, sem ter sido fundido ou irradiado, corresponde ao de um polímero semicristalino como é o caso do poli (succinato de butileno). Com a fusão, a organização da cadeia do PBS é destruída e o resfriamento lento não permite a formação de cristais de qualidade, diminuindo o valor da cristalinidade para 40% no PBS puro fundido (PBS 110).

As doses de radiação gama sobre o polímero fundido, aumentaram o valor da cristalinidade de 40% no PBS 110 para 47% em 15 kGy; 50% em 25 kGy, 49% em 50 kGy e; 51% em 75 kGy. Esse aumento de cristalinidade pode estar relacionado aumento de energia no sistema que permitiu algum grau de mobilidade e reordenamento cristalino nos materiais poliméricos. Nas matrizes carregadas com ureia, a irradiação também provocou aumento da cristalinidade de 40% no PBS 110 para 47% em 15 kGy, 42% em 25 kGy, 43%, em 50 kGy e 49% em 75 kGy.

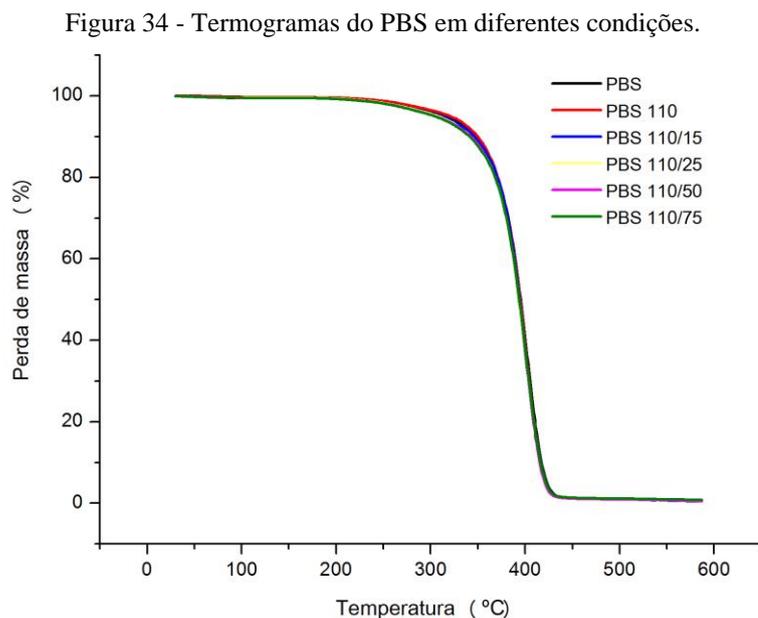
Como os valores de cristalinidade dos compósitos PBS-Ureia 10% p/p são próximos aos das amostras de PBS puro irradiadas, presume-se que a ordenação da estrutura química com a formação de novos rearranjos cristalinos foi devida à irradiação do material em detrimento da presença da ureia que também poderia influenciar na cristalinidade.

6.5. Propriedades térmicas dos materiais poliméricos e da ureia

A seguir são apresentados os resultados das análises térmicas TGA e DSC que foram feitas para observação das propriedades térmicas como perda de massa, temperatura de fusão (T_m), temperatura de degradação (T_d), entre outras, do PBS puro, ureia, e compósitos PBS-Ureia 10% p/p obtidas por fusão a 110°C e irradiação gama.

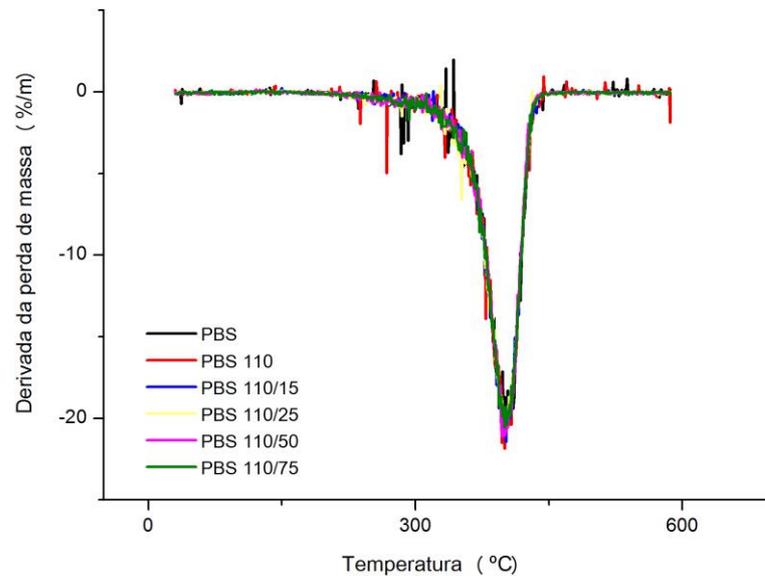
6.5.1. Análise Termogravimétrica (TGA)

Na Figura 34 são mostrados os termogramas das amostras do PBS em diferentes condições: (1) antes da fusão, (2) após fusão a 110°C e (3) após fusão a 110°C com exposição à diferentes doses de radiação gama e na Figura 35 as curvas da derivada da TGA para esses mesmos materiais.



As curvas termogravimétricas das amostras de PBS irradiados apresentam-se muito semelhantes aos do PBS antes e após a fusão, com visualização de um único estágio de degradação para todas as amostras e temperaturas iniciais de degradação (T_{onset}) muito próximas, variando de 364 a 368°C, conforme Tabela 11.

Figura 35 - Derivadas da análise termogravimétrica do PBS em diferentes condições.



As curvas de derivada para as diferentes amostras de PBS puro mostram a inflexão principal das curvas, referente à degradação térmica dos materiais, na faixa entre 396 a 402°C (ver Tabela 11), bastante semelhantes entre si e com variação não significativa entre elas.

Tabela 11 - Propriedades térmicas por TGA do PBS em diferentes condições.

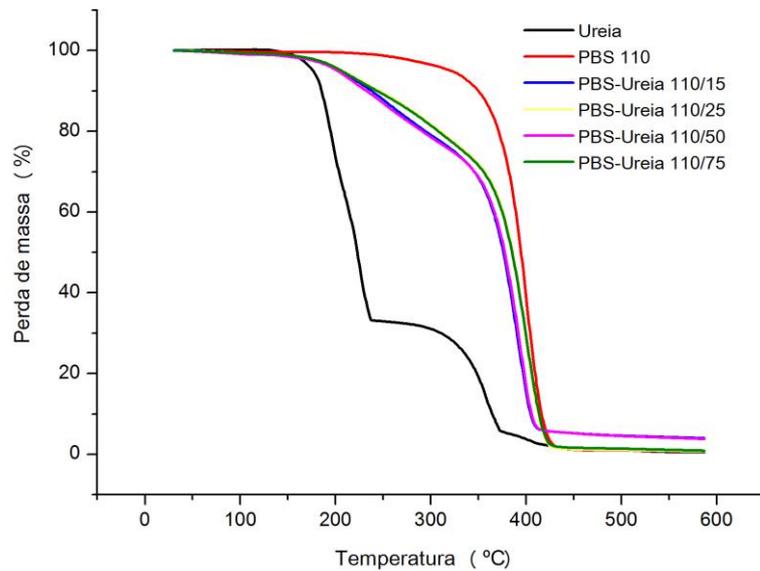
Material	Td (°C)	Tonset (°C)	Perda de massa (%)
PBS	397	364	99,16
PBS 110	398	366	99,19
PBS 110/15	402	368	99,53
PBS 110/25	402	366	99,41
PBS 110/50	396	365	99,45
PBS 110/75	402	365	99,20

Td = temperatura de degradação; *Tonset* = temperatura inicial de degradação

Os resultados mostrados na Tabela 11 indicam que a fusão do PBS a 110°C com resfriamento à temperatura ambiente e submetido a diferentes doses de radiação gama, não interferiram nas temperaturas de máxima taxa de degradação (Td), assim como na temperatura inicial (*Tonset*) da degradação. As taxas percentuais de perda de massa também apresentaram-se próximas variando de 99,16% a 99,53% na temperatura final de análise.

A Figura 36 mostra as curvas termogravimétricas dos compósitos PBS-Ureia 10% p/p obtidas por fusão a 110°C e submetidas a diferentes doses de radiação gama e a Figura 37 as derivadas da TGA das matrizes poliméricas e de seus componentes separadamente.

Figura 36 - Termogramas dos compósitos PBS-Ureia 10% p/p e de seus componentes sob diferentes condições.

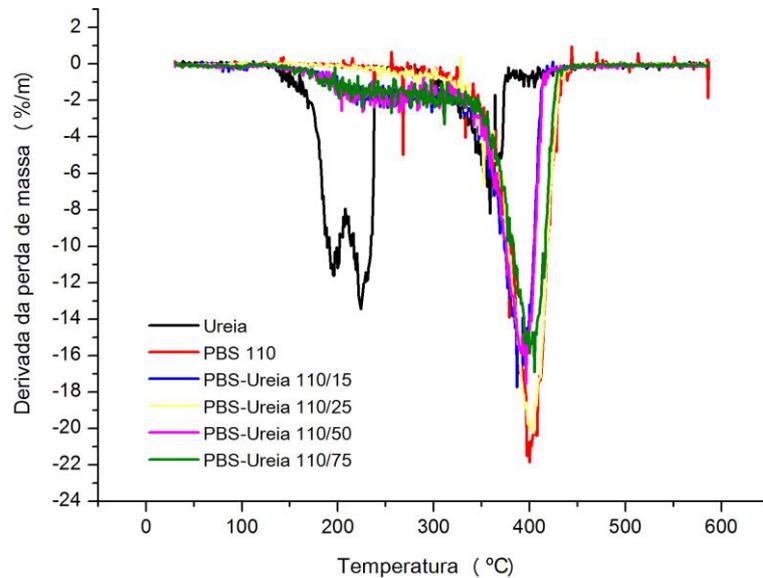


A curva termogravimétrica da ureia apresenta três estágios de perda de massa. O primeiro inicia-se a 175°C, na qual ocorre a primeira etapa de decomposição da ureia com formação de biureto. No segundo estágio, a partir de 235°C, inicia-se a decomposição do biureto. O último estágio a partir de 364°C compreende a sublimação e decomposição final dos produtos remanescentes (SCHABER et al., 2004).

A curva do PBS puro obtido após fusão a 110°C apresenta apenas um estágio de degradação iniciando em 366°C. As curvas dos compósitos PBS-Ureia 10% p/p apresentam dois estágios, sendo o primeiro relativo à presença da ureia já que as temperaturas iniciais de degradação variam de 180 a 189°C, próximas à *Tonset* da ureia pura. O segundo estágio de degradação dos compósitos é relativo à decomposição do PBS, visto que temperaturas máximas de degradação variam entre 391 e 405°C, compatíveis com a *Td* para o PBS puro.

A Figura 37 mostra as curvas derivadas da TGA para os compósitos PBS-Ureia 10% p/p assim como para o PBS puro após fusão a 110°C e para a ureia, sendo possível confirmar os resultados observados nos termogramas. Para a ureia confirma-se os três estágios de degradação da ureia, sendo os dois primeiros interligados e relacionados a decomposição do do biureto e o terceiro, relacionado à decomposição final dos derivados do biureto com *Td* igual 364°C. Para o PBS puro é possível visualizar a temperatura máxima de degradação em 398°C. Os compósitos apresentam comportamento térmico muito semelhante ao do PBS puro, vide *Td*, mas com influência da presença da ureia que acrescenta um estágio inicial de degradação nos compósitos.

Figura 37 - Derivadas da análise termogravimétrica dos compósitos PBS-Ureia 10% p/p e de seus componentes.



A Tabela 12 mostra os resultados da análise por TGA para os compósitos PBS-Ureia 10% p/p assim como de seus componentes separadamente.

Tabela 12 - Propriedades térmicas por TGA da ureia, PBS após fusão e compósitos PBS-Ureia 10% p/p.

Material	Td (°C)	Tonset (°C)	Perda de massa (%)
Ureia	224/364	175/235	99,44
PBS 110	398	366	99,19
PBS-Ureia 110/15	394	189/365	98,39
PBS-Ureia 110/25	391	182/371	99,48
PBS-Ureia 110/50	393	184/365	98,67
PBS-Ureia 110/75	405	180/373	99,46

Td = temperatura de degradação; Tonset = temperatura inicial de degradação

A temperatura de degradação pode ser usada indiretamente para inferir sobre o efeito da dose de radiação sobre a reticulação do material polimérico. Na Tabela 12, observa-se diminuição da Td para os compósitos irradiados até a dose de 50 kGy em comparação ao PBS puro após fusão. Para o compósito irradiado na dose de 75 kGy foi observado aumento da Td quando comparado ao PBS puro após fusão e também com os demais compósitos irradiados. Conforme discutido anteriormente, doses menores promovem cisão das cadeias e, portanto, materiais que degradam mais facilmente. Por outro lado, doses maiores aumentam a massa

molar média, produzindo materiais que são, no limite, reticulados e que seriam mais resistentes termicamente.

A partir dos resultados da análise por TGA dos compósitos foi possível observar a presença de ureia na matriz polimérica e os efeitos sobre as propriedades térmicas nos compostos finais. Observando-se os resultados de *Tonset* têm-se que: para a ureia é possível observar duas temperaturas iniciais de degradação, enquanto para o PBS puros após só foi registrado um valor. Para os compósitos PBS-Ureia 10% p/p, observam-se duas temperaturas iniciais de degradação, a primeira variando de 180 a 189°C referente à presença da ureia e a segunda variando de 365 a 373°C referente ao PBS.

Em relação à perda de massa, não houve variação significativa entre as matrizes em razão da presença da ureia ou exposição à radiação gama, com taxas de perda variando de 98,39 a 99,48%.

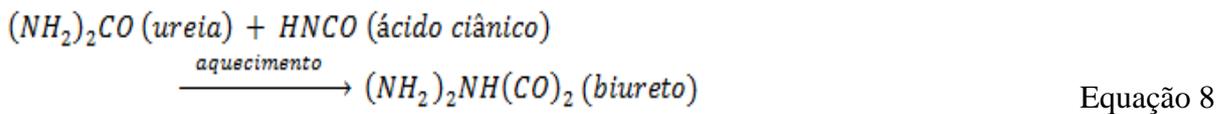
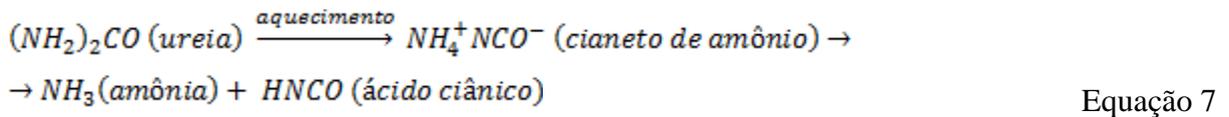
6.5.2. Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC)

As determinações de temperatura de fusão (T_m), entalpia de fusão (ΔH_f) e de degradação (ΔH_d), temperatura de degradação (T_d) e cristalinidade (X_c), calculada pela Equação 2, são mostrados na Tabela 13.

Tabela 13 - Propriedades térmicas por DSC da ureia, PBS e materiais poliméricos sob diferentes condições.

Material	T_m (°C)	ΔH_f (J/g)	X_c (%)	T_d (°C)	ΔH_d (J/g)
Ureia	135	151	-	227/360	875/83
PBS	113	81	73,24	401	841
PBS 110	110	64	58,40	399	417
PBS 110/15	109	74	67,14	379	449
PBS 110/25	109	72	65,41	403	449
PBS 110/50	108	72	65,25	397	406
PBS 110/75	108	75	67,59	402	393
PBS-Ureia 110/15	108	61	55,30	391	244
PBS-Ureia 110/25	108	61	55,04	402	270
PBS-Ureia 110/50	108	51	46,00	391	297
PBS-Ureia 110/75	108	59	53,55	402	301

A ureia apresenta T_m compatível com os dados da literatura, sendo 132°C encontrado por (CASTRO, 2014) e 133°C encontrado por (SCHABER *et al.*, 2004). Segundo este autor, a T_m é o primeiro estágio de degradação da ureia com formação de amônia e ácido ciânico (ver Equação 7) e posteriormente formação de biureto (ver Equação 8). No terceiro estágio de degradação com T_d em torno de 360°C, ocorrerão as decomposições finais dos outros produtos intermediários formados a partir do biureto (SCHABER *et al.*, 2004).



Para o PBS puro e sem processamento, ou seja, sem passar pela fusão ou irradiação, a T_m também apresenta-se equivalente aos dados citados na literatura, cerca de 113°C (YOO; IM, 1999). Já os materiais poliméricos que foram submetidos à fusão e/ou irradiação, apresentaram uma pequena redução da temperatura de fusão, passando de 113°C no PBS sem qualquer processamento para 110°C no PBS fundido e em torno de 108°C para o PBS fundido e irradiado, de acordo com a Tabela 13.

6.6. Análise de correlação

Em virtude do volume de dados obtidos nas caracterizações físico-químicas e de forma a contextualizar estatisticamente os resultados, propusemos a análise de correlação, feita no programa Statística 7, entre os resultados obtidos nas caracterizações com os parâmetros fusão a 110°C e sem fusão, dose de radiação (15, 25, 50 e 75 kGy) e presença da ureia (0 e 10%) dos materiais poliméricos estudados. Os dados de entrada para a análise de correlação encontram-se dispostos no Anexo 1 e os valores de correlação na Tabela 14.

Tabela 14 - Resultados de correlação entre respostas das caracterizações e os parâmetros de obtenção dos materiais poliméricos. Destaque para as correlações com significância estatística (valor-p < 0,05).

	Fusão	Dose	Ureia	T _m (°C)	T _d (°C) TGA	T _d (°C) DSC	ΔH _f (J/g)	ΔH _d (J/g)	X _c (%) DRX	X _c (%) DSC	Perda de massa (%)	RMSE (FTIR)
Fusão	1,00	0,41	0,27	-0,90	0,08	-0,17	-0,53	-0,96	-0,86	-0,53	0,03	0,38
Dose	0,41	1,00	0,25	-0,68	0,38	0,26	-0,25	-0,44	-0,10	-0,25	0,13	0,31
Ureia	0,27	0,25	1,00	-0,47	-0,42	-0,02	-0,85	-0,52	-0,37	-0,85	-0,44	0,96
T_m (°C)	-0,90	-0,68	-0,47	1,00	-0,13	0,06	0,56	0,92	0,65	0,56	-0,03	-0,56
T_d (°C) TGA	0,08	0,38	-0,42	-0,13	1,00	0,09	0,40	0,08	0,25	0,40	0,49	-0,26
T_d (°C) DSC	-0,17	0,26	-0,02	0,06	0,09	1,00	0,08	0,14	0,21	0,08	0,23	-0,08
ΔH_f (J/g)	-0,53	-0,25	-0,85	0,56	0,40	0,08	1,00	0,70	0,71	1,00	0,44	-0,84
ΔH_d (J/g)	-0,96	-0,44	-0,52	0,92	0,08	0,14	0,70	1,00	0,87	0,70	0,13	-0,61
X_c (%) DRX	-0,86	-0,10	-0,37	0,65	0,25	0,21	0,71	0,87	1,00	0,71	0,10	-0,41
X_c (%) DSC	-0,53	-0,25	-0,85	0,56	0,40	0,08	1,00	0,70	0,71	1,00	0,44	-0,84
Perda de massa (%)	0,03	0,13	-0,44	-0,03	0,49	0,23	0,44	0,13	0,10	0,44	1,00	-0,45
RMSE (FTIR)	0,38	0,31	0,96	-0,56	-0,26	-0,08	-0,84	-0,61	-0,41	-0,84	-0,45	1,00

Com a análise de correlação pode-se confirmar que o preparo dos materiais poliméricos por meio da fusão, acarreta diminuição da temperatura de fusão cristalina (T_m), visto que com o aquecimento seguido de resfriamento, o ordenamento inicial não foi alcançado, ou seja, ocorreu aumento de regiões amorfas que induzem mais facilmente a degradação térmica desses materiais. A diminuição da entalpia de degradação e da cristalinidade corroboram a perda de estabilidade térmica com o processo de fusão.

Para a variável dose de radiação gama aplicada nos materiais poliméricos, observa-se diminuição significativa da temperatura de fusão cristalina com o aumento da dose de radiação. Isso ocorre provavelmente devido à formação de reticulações que impedem o ordenamento das cadeias.

Como discutido anteriormente neste trabalho, a radiação eletromagnética pode atuar sobre sistemas poliméricos provocando rompimento de ligações covalentes e alterações físicas que acarretam perda de massa molar (diminuição do tamanho da cadeia) e fragilização do material (CROONENBORGHS, SMITH E STRAIN (2007) citado por COSTA, 2017).

Tais alterações poderiam explicar a perda de estabilidade térmica dos materiais poliméricos em estudo.

A presença de ureia diminuiu significativamente a entalpia de formação e a cristalinidade das matrizes poliméricas, com valores de correlação de -0,85 para ambas as variáveis. Para o estudo de erro médio quadrático das análises de FTIR, observou-se fortíssima correlação de 0,96 dada pela presença da ureia.

As fortes correlações da ureia com essas variáveis, permitem-nos afirmar que houve modificação da estrutura do PBS pela inserção da ureia entre as cadeias a partir da fusão e irradiação da mistura, já que os valores de entalpia de formação e cristalinidade foram reduzidas com a entrada da substância nitrogenada.

6.7. Cinética de liberação de ureia

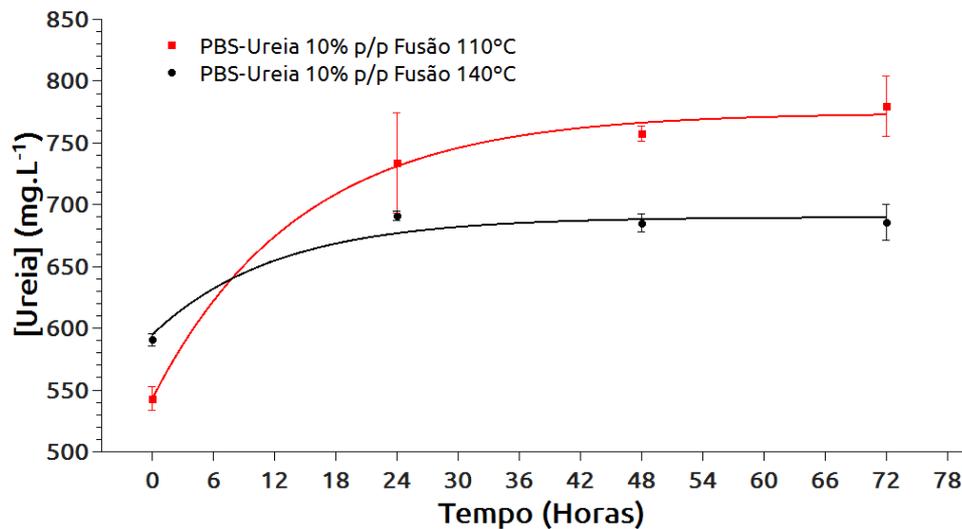
Os tópicos a seguir mostram os resultados e discussão dos perfis de liberação de ureia das matrizes obtidas primeiramente por fusão e posteriormente submetidas à radiação gama. Ambos os processos foram escolhidos como forma de promover a imobilização da ureia no polímero.

6.7.1. Compósitos PBS-Ureia 10% p/p – Primeira etapa: fusão

Neste tópico serão expressos os resultados preliminares da cinética de liberação de ureia das matrizes poliméricas contendo ureia 10% p/p obtidas após fusão nas temperaturas de 110 e 140°C. Com esses resultados foi possível avaliar o grau de imobilização e a liberação gradual do nutriente para a escolha da temperatura de fusão que melhor produza matrizes poliméricas de liberação gradual de ureia.

A Figura 38 mostra o perfil de liberação de ureia no período de 72 horas de ensaio para as matrizes poliméricas contendo ureia imobilizada 10% p/p obtidas por fusão a 110°C e 140°C.

Figura 38 - Perfil de liberação de ureia das matrizes poliméricas obtidas por fusão a 110 e 140°C.



Para os compósitos PBS-Ureia 10% p/p obtidos por fusão a 110°C, a concentração teórica inicial de ureia foi calculada em 748 mg.L⁻¹ e as dosagens subsequentes obtidas por espectrofotometria a 600 nm foram de 543±10 em 0 hora; 734±40 em 24 horas; 757±6 em 48 horas e; 779±24 mg.L⁻¹ em 72 horas. A liberação inicial de ureia parece ter sido retardada pela fusão já que temos um percentual de 73% do nutriente em solução na dosagem inicial de 0 hora. Na dosagem de 24 horas, o teor de ureia em solução chegou a 98% indicando liberação total do nutriente da matriz polimérica.

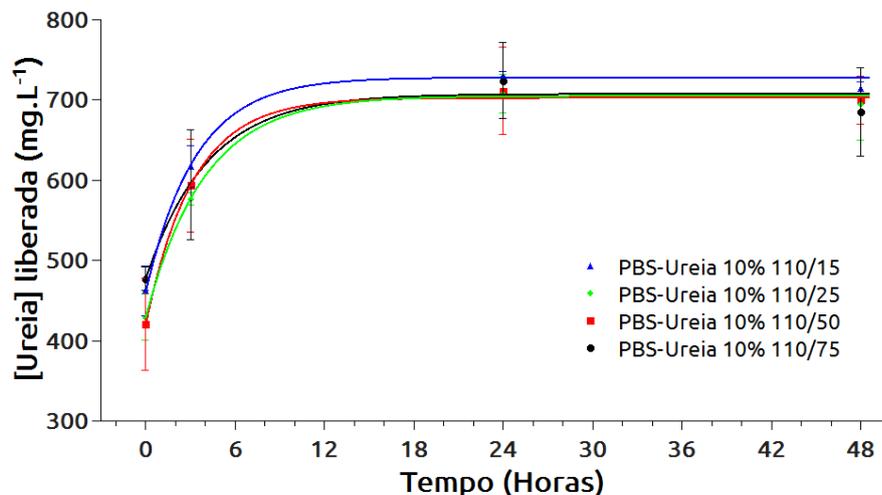
Para os compósitos PBS-Ureia 10% p/p obtidas por fusão a 140°C, a concentração teórica inicial de ureia foi calculada em 748 mg.L⁻¹ e dosagens subsequentes de 591±5 em 0 hora; 691±4 em 24 horas; 685±7 em 48 horas e; 686±15 mg.L⁻¹ em 72 horas. Nesta matriz, a liberação inicial de ureia também parece ter sido retardada pelo processo de fusão, pois o percentual do nutriente em solução foi de 79% na dosagem inicial de 0 hora. Nas dosagens subsequentes de 24, 48 e 72 horas, o teor de ureia em solução foi de no máximo 92%, sugerindo haver mais ureia a ser liberada. Entretanto, a fusão a 140°C, ou seja, acima da temperatura de fusão da ureia, pode ter degradado parte do nutriente imobilizado já que os teores de ureia permaneceram constantes após 24 horas. Outro forte indício de perda de ureia por degradação térmica a 140° C foi o odor amoniacal durante a fusão. Sendo assim, os percentuais de liberação para a matriz obtida a 140°C podem estar subestimados levando-se em consideração que a concentração inicial de ureia nos sistemas devem ser menores que 748 mg.L⁻¹ devido à perdas de ureia por volatilização.

Os resultados da cinética de liberação de ureia confirmam a análise morfológica superficial das matrizes pela técnica de MEV, que previu diferenças quanto à solubilização da ureia, como no caso da matriz obtida por fusão a 140°C, que demonstrou morfológicamente que o composto nitrogenado seria mais facilmente liberado em virtude da maior exposição dos cristais formados durante a recristalização.

6.7.2. Compósitos PBS-Ureia 10% p/p – Segunda etapa: irradiação

Objetivando melhorar a liberação gradual de ureia na matriz polimérica obtida por fusão a 110°C, essa matriz foi particionada em porções e submetidas às doses de 15, 25, 50 e 75 kGy de radiação gama. O perfil de liberação de ureia das matrizes PBS-Ureia 10% p/p irradiadas é mostrado na Figura 39.

Figura 39 - Perfil de liberação de ureia das matrizes poliméricas obtidas por fusão a 110°C e submetidas à diferentes doses de radiação gama.



Os comportamentos cinéticos de liberação para as matrizes irradiadas são bastante similares, sendo possível observar uma liberação rápida num curto intervalo de tempo (0 a 3h), com pequenas variações nas faixas de concentração e nas dosagens iniciais como descrito a seguir:

1. PBS-Ureia 110/15 - concentração teórica inicial de ureia de 757 mg.L⁻¹ e dosagens subsequentes de 462±43 em 0 hora (61% de liberação); 616±36 em 3 horas (82%); 731±6 em 24 horas (97%) e; 715±11 mg.L⁻¹ em 48 horas (94%). Em relação à matriz processada apenas por fusão a 110°C, a liberação de ureia desta matriz após fusão e irradiação a 15 kGy foi retardada em cerca de 12%;

2. PBS-Ureia 110/25 - concentração teórica inicial de ureia de 752 mg.L⁻¹ e dosagens subsequentes de 429±40 em 0 hora (57% de liberação); 577±11 em 3 horas (77%); 708±33 em 24 horas (94%) e; 695±63 mg.L⁻¹ em 48 horas (92%). Em relação à matriz processada apenas por fusão a 110°C, a liberação de ureia desta matriz após fusão e irradiação a 25 kGy foi retardada em cerca de 16%;

3. PBS-Ureia 110/50 - concentração teórica inicial de ureia de 755 mg.L⁻¹ e dosagens subsequentes de 421±80 em 0 hora (56% de liberação); 594±81 em 3 horas (79%); 711±75 em 24 horas (94%) e; 700±42 mg.L⁻¹ em 48 horas (93%). Em relação à matriz processada apenas por fusão a 110°C, a liberação de ureia desta matriz após fusão e irradiação a 50 kGy foi retardada em cerca de 17% e;

4. PBS-Ureia 110/75 - concentração teórica inicial de ureia de 758 mg.L⁻¹ e dosagens subsequentes de 477±20 em 0 hora (63% de liberação); 594±95 em 3 horas (78%); 724±65,7 em 24 horas (96%) e; 685±77 mg.L⁻¹ em 48 horas (90%). Em relação à matriz processada apenas por fusão a 110°C, a liberação de ureia desta matriz após fusão e irradiação a 75 kGy foi retardada em cerca de 10%.

6.7.2.1. Análise exploratória dos dados de cinética de liberação

Como forma de melhor compreender os resultados de cinética de liberação obtidos, aplicamos uma regressão exponencial e a partir da função descrita na Equação 9, definimos as variáveis mostradas na Tabela 15.

$$[\text{Ureia em solução (mg.L}^{-1}\text{)}] = y_{\text{máx.}} + A * \exp \frac{-x}{\tau} \quad \text{Equação 9}$$

onde, **y máx.** representa a concentração máxima de ureia alcançada; **A** a amplitude da curva exponencial; **exp** representa o coeficiente exponencial para a variação de concentração de ureia; **x** o tempo e; **τ (e-folding time)** a variação do tempo em relação ao coeficiente exponencial.

Tabela 15 – Dados de correlação e constantes da função exponencial aplicada ao teste de liberação de ureia.

Matriz PBS-Ureia 10%	Y máx.	A	τ	R²
Fusão 110°C	774,48±1,0	231,12±1,5	1,43±3,1	0,9964
Fusão 110°C / 15 kGy	728,27±6,8	267,09±5,8	3,36±1,9	0,9953
Fusão 110°C / 25 kGy	705,34±5,6	276,03±9,3	3,92±2,0	0,9990
Fusão 110°C / 50 kGy	702,86±4,8	282,27±1,2	3,16±3,6	0,9986
Fusão 110°C / 75 kGy	707,78±2,0	230,52±2,1	4,14±2,0	0,9972

Os valores de y máx. menores representam liberações finais menores, ou seja, há uma tendência em diminuir a liberação à medida que aumenta a dose de radiação. A variação da amplitude (A) produz um aumento muito pequeno no tempo inicial da liberação, desprezível no presente caso. O valor de *e-folding time* representa um processo de liberação mais lento, condizente com a maior massa molar esperada para as amostras submetidas às maiores doses de radiação.

6.8. Ensaio de Bioestímulo

Neste tópico são apresentados os resultados de crescimento bacteriano do ensaio de bioestímulo de *Pseudomonas aeruginosa* usando como fonte de nitrogênio as matrizes poliméricas PBS/Ureia 10% p/p em sistemas aquáticos artificiais, ou seja, sistemas aquosos com sais minerais e agitação que simulam um sistema aquático natural. A fonte de carbono dos sistemas foi obtida da glicose 0,2% p/v.

Como forma de observar a efetividade do ensaio de bioestímulo, fizemos paralelamente sistemas-controle com ureia livre como fonte de nitrogênio e glicose 0,2% p/v como fonte de carbono.

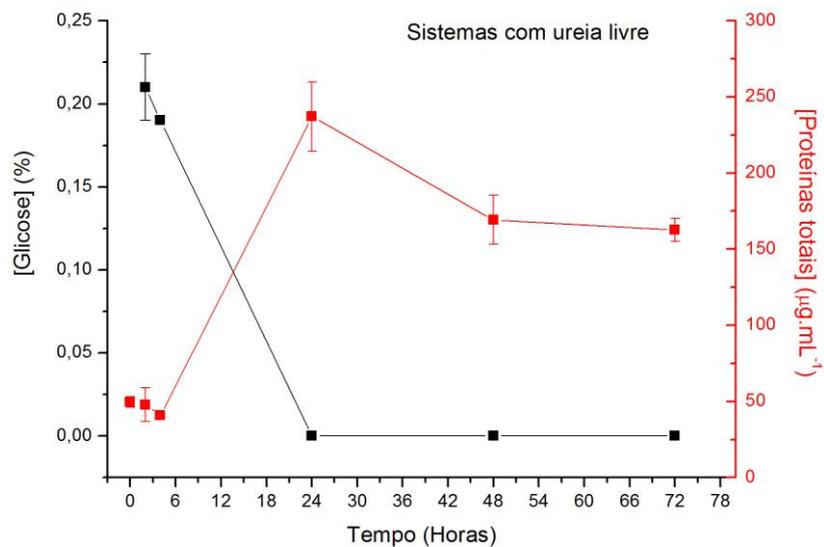
O crescimento bacteriano foi medido pela dosagem de proteínas decorrente da hidrólise alcalina à quente das células bacterianas vivas. Quantificações de ureia e glicose também foram feitas para avaliar o consumo dessas fontes de nutrientes ao longo do ensaio.

Crescimento bacteriano deve ser entendido como aumento do número de células e não necessariamente aumento de tamanho celular. Se as necessidades nutricionais para o crescimento assim como as condições ambientais (temperatura, oxigenação, pH) forem atendidas, as populações microbianas podem aumentar de tamanho em um curto intervalo de tempo formando colônias, ou seja, grupos de milhares de células visíveis sem auxílio de microscópio (TORTORA; FUNKE; CASE, 2012).

6.8.1 Crescimento bacteriano em sistemas com ureia livre

Na Figura 40 é mostrada a evolução do crescimento bacteriano e o consumo médio de glicose no intervalo de 72 horas em sistemas aquáticos artificiais cuja fonte de nitrogênio foi a ureia livre. O inóculo bacteriano inicial adicionado aos sistemas correspondeu a $50 \pm 5 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de proteínas totais e a concentração inicial de glicose foi de 0,2% p/v.

Figura 40 - Crescimento médio bacteriano com ureia livre como fonte de nitrogênio.



Nos sistemas com ureia livre é possível observar que a concentração média de proteínas totais nas primeiras quatro horas de ensaio variou em torno da concentração inicial de proteínas adicionadas ao meio, ou seja, não houve crescimento bacteriano detectável, apenas adaptação dos microrganismos ao novo meio de crescimento. Em 4 horas a concentração média de proteínas totais detectada foi de $41 \pm 1 \mu\text{g.mL}^{-1}$, passando para $237 \pm 32 \mu\text{g.mL}^{-1}$ em 24 horas; $169 \pm 22 \mu\text{g.mL}^{-1}$ em 48 horas e; $163 \pm 10 \mu\text{g.mL}^{-1}$ em 72 horas. Houve crescimento bacteriano acentuado em 24 horas equivalente ao consumo total de glicose no mesmo período. Após 24 horas é possível observar declínio da população bacteriana justificada pela falta de glicose no meio.

Objetivando verificar diferenças significativas entre as respostas médias para cada intervalo de tempo analisado, utilizou-se a análise de variância (ANOVA) calculada pelo programa Statistica 7. Os resultados mostraram diferenças significativas ($p < 0,0001$) entre as concentrações médias dos intervalos estudados conforme Tabela 16.

Tabela 16 - Resultados da análise de variância para os sistemas controle (Ureia livre).

Efeito	SS	Grau de liberdade	MS	F	P
<i>Intercept</i>	248293,9	1	248293,9	1657,3	0,000000
Tempo (Horas)	107750,4	5	21550,1	143,8	0,000000
Erro	1947,7	13	149,8		

Para verificarmos entre quais intervalos de análise as concentrações médias são significativamente diferentes, aplicamos o teste de Tukey para comparações múltiplas das médias (OGLIARI; PACHECO, 2011). Os resultados são mostrados na Tabela 17.

Tabela 17 - Resultados do teste de Tukey para os sistemas controle (Ureia livre).

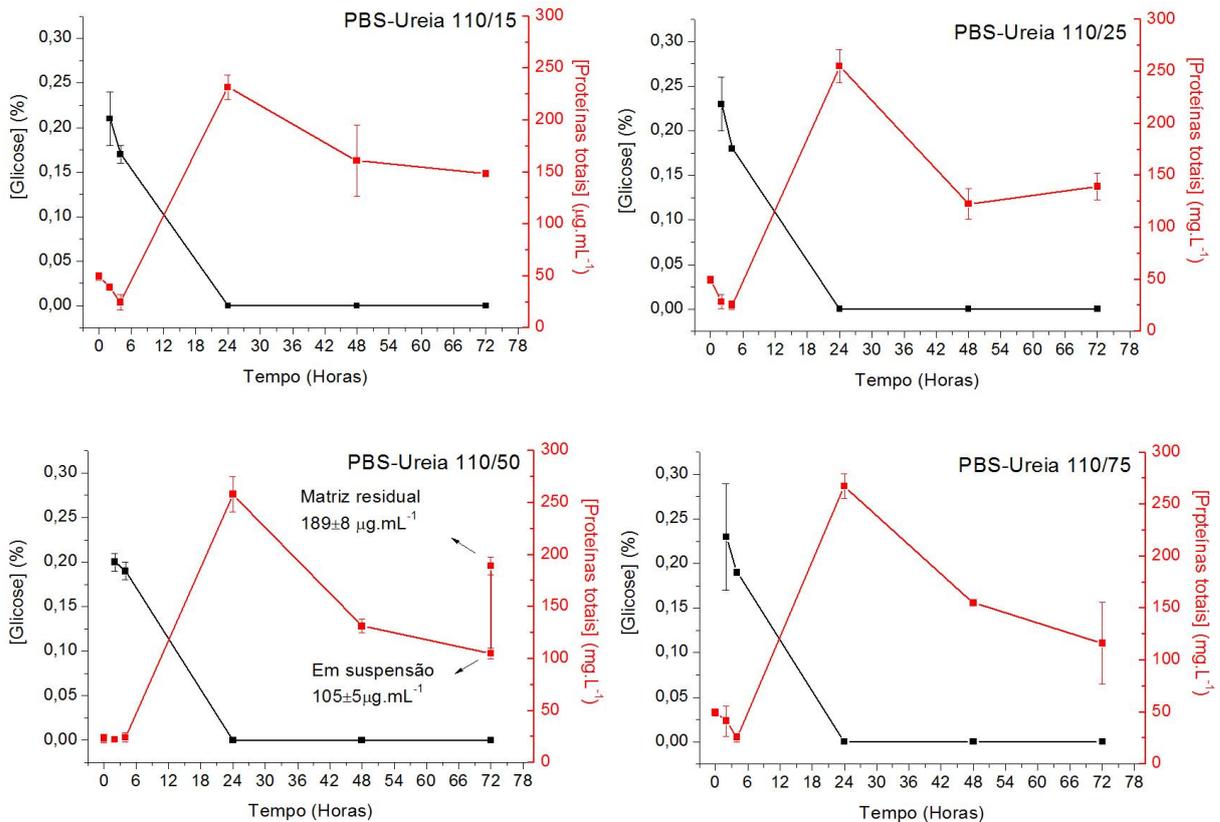
Grupo Tukey	Intervalo de análise (Horas)	[Média Proteínas Totais]
a	4	41,0
a	2	47,7
a	0	49,5
b	72	162,7
b	48	169,3
c	24	237,3

A partir do teste de Tukey, para os resultados de crescimento bacteriano nos sistemas com ureia livre (sistemas controle), é possível concluir que não houve crescimento significativo nas primeiras 4 horas já que as médias das concentrações de proteínas são estatisticamente iguais. No intervalo de 4 a 24 horas é possível observar o crescimento exponencial, com a média da concentração de proteínas totais significativamente maior que as dos intervalos anteriores (0 a 4 horas) e posteriores (24 a 72 horas).

6.8.2. Crescimento bacteriano em sistemas com ureia imobilizada em PBS

Os gráficos da Figura 41 mostram os resultados da quantificação de proteínas e glicose nos sistemas cujas fontes de nitrogênio foram compósitos PBS-Ureia 10% p/p obtidos por fusão a 110°C e irradiação nas doses de 15, 25, 50 e 75 kGy de raios gama.

Figura 41 – Crescimento médio bacteriano e consumo médio de glicose em sistemas com ureia imobilizada.



Nos sistemas com ureia imobilizada em PBS observamos os seguintes resultados:

1. PBS-Ureia 110/15 – a dosagem inicial de proteínas passou de $50 \pm 5 \mu\text{g.mL}^{-1}$ para 39 ± 1 em 2 horas; para 25 ± 11 em 4 horas; 232 ± 16 em 24 horas; 161 ± 47 em 48 horas e; 148 ± 10 em 72 horas. Consumo total de glicose em 24 horas;
2. PBS-Ureia 110/25 – a dosagem inicial de proteínas passou de $50 \pm 5 \mu\text{g.mL}^{-1}$ para 28 ± 0 em 2 horas; para 25 ± 0 em 4 horas; 255 ± 0 em 24 horas; 123 ± 0 em 48 horas e; 139 ± 0 em 72 horas. Consumo total de glicose em 24 horas;
3. PBS-Ureia 110/50 – a dosagem inicial de proteínas passou de $23 \pm 6 \mu\text{g.mL}^{-1}$ para 22 ± 1 em 2 horas; para 24 ± 0 em 4 horas; chegando a 258 ± 24 em 24 horas; 131 ± 9 em 48 horas e; 105 ± 7 em 72 horas. Consumo total de glicose em 24 horas e;
4. PBS-Ureia 110/75 – a dosagem inicial de proteínas passou de $50 \pm 5 \mu\text{g.mL}^{-1}$ para 41 ± 20 em 2 horas; para 25 ± 6 em 4 horas; 268 ± 16 em 24 horas; 155 ± 3 em 48 horas e; 116 ± 55 em 72 horas. Consumo total de glicose em 24 horas.

Os sistemas com ureia imobilizada mostraram médias de crescimento bacteriano e consumo de glicose muito semelhantes aos dos sistemas com ureia livre, tendo o máximo de crescimento em 24 horas e consumo total da glicose disponível no mesmo período. Isto é, o

crescimento bacteriano tanto nos sistemas com ureia livre quanto nos sistemas com ureia imobilizada foi limitado pela quantidade de glicose no meio após 24 horas. Nos intervalos subsequentes de 48 e 72 horas a concentração de proteínas diminuiu em todos os sistemas, indicando decaimento da população bacteriana viva em função da falta de glicose disponível.

Assim como no sistema com ureia livre, as análises estatísticas para os sistemas com ureia imobilizada mostraram diferenças significativas ($p < 0,0001$) entre as médias das concentrações para cada intervalo de análise, sendo estatisticamente iguais entre 0, 2 e 4 horas e entre 48 e 72 horas. A média da concentração de proteínas totais no intervalo de 24 horas mostrou-se significativamente diferente dos demais intervalos.

Ressaltamos que, as concentrações de proteínas medidas e apresentadas graficamente para cada sistema com ureia imobilizada, referem-se à quantidade de proteínas na fase aquosa e não no sistema como um todo, que inclui a fase sólida que são as matrizes poliméricas. Sendo assim, a quantidade de bactérias nos sistemas com ureia imobilizada em PBS poderia ser maior do que o registrado apenas na fase aquosa, já que bactérias formadoras de biofilme se reproduzem geralmente em superfícies (TORTORA; FUNKE; CASE, 2012), como a *Pseudomonas aeruginosa*, que poderia utilizar-se da matriz polimérica como suporte para seu desenvolvimento.

Verificamos isso ao quantificar proteínas tanto na fase aquosa quanto na matriz residual dos sistemas com matriz PBS-Ureia 10% p/p 110/50 ao final das 72 horas do ensaio. A dosagem de proteínas para a fase aquosa foi de $105 \pm 5 \mu\text{g.mL}^{-1}$ enquanto na matriz residual encontramos $189 \pm 8 \mu\text{g.mL}^{-1}$, ou seja, o dobro de microrganismos presentes na fase aquosa. Segundo MADIGAN (2015), essa propensão de crescimento e proliferação de microrganismos na forma de biofilmes serão quase sempre mais diversos e abundantes em superfícies submersas, em ambientes naturais, do que no meio líquido que as circundam.

Com os resultados de bioestímulo com ureia imobilizada em PBS podemos fazer as seguintes considerações:

- Os sistemas com ureia imobilizada proporcionaram as mesmas condições para o desenvolvimento de *Pseudomonas aeruginosa* que os sistemas controle com ureia livre, indicando que a presença do polímero ou as formas de imobilização usadas para controlar a liberação do nutriente não influenciaram o crescimento bacteriano no intervalo de tempo estudado;

- Levando-se em consideração que a concentração de proteínas presentes na fase sólida dos sistemas com ureia imobilizada foi maior do que na fase suspensa (aquosa),

podemos deduzir que as bactérias possivelmente conseguiram se estabelecer sobre a matriz, usando-a como suporte para a formação de biofilme.

6.8.3. Análise do crescimento bacteriano

No crescimento microbiano são observadas três fases características: (i) Fase 1, conhecida como fase “lag” ou de latência, tem início logo após a inoculação do meio. É um período de adaptação onde as células sintetizam enzimas necessárias ao metabolismo dos componentes presentes no meio e não há reprodução celular; (ii) Fase 2 é a fase de transição na qual inicia-se a reprodução microbiana, entretanto nem todos os indivíduos completaram a fase anterior e por isso a velocidade específica de crescimento (μ_m) não é constante; (iii) Fase 3, denominada logarítmica ou exponencial, na qual μ_m é constante e máxima, sendo μ_m diretamente proporcional à concentração celular; (iv) Fase 4 é a fase linear de crescimento na qual surgem limitações no transporte de nutrientes para o interior das células e μ_m não é constante; (v) Fase 5 é a fase de desaceleração do crescimento pelo esgotamento de um ou mais nutrientes do sistema; (vi) Fase 6 é a fase estacionária, onde há um balanço entre as velocidades de crescimento e morte dos microrganismos e; (vii) Fase 7 é a de morte dos microrganismos com redução da concentração celular (SCHMIDELL et al., 2001).

Dessa forma, a partir dos resultados de crescimento bacteriano com ureia livre e ureia imobilizada, foi possível determinar a velocidade específica de crescimento (μ_m) por regressão linear no período de 4 a 24 horas, onde observa-se aumento exponencial de proteínas até o valor máximo. Nessa fase também foi possível calcular o tempo de geração (t_g) (ver Equação 12) que é o intervalo de tempo necessário para dobrar o valor da concentração celular. (SCHMIDELL et al., 2001). Os resultados são mostrados na Tabela 16.

$$\mu_m = \frac{\ln 2}{t_g}$$

Equação 12

Tabela 18 - Velocidade específica de crescimento (μ_m) e tempo de geração (t_g) para *Pseudomonas aeruginosa* em sistemas com ureia livre e ureia imobilizada.

	μ_m (h ⁻¹)	t_g (h)
Ureia livre	0,08783	8h30minutos
PBS-Ureia 10% 110°C / 15 kGy	0,11201	6h20minutos
PBS-Ureia 10% 110°C / 25 kGy	0,11597	6h40minutos
PBS-Ureia 10% 110°C / 50 kGy	0,11825	6h30minutos
PBS-Ureia 10% 110°C / 75 kGy	0,11754	6h30minutos

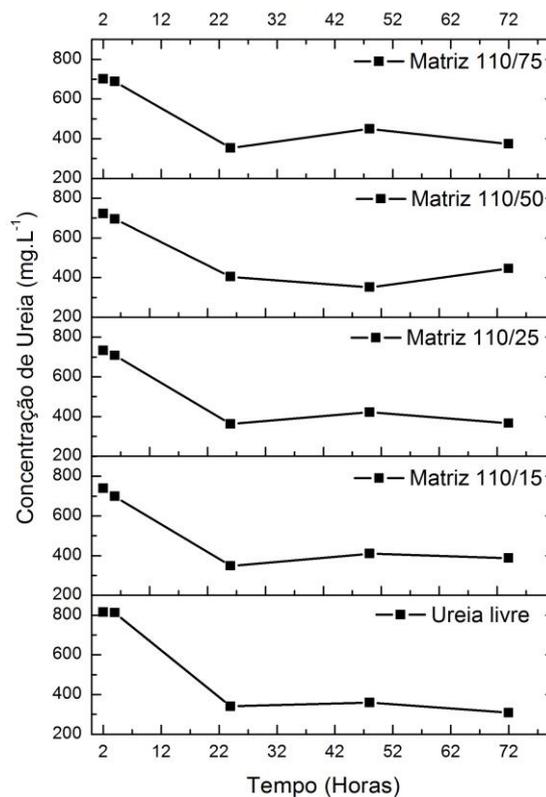
Com os resultados mostrados na Tabela 16 foi possível verificar que os valores de μ_m são praticamente iguais entre as matrizes poliméricas, mas com um aumento de cerca de 20% em relação ao sistema com ureia livre. Já os valores de t_g mostram que nos sistemas com ureia imobilizada, o intervalo de tempo necessário para que as bactérias dupliquem sua população foi menor do que nos sistemas com ureia livre. As justificativas propostas são:

- a maior concentração inicial de ureia nos sistemas com ureia livre podem ter provocado inibição no crescimento pelo acúmulo de metabólitos que interferem negativamente sobre o metabolismo e crescimento celular;
- nos sistemas com ureia imobilizada, as matrizes poliméricas podem exercer papel de suporte para os microrganismos e com isso as células podem ficar aderidas na superfície das matrizes e não serem devidamente quantificadas, subestimando os valores de crescimento bacteriano e de t_g .

6.8.3. Quantificação de ureia remanescente em solução

A Figura 42 mostra os perfis da concentração de ureia e remanescentes nos sistemas com ureia livre e ureia imobilizada em PBS durante o ensaio de bioestímulo.

Figura 42 - Quantificação de ureia remanescente em solução durante ensaio de bioestímulo.



Nos sistemas com ureia livre, houve consumo acentuado de ureia no intervalo entre 2 a 24 horas e o percentual de ureia remanescente em solução variou de 40 a 41% em 72 horas.

Os sistemas com ureia imobilizada apresentaram perfil semelhante ao do sistema com ureia livre, com consumo do composto nitrogenado nas primeiras 24 horas e os percentuais remanescentes nos sistemas como descritos a seguir:

1. PBS-Ureia 10% p/p fusão 110°C/15 kGy – 50 a 53% em 72 horas;
2. PBS-Ureia 10% p/p fusão 110°C/25 kGy – 45 a 52% em 72 horas;
3. PBS-Ureia 10% p/p fusão 110°C/50 kGy – 55 a 60% em 72 horas e;
4. PBS-Ureia 10% p/p fusão 110°C/75 kGy – 46 a 53% em 72 horas.

O perfil de concentração de ureia remanescente nos sistemas usados na bioestimulação de *Pseudomonas aeruginosa* mostra que o consumo do nutriente não foi total ao final de 72 horas, restando ainda cerca de 50% da concentração inicial. O consumo máximo foi alcançado no intervalo de 24 horas, coincidindo com o limite máximo de crescimento bacteriano para todos os sistemas estudados.

6.8.3.3. Análise de correlação do efeito das doses de radiação gama sobre o crescimento bacteriano e o consumo de ureia

Os resultados dos ensaios de bioestimulação com compósitos PBS-Ureia 10% w/w obtidas por fusão a 110°C e diferentes doses de radiação gama, foram plotados em uma matriz de correlação, através do programa Statistica 7, com os dados de entrada mostrados na Tabela 17 e os resultados de correlação mostrados na Tabela 18.

Tabela 19 - Dados de entrada para matriz de correlação dos resultados de bioestimulação *versus* doses de radiação.

Dose de radiação (kGy)	Ureia consumida em 72h (%)	Concentração de proteínas totais em 24h ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)
15	51,1	231,75
25	48,4	255,08
50	57,8	258,14
75	49,2	267,58

Tabela 20 - Matriz de correlação dos efeitos da dose de radiação sobre as variáveis representativas dos resultados de bioestimulação com matrizes poliméricas.

	Dose de radiação gama	Ureia consumida em 72h (%)	Concentração de proteínas totais em 24h ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)
Dose de radiação gama	1,00	0,11	0,86

Os resultados de correlação mostram que o aumento de radiação gama sobre as matrizes poliméricas com ureia 10% p/p, não provocou nenhum efeito significativo (valor $p < 0,05$) sobre o consumo de ureia ao final do ensaio de bioestimulação, tampouco sobre o crescimento bacteriano máximo ocorrido em 24 horas.

6.9. Ensaio de Biodegradação

6.9.1. Avaliação da concentração de Hidrocarbonetos: Totais de Petróleo

As análises de biodegradação de óleo foram executadas com o objetivo de avaliar uma possível degradação de hidrocarbonetos do óleo combustível MF 380 por uma colônia de *Pseudomonas aeruginosa* usando as matrizes PBS-Ureia 10% p/p preparadas por fusão à 110°C e irradiadas com diferentes doses de radiação gama como fontes de nitrogênio nos sistemas propostos. O óleo adicionado serviu como fonte de carbono enquanto outros nutrientes necessários ao metabolismo bacteriano, como fósforo, potássio, etc., estavam presentes no meio mineral modificado usado nos ensaios (Ver Tabela 4; item 5.5.3).

Paralelamente aos sistemas com matrizes PBS-Ureia 10% p/p foram montados sistemas como descritos a seguir:

1. Atenuação natural ou Controle negativo – sistemas com óleo, sem adição de fontes de nitrogênio ou microrganismos. Esses sistemas foram propostos para avaliar os efeitos de outras formas de degradação do óleo como os mecanismos físicos e/ou químicos e/ou biológicos naturais;

2. Ureia livre ou Controle positivo 1 – sistemas com adição de ureia livre ao meio com óleo, sem adição de microrganismos. Esses sistemas foram propostos para avaliar a bioestimulação da microbiota pré-existente no óleo e com isso a degradação dos hidrocarbonetos por esses microrganismos endógenos;

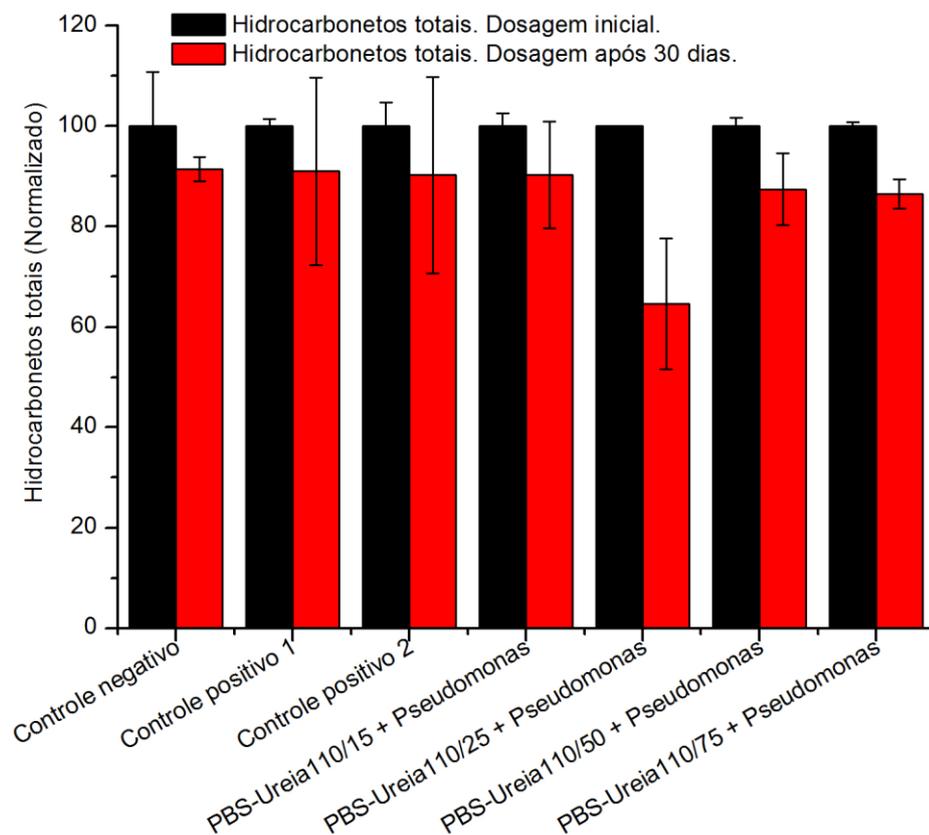
3. Ureia livre + *Pseudomonas* ou Controle positivo 2 – sistemas-controle com ureia livre como fonte de nitrogênio adicionada ao meio com óleo e inoculação de *Pseudomonas aeruginosa*. Esse sistema foi proposto para avaliar a funcionalidade do ensaio;

4. Compósitos PBS-Ureia 10% p/p obtidos por fusão a 110°C e submetidos às doses de 15, 25, 50 75 kGy de radiação gama – sistemas com ureia imobilizada em PBS adicionada ao meio com óleo e inoculação de *Pseudomonas aeruginosa*.

Todos os sistemas foram mantidos sob as mesmas condições de oxigenação, agitação de 150 rpm e temperatura de aproximadamente 30°C por um período de 30 dias ininterruptos. Ao final desse tempo foram feitas quantificações de hidrocarbonetos totais, crescimento bacteriano e ureia remanescente nos sistemas.

A Figura 43 mostra os resultados da concentração média normalizada (1 a 100) de hidrocarbonetos totais nos sistemas propostos para a avaliação de biodegradação do óleo combustível.

Figura 43 – Valor médio de hidrocarbonetos totais nos sistemas aquáticos artificiais propostos para avaliar a biodegradação de óleo.



Nos sistemas de controle negativo ou atenuação natural tivemos 89 a 94% de hidrocarbonetos presentes ao final de 30 dias. Nos sistemas com bioestimulação da biota pré-existente no óleo pela adição de ureia livre (controle positivo 1) 72 a 100% de hidrocarbonetos foi detectado ao final do processo. Nos sistemas com adição de ureia livre e *Pseudomonas aeruginosa* (controle positivo 2) de 71 a 100% de hidrocarbonetos ainda foi detectado no tempo final. Para esses três sistemas, os percentuais de recuperação de hidrocarbonetos ficaram próximos sugerindo que não houve diferença na perda ou degradação de óleo para as condições propostas. Entretanto, os desvios mais acentuados para as concentrações de hidrocarbonetos após 30 dias nos sistemas com ureia livre, sugerem que outros mecanismos além daqueles presentes nos sistemas com atenuação natural, possam estar influenciando a presença de hidrocarbonetos.

Para os sistemas com matrizes poliméricas PBS-Ureia 10% p/p pode-se detectar:

1. PBS-Ureia 110°C/15kGy – de 84 a 100% de hidrocarbonetos;
2. PBS-Ureia 110°C/25kGy – de 54 a 79% de hidrocarbonetos;
3. PBS-Ureia 110°C/50kGy – de 80 a 95% de hidrocarbonetos e;
4. PBS-Ureia 110°C/75kGy – de 84 a 89% de hidrocarbonetos.

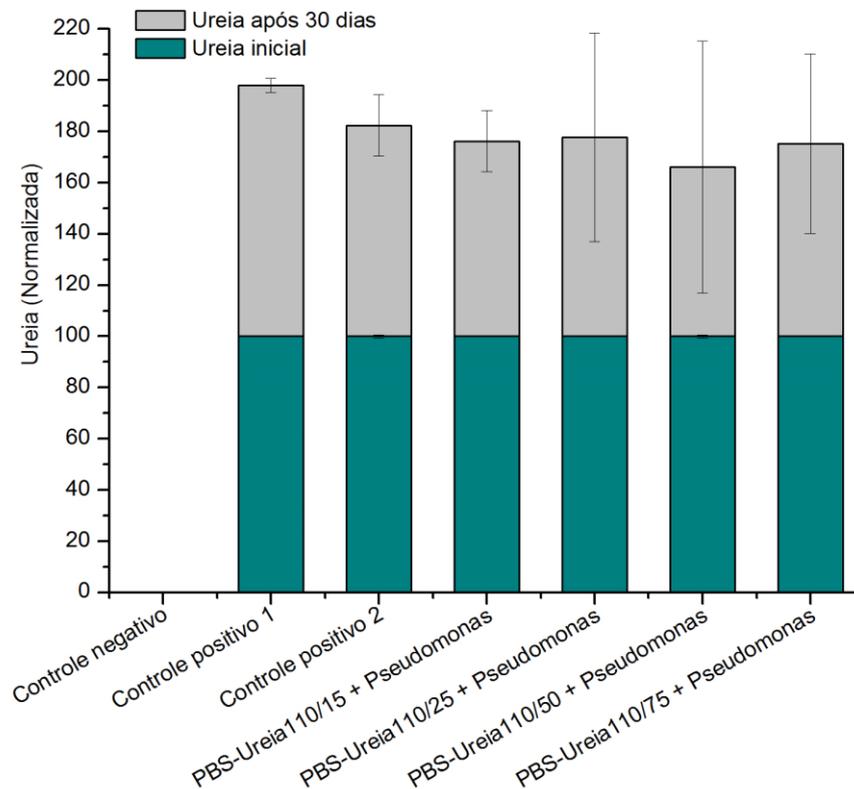
Apesar da presença de microrganismos nos sistemas, as quantificações de hidrocarbonetos presentes ao final do processo foram altas, indicando não ter havido degradação ou biodegradação de hidrocarbonetos no intervalo de tempo experimentado. Algumas suposições podem ser levantadas: (i) devido à complexidade dos hidrocarbonetos presentes no óleo combustível, seja necessário aumentar o tempo de análise para que os microrganismos produzam enzimas específicas de degradação; (ii) a inoculação de apenas uma espécie pode limitar a biodegradação, já que, devido à complexidade dos compostos do petróleo, as espécies degradadoras de hidrocarbonetos especializaram-se em determinados compostos. Sendo assim, o uso de culturas mistas ou consórcios microbianos deva influenciar em maior degradação microbiológica do poluente; (iii) o crescimento microbiano por meio da formação de biofilmes em superfícies, apresenta grandes vantagens como formação de micro habitats favoráveis, facilidade de troca de informações genéticas e mecanismos de defesa tais como resistência à penetração de moléculas tóxicas ou demais compostos. Dessa forma, a formação de biofilmes pela cultura de *Pseudomonas aeruginosa*, pode ter dificultado a interação do óleo com as unidades celulares, devido à baixa migração do poluente para o interior do biofilme, retardando o processo de biodegradação. Outro aspecto a ser considerado é o recobrimento das matrizes poliméricas pelo óleo que pode ter dificultado a captação de

oxigênio e nutrientes por parte dos microrganismos aderidos na superfície. Merece destaque a matriz polimérica obtida com dose de 25 kGy cuja aplicação nos ensaios de biodegradação mostrou menor presença de hidrocarbonetos totais em suspensão após 30 dias.

6.9.2. Avaliação de ureia remanescente em solução

A Figura 44 mostra os resultados das dosagens iniciais e finais de ureia em solução nos sistemas experimentais propostos para biodegradação de óleo combustível.

Figura 44 - Consumo médio de ureia nos sistemas propostos para biodegradação de óleo.



Nos sistemas de controle negativo ou atenuação natural não houve adição de ureia e por isso a quantificação do nutriente é nula.

Sistemas com ureia livre e sem inoculação de microrganismos (controle positivo 1) o consumo de ureia variou de 0 a 5%. Esses valores são condizentes com a condição em análise, pois não houve adição de microrganismos ao meio que pudessem consumir de forma significativa esse nutriente, mas parte dessa uréia poderia ter sido consumida pela biota presente no óleo adicionado que não foi esterilizado.

Para os sistemas com ureia livre e inoculação de *Pseudomonas aeruginosa* (controle positivo 2) o consumo de ureia variou de 6 a 30%. Nessa condição, a adição de microrganismos no sistema pode ter contribuído para o consumo de ureia do meio.

Para os sistemas com ureia imobilizada tivemos:

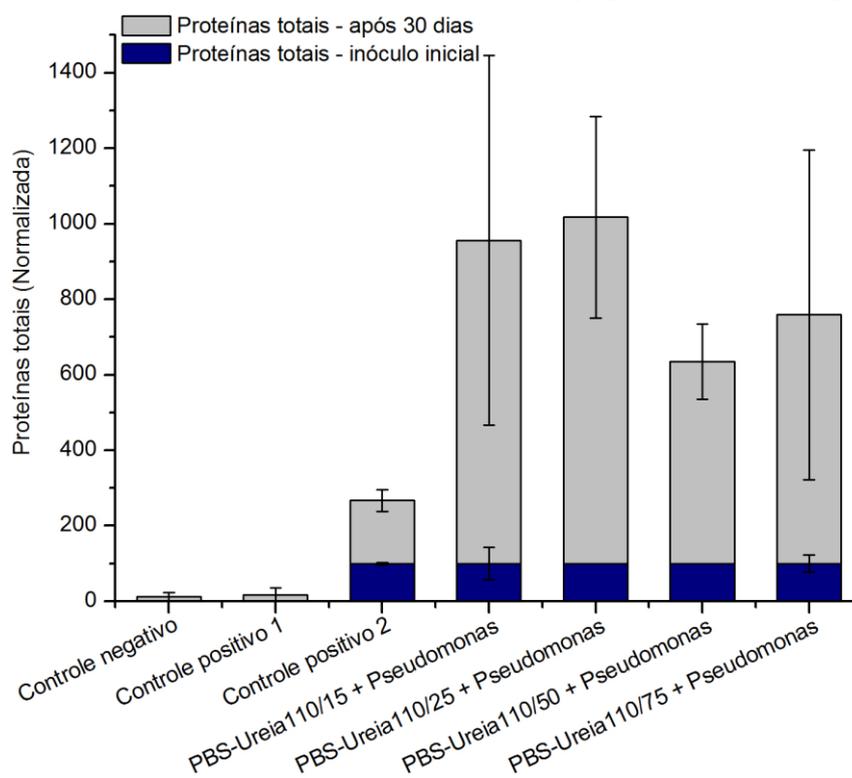
1. PBS-Ureia 110°C/15 kGy – consumo de ureia variou de 12 a 36%;
2. PBS-Ureia 110°C/25 kGy – consumo de ureia variou de 0 a 55%;
3. PBS-Ureia 110°C/50 kGy – consumo de ureia variou de 0 a 83% e;
4. PBS-Ureia 110°C/75 kGy – consumo de ureia variou de 0 a 60%.

Apesar dos altos desvios para as concentrações de ureia após 30 dias de experimento, os resultados apontam para um maior consumo de ureia nos sistemas inoculados com *Pseudomonas aeruginosa*, mostrando relação entre a presença do microrganismo e o consumo da ureia disponível.

6.9.3. Crescimento bacteriano

A Figura 45 mostra a quantificação média de proteínas em solução nos sistemas propostos para estudar a biodegradação de óleo combustível após 30 dias de experimento.

Figura 45 – Média do crescimento bacteriano nos sistemas propostos para de biodegradação.



Nos sistemas de controle negativo ou atenuação natural e nos de controle positivo 1 não houve inoculação de microrganismo, entretanto foram detectadas discretas concentrações de proteínas de 12 ± 3 e 18 ± 2 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, respectivamente, que podem ser provenientes de microrganismos pré-existentes nas amostras de óleo ou contaminação.

Nos sistemas inoculados com *Pseudomonas aeruginosa*, houve aumento considerável na concentração de proteínas após 30 dias de experimento, principalmente nas condições com ureia imobilizada, apesar dos desvios elevados. Para a condição na qual a ureia estava livre (controle positivo 2) a concentração proteica foi de 68 ± 12 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ao final de 30 dias e para os sistemas com ureia imobilizada tivemos:

1. PBS-Ureia 110/15 – 211 ± 121 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de proteínas ao final de 30 dias;
2. PBS-Ureia 110/25 – 230 ± 67 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de proteínas ao final de 30 dias;
3. PBS-Ureia 110/50 – 130 ± 24 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de proteínas ao final de 30 dias e;
4. PBS-Ureia 110/75 – 168 ± 111 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de proteínas ao final de 30 dias.

Os resultados de crescimento bacteriano corroboram os dados de consumo de ureia principalmente para os sistemas inoculados, ou seja, os microrganismos adicionados desenvolveram-se usando a ureia fornecida pelas matrizes. Sistemas nos quais não houve inoculação de microrganismos, o consumo de ureia não foi significativo, embora algum crescimento celular tenha sido detectado.

A biomassa celular quantificada nos sistemas com ureia imobilizada em PBS foi relativamente maior do que nos sistemas com ureia livre e algumas justificativas podem ser atribuídas. Nos sistemas com ureia livre, o nutriente está totalmente disponibilizado e com isso pode ter havido crescimento bacteriano acentuado em intervalos menores que 30 dias, não sendo detectado nesses resultados ou pelo fato da ureia estar disponível em altas concentrações iniciais, pode ter havido inibição do crescimento por produção de metabólitos secundários. Nos sistemas com matrizes poliméricas, a ureia imobilizada não foi disponibilizada imediatamente no meio durante a fase de adaptação dos microrganismos ao novo meio de crescimento, fase em que não há reprodução celular e nem consumo de nutrientes. Além disso, as matrizes formam superfícies favoráveis para o estabelecimento e desenvolvimento bacteriano.

Pode-se verificar também que no sistema que continha a matriz PBS-Ureia 110/25 foi detectado maior crescimento microbiano, o que reforça a hipótese de esta ter sido a matriz mais adequada pois permitiu maior desenvolvimento microbiano com maior consumo do óleo adicionado.

7. CONCLUSÕES

A liberação controlada de nutrientes em ambientes aquáticos contaminados por resíduos de petróleo representa uma estratégia promissora de biorremediação, pois é capaz de disponibilizar de forma gradual essas substâncias no ambiente evitando perdas e assegurando o consumo adequado por parte dos microrganismos degradadores de hidrocarbonetos que encontram-se em baixa abundância nos ambientes contaminados.

Os polímeros biodegradáveis têm conquistado cada vez mais espaço nas pesquisas para desenvolvimento de sistemas de liberação controlada, principalmente por gerarem compostos inertes durante os processos de degradação. Nesse contexto, o PBS merece destaque por apresentar boas características de processamento assim como obtenção por meio de fontes renováveis.

A técnica de imobilização de ureia no polímero fundido com posterior aplicação de radiação gama, produziu matrizes poliméricas contendo ureia 10% p/p com perfil de liberação gradual no intervalo de 24 horas. Com a fusão da mistura PBS-Ureia, as partículas de ureia foram aprisionadas pelas cadeias do polímero formando aglomerados ou matrizes poliméricas durante o resfriamento do material. A baixa massa molar do PBS sintetizado (5.343 g/mol) pode ter contribuído para a baixa imobilização da ureia, visto que as cadeias poliméricas mais curtas não foram capazes de envolver e aprisionar satisfatoriamente as partículas do nutriente após a fusão. Além disso, houve aumento de regiões amorfas com a fusão que facilitaram a saída da ureia do material polimérico. A irradiação gama nas doses de 25 e 50 kGy promoveu maior grau de reticulação nas matrizes poliméricas, reduzindo a liberação inicial de ureia. Por outro lado, a fusão e as crescentes doses de radiação gama diminuíram a estabilidade térmica das matrizes por promoverem o aumento das regiões amorfas.

Os compósitos PBS-Ureia 10% p/p mostraram-se satisfatórios como fontes de nitrogênio nos ensaios de bioestimulação de *Pseudomonas aeruginosa* visto esses sistemas apresentam claramente uma fase de crescimento exponencial na qual todos os indivíduos se reproduzem a uma velocidade média mediante condições favoráveis de desenvolvimento. Não houve diferença significativa quanto ao crescimento bacteriano em relação às matrizes irradiadas, mas sim sobre os sistemas com ureia livre, pois a quantificação elevada de proteínas aderidas às matrizes sugerem que estas funcionam como suporte para formação de biofilme e desenvolvimento celular.

Nos sistemas propostos para biodegradação de óleo combustível, houve significativo crescimento bacteriano e consumo de ureia, mostrando que apesar do contaminante estar

presente em solução, os mecanismos de bioestimulação através do uso das matrizes foram satisfatórios. As concentrações de hidrocarbonetos após 30 dias para os sistemas com ureia imobilizada ficaram próximas das concentrações verificadas nas condições com ureia livre, com destaque para a matriz polimérica irradiada a 25 kGy que apresentou a menor presença de hidrocarbonetos, o que preliminarmente, poderia nos sugerir uma possível vantagem dessa matriz sobre os outros para a degradação de óleo.

De forma geral, a metodologia proposta de imobilização de ureia no PBS cumpriu a função de retardar a liberação imediata do nutriente em solução e a presença do polímero assim como os diferentes graus de radiação gama sobre as matrizes poliméricas, não prejudicou o desenvolvimento bacteriano nos sistemas propostos para bioestimulação e biodegradação, podendo ampliar o uso dessas matrizes para outras escalas experimentais a fim de confirmar sua eficiência no processo de degradação microbiológica de hidrocarbonetos. Além disso, o baixo custo operacional da fusão e a possibilidade de aplicação de radiação ionizante em grandes quantidades de material, podem representar uma vantagem financeiras sobre outras técnicas de imobilização de nutrientes.

8. SUGESTÕES FUTURAS

- ❖ Estender o tempo de análise nos ensaios de biodegradação afim prolongar a interação entre o óleo e os microrganismos degradadores e aumentar a biodegradação;
- ❖ Testar outras técnicas de determinação de TPH, pois diferentes solventes e metodologias analíticas podem gerar resultados diferentes por extraírem e medirem frações diferentes de hidrocarbonetos de petróleo;
- ❖ Usar consórcios microbianos naturais na avaliação da biodegradação de óleo;
- ❖ Confirmar a formação de biofilmes na superfície das matrizes poliméricas por microscopia eletrônica de varredura;
- ❖ Efetuar testes de biodegradabilidade das matrizes PBS-Ureia 10% p/p para avaliar o uso do carbono da cadeia polimérica como nutriente no metabolismo celular microbiano;
- ❖ Aumentar o tempo de reação na fase de policondensação do PBS ou usar extensores de cadeia com efeito inerte sobre o ambiente, a fim de aumentar a massa molar polimérica e consequentemente intensificar a imobilização do composto nitrogenado, retardando a liberação no meio;
- ❖ Estudar o efeito da radiação gama sobre a estrutura química, estrutura cristalina e propriedades térmicas dos compósitos, comparando os resultados das análises do compósito PBS-Ureia 10% p/p antes da exposição às radiações com os resultados dos compósitos após as radiações;
- ❖ Avaliar a toxicidade do PBS sintetizado com $Ti(OBu)_4$ e experimentar outros mecanismos de aumento de massa molar do PBS, pois o uso de catalisadores à base de titânio deixam resíduos metálicos no meio;
- ❖ Testar outras fontes de nitrogênio ou controle do pH do meio, pois de acordo com VENOSA; ZHU (2003), em soluções fracamente tamponadas, o nitrato torna-se uma melhor fonte de nitrogênio que a amônia já que a produção de ácido associada ao metabolismo da amônia (um dos derivados da ureia) pode inibir a biodegradação do óleo.

9. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

ABBASIAN, F. et al. A Comprehensive Review of Aliphatic Hydrocarbon Biodegradation by Bacteria. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 176, n. 3, p. 670–699, jun. 2015.

ABIOYE, O. P.; AGAMUTHU, P.; ABDUL AZIZ, A. R. Phytotreatment of soil contaminated with used lubricating oil using Hibiscus cannabinus. **Biodegradation**, v. 23, n. 2, p. 277–286, abr. 2012.

ALLOWAY, B. J. (ED.). **Heavy metals in soils**. 2. ed ed. London: Blackie Academic & Professional, 1995.

ALVIM, I. D. **Produção e caracterização de micropartículas obtidas por spray drying e coacervação complexa e seu uso para alimentação de larvas de peixes**. Tese (doutorado)—Campinas, São Paulo: Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de alimentos., 2005.

ATWATER, G. I.; RIVA, J. P. **Petroleum**, 19 maio 2011. (Nota técnica).

AULENTA, F. et al. Assessment of natural or enhanced in situ bioremediation at a chlorinated solvent-contaminated aquifer in Italy: a microcosm study. **Environment International**, v. 31, n. 2, p. 185–190, fev. 2005.

BARBOSA, V. **Os 10 maiores acidentes petrolíferos da história**. Disponível em: <<https://exame.abril.com.br/mundo/10-maiores-acidentes-petroliferos-historia-556774/>>. Acesso em: 12 out. 2016.

BARCZA, M. V. **Petróleo**. Lorena, SP, 2017. Disponível em: <<http://sistemas.eel.usp.br/docentes/arquivos/1285870/313/Petroleo.pdf>>.

BODMEIER, R.; OH, K.; CHEN, H. The effect of the addition of low molecular weight poly(dl-lactide) on drug release from biodegradable poly(dl-lactide) drug delivery systems. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 51, n. 1, p. 1–8, 1 abr. 1989.

BOOPATHY, R. Factors limiting bioremediation technologies. **Bioresource Technology**, v. 74, n. 1, p. 63–67, ago. 2000.

BORAH, D.; YADAV, R. N. S. Biodegradation of Diesel, Crude Oil, Kerosene and Used Engine Oil by a Newly Isolated Bacillus cereus Strain DRDU1 from an Automobile Engine in Liquid Culture. **Arabian Journal for Science and Engineering**, v. 39, n. 7, p. 5337–5345, jul. 2014.

BRASILEIRO, J. S. L. **Microencapsulação de compostos bioativos: inovação em diferentes áreas**. Dissertação (Mestrado) em Ciências Farmacêuticas—Porto: Universidade Fernando Pessoa, 2011.

BRITO, G. F. et al. Biopolímeros, Polímeros Biodegradáveis e Polímeros Verdes. v. 6, n. 2, p. 127–139, 2011.

CANEVAROLO JR., S. V. **Ciência dos polímeros: um texto básico para tecnólogos e engenheiros**. 2. ed. São Paulo: Artliber Editora, 2002.

CANTAGALLO, C.; MILANELLI, J. C. C.; BRITO, D. D. Limpeza de ambientes costeiros brasileiros contaminados por petróleo: uma revisão. **Pan-American Journal of Aquatic Sciences**, v. 2, n. 1, p. 1–12, 2007.

CASTRO, L. S. DE. **Síntese e caracterização de copolímeros de ureia e ácido succínico**. Dissertação (Mestrado) em Engenharia Industrial—Salvador, BA: Escola Politécnica - Universidade Federal da Bahia, 2014.

CERQUEIRA, V. S. et al. Bioprospection and selection of bacteria isolated from environments contaminated with petrochemical residues for application in bioremediation. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 28, n. 3, p. 1203–1222, mar. 2012.

CHANDRA, S. et al. Application of bioremediation technology in the environment contaminated with petroleum hydrocarbon. **Annals of Microbiology**, v. 63, n. 2, p. 417–431, jun. 2013.

COSTA, A. S. et al. Environmental strategies to remove volatile aromatic fractions (BTEX) from petroleum industry wastewater using biomass. **Bioresource Technology**, v. 105, p. 31–39, fev. 2012.

COSTA, R. C. DA. **Estudo da irradiação gama sobre microesferas de poli(succinato de butileno) - PBS**. Dissertação (Mestrado) em Ciência e Tecnologia de Polímeros—Rio de Janeiro, RJ: Instituto de Macromoléculas - Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2017.

CRAIG, A. P. L. et al. Técnicas de limpeza de vazamentos de petróleo de petróleo em alto mar. **Cadernos de Graduação - Ciências Exatas e Tecnológicas**, v. 1, n. 15, p. 75–86, out 2012.

DALLA COSTA, K. A. et al. Formação de Biofilmes por *Staphylococcus Aureus* e *Pseudomonas Aeruginosa* em Diferentes Superfícies Utilizadas em Indústrias de Alimentos. **Blucher Food Science Proceedings**, v. 1, n. 1, p. 573–574, nov. 2014.

DAS, N.; CHANDRAN, P. Microbial Degradation of Petroleum Hydrocarbon Contaminants: An Overview. **Biotechnology Research International**, v. 2011, p. 1–13, 2011.

DELLAGNEZZE, B. M. et al. Bioremediation potential of microorganisms derived from petroleum reservoirs. **Marine Pollution Bulletin**, v. 89, n. 1–2, p. 191–200, dez. 2014.

ESTEVINHO, B. M. A. N. **Microencapsulação de sacarídeos**. Tese (Doutorado em Engenharia Química e Biológica)—Porto: Faculdade de Engenharia - Universidade do Porto, 2010.

ETCHEPARE, M. A. et al. Microencapsulação de probióticos pelo método de extrusão associado a interações eletrostáticas. **Ciência e Natura**, v. 37, p. 75, 15 dez. 2015.

FERREIRA, L. P. **Estudo da influência de parâmetros reacionais na síntese do poli(succinato de butileno (PBS) por métodos estatísticos e preparo de nanocompósitos PBS/argila organofílica via polimerização in situ**. Dissertação (Mestrado) em Ciência e

Tecnologia de Polímeros—Rio de Janeiro, RJ: Instituto de Macromoléculas - Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2013.

FERREIRA, L. P. et al. Preparo de nanocompósitos de poli(succinato de butileno) (PDS) e argila motmorilonita organofílica via polimerização in situ. **Polímeros**, v. 24, n. 5, p. 604–611, out. 2014.

FORTUNY, M. et al. Principais aplicações das microondas na produção e refino de petróleo. **Química Nova**, v. 31, n. 6, p. 1553–1561, 2008.

FRAZÃO, J. J. et al. Fertilizantes nitrogenados de eficiência aumentada e ureia na cultura do milho. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 18, n. 12, p. 1262–1267, dez. 2014.

FUENTES, S. et al. Bioremediation of petroleum hydrocarbons: catabolic genes, microbial communities, and applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 98, n. 11, p. 4781–4794, jun. 2014.

GAYLARD, C. C.; BELLINASSO, M. DE L.; MANFIO, G. P. Biodegradação. Aspectos biológicos e técnicos da biorremediação de xenobióticos. **Biotecnologia ciência & desenvolvimento**, v. 34, p. 36–43, 2005.

GERTLER, C. et al. Composition and dynamics of biostimulated indigenous oil-degrading microbial consortia from the Irish, North and Mediterranean Seas: a mesocosm study. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 81, n. 3, p. 520–536, set. 2012.

GIGLI, M. et al. Poly(butylene succinate)-based polyesters for biomedical applications: A review. **European Polymer Journal**, v. 75, p. 431–460, fev. 2016.

HARAYAMA, S.; KASAI, Y.; HARA, A. Microbial communities in oil-contaminated seawater. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 15, n. 3, p. 205–214, jun. 2004.

HASSANSHAHIAN, M. et al. Bioremediation (bioaugmentation/biostimulation) trials of oil polluted seawater: A mesocosm simulation study. **Marine Environmental Research**, v. 95, p. 28–38, abr. 2014.

HOLOWKA, E. P.; BHATIA, S. K. **Drug delivery: materials design and clinical perspective**. New York: Springer, 2014.

HUANG, L. et al. Optimization of nutrient component for diesel oil degradation by *Rhodococcus erythropolis*. **Marine Pollution Bulletin**, v. 56, n. 10, p. 1714–1718, out. 2008.

JACQUEL, N. et al. Synthesis and properties of poly(butylene succinate): Efficiency of different transesterification catalysts. **Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry**, v. 49, n. 24, p. 5301–5312, 15 dez. 2011.

JACQUES, R. J. S. et al. Biorremediação de solos contaminados com hidrocarbonetos aromáticos policíclicos. **Ciência Rural**, v. 37, n. 4, p. 1192–1201, ago. 2007.

KIM, B. K. et al. Effects of electron beam irradiation on the gel fraction, thermal and mechanical properties of poly(butylene succinate) crosslinked by multi-functional monomer. **Materials & Design**, v. 87, p. 428–435, dez. 2015.

LA MANTIA, F. P. et al. Rheological Behaviour, Mechanical Properties and Processability of Biodegradable Polymer Systems for Film Blowing. **Journal of Polymers and the Environment**, v. 26, n. 2, p. 749–755, fev. 2018.

LEAHY, J. G.; COLWELL, R. R. Microbial degradation of hydrocarbons in the environment. **Microbiological Reviews**, v. 54, n. 3, p. 305–315, set. 1990.

LEITE, S. G. F. **Tratamento anaeróbio**. Rio de Janeiro, RJ, 2015.

LIU, Y.; PAN, J.; FENG, S.-S. Nanoparticles of lipid monolayer shell and biodegradable polymer core for controlled release of paclitaxel: Effects of surfactants on particles size, characteristics and in vitro performance. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 395, n. 1–2, p. 243–250, ago. 2010.

LOWRY, O. H. et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **J. Biol. Chem.**, n. 193, p. 265–275, 28 maio 1951.

MADIGAN, M. T. **Brock biology of microorganisms**. Fourteenth edition ed. Boston: Pearson, 2015.

MENEZES, C. R. DE et al. Microencapsulação de probióticos: avanços e perspectivas. **Ciência Rural**, v. 43, n. 7, p. 1309–1316, jul. 2013.

Method 1664, Revision B. Washington, DC: [s.n.].

MILANI, E. J. et al. Petróleo na margem continental brasileira: geologia, exploração, resultados e perspectivas. **Revista Brasileira de Geofísica**, v. 18, n. 3, p. 352–396, 2000.

MIRANDA, L. S.; ANJOS, J. ÂNGELO S. A. DOS; MOREIRA, Í. T. A. Avaliação de tecnologias de remediação em zonas costeiras impactadas pela indústria de petróleo. **Revista eletrônica de Energia**, v. 4, n. 1, p. 19–37, 2014.

MONTEIRO, A. G. **Metodologia de avaliação de custos ambientais provocados por vazamento de óleo. O estudo de caso do complexo REDUC-DTSE**. Tese—Rio de Janeiro, RJ: Universidade Federal do Rio de Janeiro, COPPE, 2003.

MORAIS, J. M. DE. **Petróleo em águas profundas: uma história tecnológica da PETROBRAS na exploração e produção offshore**. Brasília: Ipea, 2013.

NASCIMENTO, A. R. et al. Avaliação do desempenho analítico do método de determinação de TPH (Total Petroleum Hydrocarbon) por detecção no infravermelho. **Eclética Química**, v. 33, n. 1, p. 35–42, 2008.

NIKOLIC, M. S.; DJONLAGIC, J. Synthesis and characterization of biodegradable poly(butylene succinate-co-butylene adipate)s. **Polymer Degradation and Stability**, v. 74, n. 2, p. 263–270, jan. 2001.

OGLIARI, P. J.; PACHECO, J. A. **Análise estatística usando o Statistica® 6.0**. Florianópolis, SC: Universidade Federal de Santa Catarina, Centro Tecnológico, Departamento de Informática e Estatística, jun. 2011. Disponível em: <[https://moodle.ufsc.br/pluginfile.php/1559491/mod_resource/content/1/Apostila%20Statistic a.pdf](https://moodle.ufsc.br/pluginfile.php/1559491/mod_resource/content/1/Apostila%20Statistic%20a.pdf)>. Acesso em: 2 maio. 2018.

Oil Tanker Spill Statistics 2016. : The International Tanker Owners Pollution Federation Limited - ITOPF. London, UK: [s.n.]. Disponível em: <<http://www.itopf.com/knowledge-resources/data-statistics/statistics/>>. Acesso em: 10 nov. 2017.

Oil Tanker Spill Statistics 2017. Disponível em: <<http://www.itopf.com/knowledge-resources/data-statistics/statistics/>>. Acesso em: 19 ago. 2017.

PALADINO, E. E. **MODELAGEM MATEMÁTICA E SIMULAÇÃO NUMÉRICA DE TRAJETÓRIAS DE DERRAMES DE PETRÓLEO NO MAR.** Dissertação (Mestrado em Engenharia mecânica)—Florianópolis: Universidade Federal de Santa Catarina, 2000.

PEREIRA, E. I. **Estudo do processo de liberação lenta de fertilizantes a partir de nanocompósitos de matriz ureia.** Tese(Doutorado em Ciências)—São Carlos, SP: Universidade Federal de São Carlos, 2014.

PETERSON, C. H. Long-Term Ecosystem Response to the Exxon Valdez Oil Spill. *Science*, v. 302, n. 5653, p. 2082–2086, 19 dez. 2003.

PETRONOTÍCIAS. **Chevron foi inocentada pelo acidente que vazou quase mil barris de petróleo na baía de Campos.** Disponível em: <<https://petronoticias.com.br/archives/73744>>. Acesso em: 10 nov. 2017.

PHUA, Y. J.; CHOW, W. S.; MOHD ISHAK, Z. A. The hydrolytic effect of moisture and hygrothermal aging on poly(butylene succinate)/organo-montmorillonite nanocomposites. *Polymer Degradation and Stability*, v. 96, n. 7, p. 1194–1203, jul. 2011.

PRADELLA, J. G. DA C. **Biopolímeros e Intermediários Químicos.** São Paulo: Centro de Tecnologia de Processos e Produtos. Laboratório de Biotecnologia Industrial-LBI/CTPP, 2006. Disponível em: <http://www.redetec.org.br/wp-content/uploads/2015/02/tr06_biopolimeros.pdf>. Acesso em: 12 mar. 2017.

PRENDERGAST, D. P.; GSCHWEND, P. M. Assessing the performance and cost of oil spill remediation technologies. *Journal of Cleaner Production*, v. 78, p. 233–242, set. 2014.

PROCHNOW, L. I.; ABDALLA, S. R. S. E. **A indústria de fertilizantes nitrogenados e o futuro.** Informações agronômicas. *Anais...* In: CONFERÊNCIA N2007 – AGRICULTURA, DESENVOLVIMENTO E NITROGÊNIO. Costa do Sauipe, BA: Dez 2007Disponível em: <[http://www.ipni.net/publication/ia-brasil.nsf/0/7F2D3D585ABE167F83257AA1005DF50C/\\$FILE/Pag2-16-120.pdf](http://www.ipni.net/publication/ia-brasil.nsf/0/7F2D3D585ABE167F83257AA1005DF50C/$FILE/Pag2-16-120.pdf)>. Acesso em: 26 jul. 2017

REÍ, M. I. **Microencapsulação: Em busca de produtos inteligentes.** [s.l: s.n.]. v. 27

REIS, E. A. **Produção de cápsulas de liberação controlada para fins de biorremediação de ambientes contaminados por hidrocarbonetos do petróleo.** Dissertação (Mestrado em Ciências). Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos—Rio de Janeiro, RJ: Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química, 2009.

REIS, E. A. **Imobilização de nitrogênio e fósforo em diferentes matrizes poliméricas para uso na biorremediação de ambientes marinhos contaminados por hidrocarbonetos de petróleo.** Tese (Doutorado) em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos—Rio de Janeiro, RJ: Escola de Química - Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2015.

Relatório de Tecnologia Petrobras 2014. . [s.l.] Petrobrás, 2015. Disponível em: <<http://www.petrobras.com.br/pt/nossas-atividades/tecnologia-e-inovacao/relatorio-de-tecnologia/>>. Acesso em: 19 mar. 2017.

RICKLEFS, R. E. **A Economia da Natureza.** Quinta Edição ed. Rio de Janeiro, RJ: Guanabara KOOGAN S.A., 2003.

ROJO, F. Degradation of alkanes by bacteria. **Environmental Microbiology**, v. 11, n. 10, p. 2477–2490, out. 2009.

RON, E. Z.; ROSENBERG, E. Enhanced bioremediation of oil spills in the sea. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 27, p. 191–194, jun. 2014.

ROSENBERG, E.; RON, E. Z. Bioremediation of petroleum contamination. In: **Bioremediation: Principles and Applications.** Cambridge; New York: CAMBRIDGE UNIVERSITY PRESS, 1996. p. 100–124.

ROUXINOL, F. DA S. **Preparação de nanopartículas para sistemas de liberação controlada de substâncias activas usadas no tratamento de doenças oftalmológicas.** Dissertação (Mestrado) Integrado em Engenharia Biomédica—Coimbra, Portugal: Faculdade de Ciências e Tecnologia - Universidade de Coimbra, 2009.

RULAND, W. X-ray determination of crystallinity and diffuse disorder scattering. **Acta Crystallographica**, v. 14, n. 11, p. 1180–1185, 10 nov. 1961.

SANTOS, F. R. DOS. **Método de Lowry: validação e estimativa do cálculo da incerteza.** Dissertação (Mestrado em Alimentos e Nutrição)—Araraquara, SP: Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade Estadual Paulista, 2012.

SANTOS, M. P. O. DOS. **Síntese, caracterização e avaliação do poli(succinato de butileno) para liberação de ureia.** Dissertação (Mestrado) em Ciência e Tecnologia de Polímeros—Rio de Janeiro, RJ: Instituto de Macromoléculas - Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2014.

SCHABER, P. M. et al. Thermal decomposition (pyrolysis) of urea in an open reaction vessel. **Thermochimica Acta**, v. 424, n. 1–2, p. 131–142, dez. 2004.

SCHMIDELL, W. et al. **Biotecnologia industrial: engenharia bioquímica.** São Paulo: Blucher, 2001.

SILVA, C. et al. Administração oral de peptídeos e proteínas: II. Aplicação de métodos de microencapsulação. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 39, n. 1, p. 1–20, mar. 2003.

SILVA, R. C. DA; SILVA, R. M. DA; AQUINO, K. A. DA S. The Interaction of Gamma Radiation with the Matter in the Process of Sterilization. **Revista Virtual de Química**, v. 6, n. 6, 2014.

SINHA RAY, S.; OKAMOTO, K.; OKAMOTO, M. Structure–Property Relationship in Biodegradable Poly(butylene succinate)/Layered Silicate Nanocomposites. **Macromolecules**, v. 36, n. 7, p. 2355–2367, abr. 2003.

SONG, D. K.; SUNG, Y. K. Synthesis and characterization of biodegradable poly(1,4-butanediol succinate). **Journal of Applied Polymer Science**, v. 56, n. 11, p. 1381–1395, 13 jun. 1995.

SUAVE, J. et al. Microencapsulação: Inovação em diferentes áreas. **Revista Saúde e ambiente**, v. 7, n. 2, p. 12–20, 2006.

SUHARTINI, M. et al. Radiation crosslinking of poly(butylene succinate) in the presence of low concentrations of trimethylol isocyanurate and its properties. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 88, n. 9, p. 2238–2246, 31 maio 2003.

TONINI, R. M. C. W.; REZENDE, C. E.; GRATIVOL, A. D. Degradação e biorremediação de compostos do petróleo por bactérias: revisão. **Oecologia Australis**, v. 14, n. 04, p. 1010–1020, dez. 2010.

Top 5 - Piores vazamentos de petróleo da história. Disponível em: <<https://www.terra.com.br/noticias/ciencia/top-5-piores-vazamentos-de-petroleo-da-historia,37a9ba8cb360d310VgnCLD2000000ec6eb0aRCRD.html>>. Acesso em: 14 nov. 2016.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia (10a. ed.)**. [s.l.] Grupo A - Artmed, 2012.

VARJANI, S. J. Microbial degradation of petroleum hydrocarbons. **Bioresource Technology**, v. 223, p. 277–286, jan. 2017.

VENOSA, A. D.; ZHU, X. Biodegradation of Crude Oil Contaminating Marine Shorelines and Freshwater Wetlands. **Spill Science & Technology Bulletin**, v. 8, n. 2, p. 163–178, abr. 2003.

VICENTE, J.; SALDANHA, T. Emprego da técnica de radiação ionizante em alimentos industrializados. **Acta tecnológica**, v. 7, n. 2, p. 49–54, 2012.

VIEIRA, P. A. et al. Statistical analysis and optimization of nitrogen, phosphorus, and inoculum concentrations for the biodegradation of petroleum hydrocarbons by response surface methodology. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 25, n. 3, p. 427–438, mar. 2009.

VILLANOVA, J. C. O.; ORÉFICE, R. L.; CUNHA, A. S. Aplicações farmacêuticas de polímeros. **Polímeros**, v. 20, n. 1, p. 51–64, 2010.

VYAS, T. K.; DAVE, B. P. Effect of addition of nitrogen, phosphorus and potassium fertilizers on biodegradation of crude oil by marine bacteria. **Indian Journal of Marine Sciences**, v. 39, n. 1, p. 143–150, mar. 2010.

WALLENIUS, K. et al. Simplified MPN method for enumeration of soil naphthalene degraders using gaseous substrate. **Biodegradation**, v. 23, n. 1, p. 47–55, fev. 2012.

WANG, G.; GUO, B.; LI, R. Synthesis, characterization, and properties of long-chain branched poly(butylene succinate). **Journal of Applied Polymer Science**, v. 124, n. 2, p. 1271–1280, 15 abr. 2012.

WARR, L. N. et al. Bioremediating Oil Spills in Nutrient Poor Ocean Waters Using Fertilized Clay Mineral Flakes: Some Experimental Constraints. **Biotechnology Research International**, v. 2013, p. 1–9, 2013.

WIELAND, P.; LUSTOSA, L. J.; MACEDO-SOARES, T. D. L. A. Alimentos preservados com radiação: a vantagem competitiva que falta ao Brasil. **Revista da FAE**, v. 13, n. 1, p. 1–14, jul. 2010.

XU, J.; GUO, B.-H. Poly(butylene succinate) and its copolymers: Research, development and industrialization. **Biotechnology Journal**, v. 5, n. 11, p. 1149–1163, nov. 2010.

XU, Y. et al. Synthesis and characterization of biodegradable poly(butylene succinate-co-propylene succinate)s. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 109, n. 3, p. 1881–1889, 5 ago. 2008.

YAKIMOV, M. M. et al. *Alcanivorax borkumensis* gen. nov., sp. nov., a new, hydrocarbon-degrading and surfactant-producing marine bacterium. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 48, n. 2, p. 339–348, 1 abr. 1998.

YAMAN, A. **Alternative methods of terminal sterilization for biologically active macromolecules**. [s.l.: s.n.]. v. 4

YOO, E. S.; IM, S. S. Melting behavior of poly(butylene succinate) during heating scan by DSC. **Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics**, v. 37, n. 13, p. 1357–1366, 1 jul. 1999.

ZACHARYASZ, P.; SIEPAK, J.; ROSADA, J. Petroleum-Contaminated Soil and Water Analysis and Biodegradation. **Pol. J. Environ. Stud.**, v. 21, n. 5, p. 1467–1480, 2012.

ZANAROLI, G. et al. Characterization of two diesel fuel degrading microbial consortia enriched from a non acclimated, complex source of microorganisms. **Microbial Cell Factories**, v. 9, n. 1, p. 10, 2010.

ZHANG, C.; WANG, S.; YAN, Y. Isomerization and biodegradation of beta-cypermethrin by *Pseudomonas aeruginosa* CH7 with biosurfactant production. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 14, p. 7139–7146, jul. 2011.

ZÍLIO, E. L.; PINTO, U. B. Identificação e distribuição dos principais grupos de compostos presentes nos petróleos brasileiros. **Bol. Téc. Petrobras**, v. 45, n. 1, p. 21–25, 2002.

ANEXO I

	Fusão	Dose	Tm (°C)	Td (°C) TGA	Td (°C) DSC	ΔH_f (J/g)	ΔH_d (J/g)	Xc (%) DRX	Xc (%) DSC	Perda de massa (%)	RMSE FTIR
PBS	Não	0	112,99	397,05	400,53	80,79	1158,95	66,40	73,24	99,16	0
PBS 110	Sim	0	110,20	397,64	398,70	64,41	417,29	39,39	58,40	99,19	0,5202
PBS 110/15	Sim	15	108,88	402,02	379,01	74,05	448,84	47,25	67,14	99,53	0,5351
PBS 110/25	Sim	25	108,51	402,08	403,36	72,15	448,91	49,89	65,41	99,41	0,4630
PBS 110/50	Sim	50	108,46	396,43	397,30	71,97	405,64	49,00	65,25	99,45	0,4585
PBS 110/75	Sim	75	108,12	402,40	402,33	74,56	393,30	50,58	67,59	99,20	0,4603
PBS-Ureia 110/15	Sim	15	108,41	393,83	391,28	61,00	244,45	46,59	55,30	98,39	3,1112
PBS-Ureia 110/25	Sim	25	108,25	391,23	402,13	60,71	269,96	42,47	55,04	99,48	2,1457
PBS-Ureia 110/50	Sim	50	108,19	393,24	390,78	50,73	296,74	42,56	46,00	98,67	2,4051
PBS-Ureia 110/75	Sim	75	107,50	404,99	402,22	59,06	301,28	48,87	53,55	99,46	3,1642