

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

ADRIANO UEMURA DE FARIA

BIODEGRADAÇÃO DE POLIPROPILENO (PP), DE
POLIHIDROXIBUTIRATO (PHB) E DA BLENDAS PP/PHB (1:1) POR
MICROORGANISMOS DE RIO POLUÍDO E EFLUENTE BRUTO DE
REFINARIA DE PETRÓLEO.

Dissertação apresentada ao Instituto de
Biotecnologia do Campus de Rio Claro,
Universidade Estadual Paulista, como parte dos
requisitos para obtenção do grau de Mestre em
Ciências Biológicas (Microbiologia Aplicada).

Rio Claro
2009

ADRIANO UEMURA DE FARIA

BIODEGRADAÇÃO DE POLIPROPILENO (PP), DE
POLIHIDROXIBUTIRATO (PHB) E DA BLENDAS PP/PHB (1:1) POR
MICROORGANISMOS DE RIO POLUÍDO E EFLUENTE BRUTO DE
REFINARIA DE PETRÓLEO.

Dissertação apresentada ao Instituto de
Biociências do Campus de Rio Claro,
Universidade Estadual Paulista, como parte dos
requisitos para obtenção do grau de Mestre em
Ciências Biológicas (Microbiologia Aplicada).

Orientadora: Dra. Sandra Mara Martins Franchetti

Rio Claro

2009

Resumo

Plásticos sintéticos, como o polipropileno (PP), são persistentes no meio ambiente, seu alto consumo pela sociedade contemporânea gera acúmulo de material poluindo o meio ambiente. Uma possível solução para o problema pode ser a substituição de polímeros sintéticos por outros biodegradáveis obtidos a partir de fontes renováveis como o poli(3-hidroxi-butirato) (PHB). As blendas são uma opção para a substituição parcial dos polímeros sintéticos por polímeros biodegradáveis, considerando que a total substituição dos polímeros sintéticos é algo, ainda, impraticável. A biodegradação, por ser um processo natural que ocorre em ambientes biologicamente ativos, é vista como uma alternativa para o tratamento dos resíduos plásticos. Este trabalho verificou a biodegradação de filmes de PHB, PP e blenda de PP/PHB por microrganismos de águas de rio poluído e efluente bruto de refinaria de petróleo. As análises utilizadas para avaliar as transformações no filme foram perda de massa, microscopia óptica, espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) e microscopia eletrônica de varredura (MEV). Os resultados mostraram que a degradação do PHB ocorre tanto na fase amorfa como na cristalina, sendo mais intensa em efluente bruto da refinaria de petróleo, seguida da água de rio que recebeu o efluente tratado.

Abstract

Synthetic plastics such as polypropylene (PP), are persistent in environment, the high consumption by contemporary society generates accumulation of material that pollute the environment. A possible solution to this problem may be replacing synthetic polymers by biodegradable ones obtained from renewable sources like the poly (3-hydroxybutyrate) (PHB). Blends are an option for replacement part of synthetic polymers by biodegradable polymers, however overall replacement of the synthetic polymer is impracticable. Degradation, natural process that occurs in biologically active environments, is aiming as an alternative for the treatment of waste plastics. This work verified the degradation of films PHB, PP and blends of PP/PHB films by microorganisms of water from polluted river and effluent from oil refinery. The analysis used to measure changes in the film were: loss of mass, optical microscopy, Fourier-transform infrared (FTIR) spectroscopy and scanning electron microscopy (SEM). The results showed that the degradation of PHB occurs in the crystalline and amorphous phases, being more intense in the effluent followed by water from the river that received the treated effluent.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	3
2. REVISÃO DA LITERATURA	4
2.1. Polímeros	4
2.1.1. Polímeros sintéticos	4
2.1.2. Polímeros naturais	5
2.3. Blendas	6
2.4. Consumo e descarte dos plásticos.....	8
2.4.1. Incineração.....	8
2.4.2. Aterros.....	9
2.4.3. Reciclagem.....	9
2.4.4. Biodegradação	11
2.5. Avaliação da Biodegradação.....	13
2.6. Caracterização dos filmes	14
2.6.1. FTIR	15
2.6.2. Microscopia Eletrônica	16
2.7. Caracterização do Rio Atibaia	17
3. MATERIAL E MÉTODOS	18
3.1. Material.....	18
3.1.1. Polímeros	18
3.1.2. Fonte dos microrganismos	18
3.1.3. Meios de cultivo.....	18
3.1.4. Meios de biotratamento	19
3.1.5. Equipamentos	19
3.2. Métodos.....	19
3.2.1. Preparo dos filmes e blendas	19
3.2.2. Preparo dos meios de tratamento microbiano.....	20
3.2.3. Tratamento microbiano.....	21
3.2.4. Plaqueamento e contagem microbiana	22
3.2.5. Isolamento bacteriano	22
3.2.6. Identificação de bactéria.....	23
3.2.8. Microscopia optica.....	23
3.2.9. Medidas de massa	23

3.2.10. Contagem microbiana	24
3.2.12. Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	24
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	25
4.1. Análise visual	25
4.1.1. Filmes de PHB	25
4.1.2. Blendas de PP/PHB	26
4.1.3. Filmes de PP	27
4.2. Microscopia óptica.....	27
4.3. Variação de massa.....	29
4.4. Contagem microbiana	30
4.5. FTIR	31
4.5.1. Filmes de PHB	32
4.5.2. Filmes de PP	36
4.5.3. Blendas de PP/PHB	37
4.6. Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	41
4.5.1. Filmes de PHB	41
4.5.2. Filmes de PP	42
4.5.3. Blendas de PP/PHB	43
5. Conclusão	45
6. Perspectivas futuras.....	46
7. Bibliografia.....	47

1. INTRODUÇÃO

Os plásticos têm papel fundamental na sociedade atual, onde são utilizados de múltiplas formas. Além disso, tem-se desenvolvido inúmeras aplicações para as quais anteriormente eram utilizados outros materiais, como metais, vidro, madeira, papel, etc. Ou seja, os plásticos representam um grande mercado, como também um mercado em crescimento.

Devido ao fato de algumas aplicações dos plásticos, como por exemplo, o seu uso em embalagens, ser de descartabilidade muito rápida, associado à grande dificuldade de degradação desses materiais no ambiente, os plásticos têm despertado grande preocupação. No Brasil são geradas diariamente cerca de 228.413 toneladas de resíduo por dia, sendo que no Estado de São Paulo a produção diária de resíduo é de 105.582 toneladas, das quais aproximadamente 11% correspondem a materiais plásticos. Dentre os materiais provenientes de coleta seletiva, 20% são plásticos.

O destino final desses materiais, muitas vezes é incerto. Quando são descartados em meio aquático, fica difícil removê-los, restando-lhes a possibilidade de ali permanecer, podendo ou não degradar.

O crescente comprometimento da qualidade dos ecossistemas aquáticos tem sido causado não só pelo excesso de esgotos domésticos lançados sem tratamento nos corpos hídricos, como pela variedade de resíduos químicos e orgânicos provenientes de descartes industriais e agrícolas que perfazem uma extensa gama de substâncias potencialmente tóxicas. A quantidade e os tipos de materiais orgânicos e inorgânicos que agem como nutrientes e estão presentes no ambiente aquático, influenciam significativamente o crescimento microbiano.

Muitos rios encontram-se poluídos, contendo materiais plásticos em seu leito, além de substâncias provenientes de esgotos domésticos e industriais, comprometendo a qualidade de suas águas.

O objetivo deste trabalho consiste na investigação da biodegradação dos homopolímeros, polipropileno e poli(3-hidroxibutirato), bem como da blenda obtida dos mesmos na proporção (1:1) por microrganismos presentes no efluente bruto de refinaria de petróleo e nas águas do Rio Atibaia antes e após o descarte do efluente tratado.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Polímeros

Polímeros são macromoléculas constituídas por unidades (meros) que se repetem ao longo da cadeia polimérica. Quando o polímero possui apenas um tipo de mero, é chamado de homopolímero. Quando sua cadeia for constituída por duas ou mais unidades monoméricas, trata-se de um copolímero. Ainda existem as blendas que são misturas de diferentes polímeros, sem que haja reação química entre eles (SCOTT, 1999; MANO e MENDES, 1999). Os polímeros são classificados como termoplásticos (plásticos), termofixos, borrachas e fibras. O termo plástico vem do grego, *plastikus*, que significa material adequado à moldagem. Os plásticos são materiais que, embora sólidos à temperatura ambiente em seu estado final, quando aquecidos acima da temperatura de “amolecimento” tornam-se fluidos e passíveis de serem moldados por ação isolada ou conjunta de calor e pressão (MANO e MENDES, 1999; SPINACÉ e PAOLI, 2005).

Os polímeros podem ser de origem sintética ou natural.

2.1.1. Polímeros sintéticos

Os polímeros sintéticos, em sua maioria, são derivados de petróleo, sendo largamente empregados na confecção de artefatos e, resistentes à decomposição, como exemplo de polímero sintético, temos o polipropileno.

O polipropileno (PP) (Fig. 1) é uma parafina da família das olefinas e é um homopolímero, termoplástico, semicristalino, produzido pela polimerização do monômero propileno (propeno). O PP tem ponto de fusão definido em torno de 170 °C. Trata-se de um polímero resistente de alta durabilidade e difícil biodegradação amplamente empregado na confecção de vários artefatos presentes no cotidiano do homem moderno, sua aplicabilidade vai desde carcaças de eletrodomésticos a cabos de escovas dentais e revestimento interno de automóveis. Sua temperatura

de transição vítrea (T_g) é -17°C , sendo flexível e versátil para muitas aplicações (FORMOLO *et al.*, 2003).

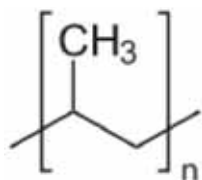


Figura 1: Estrutura química do PP

2.1.2. Polímeros naturais

Os polímeros naturais são aqueles normalmente encontrados na natureza, sendo produzidos por organismos vivos e, neste caso, são chamados de biopolímeros. Dentre os polímeros naturais estão os poli(hidroxicarboxilatos) (PHAs).

Os PHAs pertencem à família de poliésteres de ácidos hidroxicarboxílicos acumulados por diversas bactérias, na forma de grânulos intracelulares de reserva de carbono e energia, que atingem até 80% em peso seco da biomassa bacteriana (ANDERSON e DAWES, 1990; GOMEZ *et al.*, 1993; STEINBÜCHEL, 1991; SUDESH *et al.*, 2000). Em geral, a síntese de PHA por bactérias em um meio nutritivo ocorre quando há excesso de fonte de carbono e a limitação de pelo menos um nutriente necessário à multiplicação das células (N, P, Mg, Fe etc.) (ANDERSON e DAWES, 1990; BRANDL *et al.*, 1990; STEINBÜCHEL e VALENTIN, 1995). Estes polímeros despertam grande interesse, pois são termoplásticos, biodegradáveis, biocompatíveis e podem ser sintetizados a partir de matérias-primas renováveis pela agricultura, como da cana-de-açúcar (BYROM, 1990; NONATO, 2001; RAMSAY *et al.*, 1995).

As características mais importantes dos PHAs são a sua rápida biodegradabilidade e suas propriedades termoplásticas (DOI, 1990). Suas propriedades permitem que sejam utilizados como substitutos dos plásticos convencionais, de origem petroquímica, em algumas aplicações, que vão desde embalagens e materiais descartáveis, matriz para liberação controlada de fármacos até implantes e moldes da área médica. Os poliésteres podem oferecer grande

variedade de propriedades, desde plásticos rígidos altamente cristalinos a polímeros dúcteis (CHANDRA e RUSTGI, 1998). Entre os polímeros biodegradáveis o mais conhecido é o poli(3-hidroxibutirato) (PHB).

O PHB (Fig. 2) é o polímero mais estudado dentre os PHAs, possuindo propriedades termoplásticas e características físicas e mecânicas semelhantes às do polipropileno, polímero derivado do petróleo (SUDESH *et al.*, 2000). É um polímero cristalino com alta temperatura de fusão ($T_f = 180\text{ }^\circ\text{C}$) e temperatura de transição vítrea (T_g) de cerca de $5\text{ }^\circ\text{C}$ (AMASS *et al.*, 1998). Sua produção em grande escala acontece por um processo de fermentação bacteriana, sendo ainda um processo relativamente caro (CHIELLINI e SOLARO, 1996).

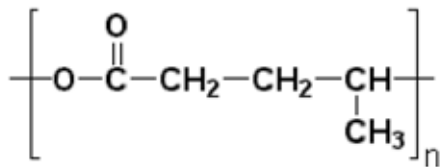


Figura 2: Estrutura química do PHB

2.3. Blendas

Blendas poliméricas são misturas de diferentes polímeros com ligações não covalentes dos componentes poliméricos individuais. Em alguns casos, cada componente polimérico contribui de uma maneira específica para um perfil global, ocorrendo um tipo de sinergismo nas propriedades dos materiais obtidos (La MANTIA, 1999; KONNING *et al.*, 1998; UTRACKI, 1999). A mútua influência dos componentes poliméricos reflete-se na resistência térmica da blenda contra o estresse ambiental, no potencial de deterioração e nas propriedades mecânicas da mesma (La MANTIA, 1999).

A miscibilidade da blenda é caracterizada por uma única transição vítrea (T_g) dos componentes da blenda, o que varia com a composição da blenda, medida pela técnica de Calorimetria Exploratória Diferencial (AMASS *et al.*, 1998), que baseia-se no fato de que o processo de mudança física ou química de uma substância é

acompanhada por uma variação de entalpia (ROSA *et al.*, 2003). A transição vítrea é um fenômeno relacionado à parte amorfa do polímero, não há razão para a irregularidade estrutural interferir com a Tg, como interfere com a cristalinidade e conseqüentemente com o ponto de fusão. A vantagem de produzir blendas miscíveis inclui a possibilidade de conseguir, morfologicamente, uma única fase dos componentes da blenda, revelando interações intermoleculares entre os dois polímeros (AMASS *et al.*, 1998).

A miscibilidade e a compatibilidade dos componentes poliméricos são importantes propriedades do material. Blendas poliméricas podem ser homogêneas ou heterogêneas na escala microscópica, mas não devem exibir heterogeneidade na escala macroscópica (FOX, 1999). A blenda heterogênea na escala macroscópica apresenta indício na segregação polimérica sendo considerada incompatível. Apresenta variedade de morfologia, incluindo freqüentemente dispersão de um polímero na matriz do outro e/ou duas fases morfológicas (KONNING *et al.*, 1998). A morfologia das blendas e as características das interfaces influenciam na degradação das mesmas (POSPISIL *et al.*, 1999).

A baixa qualidade da compatibilidade é um sério problema encontrado nas blendas poliméricas. Conseqüentemente existe forte tentativa para aumentar a compatibilidade, pelo uso de aditivos (compatibilizadores). Eles diminuem as dimensões das partículas dispersas e previnem os processos indesejados como separação de fases, aglomeração e a carência física (KONNING *et al.*, 1998). A degradação da blenda polimérica é influenciada pela estrutura e co-reatividade dos componentes poliméricos e/ou pela influência positiva ou negativa da estabilidade final da blenda (POSPISIL *et al.*, 1999).

Elas são importantes biotecnologicamente devido à modificação de propriedades mecânicas em relação aos polímeros originais, à melhora da força de impacto às baixas temperaturas, em particular, resistência ao aquecimento (BILLINGHAM *et al.*, 1999).

2.4. Consumo e descarte dos plásticos

Os plásticos são moldáveis a quente e possuem baixa densidade, boa aparência, são atóxicos e isolantes termo-elétricos, resistentes ao impacto e possuem baixo custo, portanto, apresentam uma larga faixa de aplicações. Devido a estas propriedades o consumo dos polímeros vem crescendo (SPINACÉ e PAOLI, 2004). No Brasil, o consumo de resinas termoplásticas em 1998 foi cerca de 3,3 milhões de toneladas e 5,3 milhões de toneladas em 2008, o que representa um crescimento de 60,6% em dez anos (ABIQUIM, 2009).

Um grande problema decorrente da utilização de materiais poliméricos é, sem dúvida, o acúmulo gerado após o descarte. Os polímeros de hidrocarbonetos são resistentes ao ataque químico e biológico, de tal forma que isso lhes assegura longevidade e outras propriedades que se mantêm por longo tempo, podendo levar mais de uma centena de anos para se decompor, resultando em problemas ambientais que podem ser desastrosos para a humanidade (ROSA *et al.*, 2002). É difícil pensar e praticar um destino efetivamente adequado para os materiais que descartamos. A taxa de geração de resíduos sólidos urbanos está relacionada aos hábitos de consumo de cada cultura, onde se nota uma correlação estreita entre a produção de resíduos e o poder econômico de uma dada população. Os resíduos fazem parte da história do homem, já que a sua produção é inevitável (FADINI e FADINI, 2001). Como alternativas para minimizar este problema, existem diferentes medidas, cada qual com suas vantagens e desvantagens (FADINI e FADINI, 2001; FRANCHETTI e MARCONATO, 2006)

2.4.1. Incineração

A incineração pode ser praticada com a finalidade de diminuir significativamente o volume de material descartado, entretanto é um método que demanda altos investimentos e libera gases na atmosfera, como CO₂ que contribui com o efeito estufa e o HCl, da queima do PVC, que contribui com a formação da

chuva ácida (FRANCHETTI e MARCONATO, 2006). No Brasil apenas 0,45% dos materiais descartados são incinerados (IBGE, 2000).

2.4.2. Aterros

O aterramento é utilizado para acondicionar grandes volumes de materiais presentes no lixo, inclusive os plásticos. Existem, basicamente, dois tipos de aterros, o controlado e o sanitário. O primeiro caracteriza-se pela disposição do material em local controlado, onde os resíduos sólidos recebem uma cobertura de solos ao final de cada jornada, geralmente não possui impermeabilização dos solos nem sistema de dispersão de chorume e gases, sendo comum nestes locais a contaminação de águas subterrâneas. O aterro sanitário, ao contrário, é impermeabilizado e possui sistema de drenagem de chorume e de dispersão de gases (FADINI e FADINI, 2001). Segundo dados do IBGE (2000), 37,03% do lixo são destinados ao aterro controlado e 36,18%, ao aterro sanitário.

2.4.3. Reciclagem

A reciclagem de polímeros pode ser classificada em quatro categorias: primária, secundária, terciária e quaternária. A reciclagem primária consiste na conversão dos resíduos poliméricos industriais por métodos de processamento padrão em produtos com características equivalentes àsquelas dos produtos originais produzidos com polímeros virgens; por exemplo, aparas que são novamente introduzidas no processamento. Na reciclagem secundária ocorre a conversão dos resíduos poliméricos provenientes dos resíduos sólidos urbanos por um processo ou uma combinação de processos em produtos que tenham menor exigência do que o produto obtido com polímero virgem, por exemplo, reciclagem de embalagens de PP para obtenção de sacos de lixo. A reciclagem terciária se dá por processo tecnológico de produção de insumos químicos ou combustíveis a partir de resíduos

poliméricos. Por fim, a reciclagem quaternária, em que ocorre um processo tecnológico de recuperação de energia de resíduos poliméricos por incineração controlada. A reciclagem primária e a secundária são conhecidas como reciclagem mecânica ou física, o que diferencia uma da outra é que na primária utiliza-se polímero pós-industrial e na secundária, pós-consumo. A reciclagem terciária também é chamada de química e a quaternária de energética (SPINACÉ e PAOLI, 2004).

Atualmente, estuda-se a possibilidade de reciclar os plásticos quimicamente, através da gaseificação térmica e/ou catalítica, convertendo-os em gás de síntese (syngas), mistura de gases, como metano, monóxido de carbono, hidrogênio e vapor d'água, que pode ser utilizada na geração de energia, síntese de combustíveis, etanol, acetato e outros produtos por via fermentativa microbiológica (He *et al.*, 2009; YOUNESI *et al.*, 2005).

A Figura 3 relaciona, em valores percentuais, as quantidades de resíduos sólidos descartados (lixo) com os seus diferentes destinos, segundo dados do IBGE do ano de 2000.

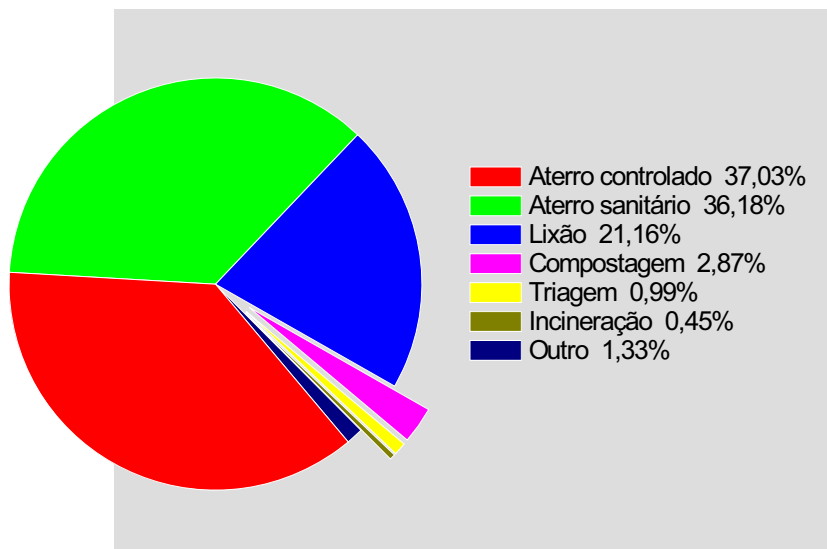


Figura 3: Percentual de lixo coletado segundo o destino final, considerando as regiões metropolitanas e capitais do Brasil (IBGE, 2000).

O manejo ambientalmente saudável dos resíduos deve ir além do simples depósito ou aproveitamento por métodos seguros dos resíduos gerados, buscando resolver a causa fundamental do problema e procurando mudar os padrões não sustentáveis de produção e consumo. Isso implica na utilização do conceito de manejo integrado do ciclo vital, o qual apresenta oportunidade única de conciliar o desenvolvimento com a proteção do meio ambiente. Nesse contexto, serão apresentadas as várias opções para a disposição final e o tratamento de resíduos sólidos, envolvendo a aplicação dos 3 Rs (**R**edução do consumo e desperdício, **R**eutilização de resíduos e **R**eciclagem) (FADINI e FADINI, 2001). É importante ressaltar que o papel da educação é fundamental para a efetiva conscientização da sociedade.

2.4.4. Biodegradação

Os problemas decorrentes da poluição ambiental gerada pelo lixo plástico têm levado a comunidade científica a refletir sobre possíveis alternativas para o problema. Para o gerenciamento do resíduo, a biodegradação é uma das alternativas que tem sido proposta (ROSA *et al.*, 2002).

A biodegradação é um processo natural pelo qual os compostos orgânicos no meio ambiente são convertidos em compostos simples, mineralizados e redistribuídos através dos ciclos tais como, ciclo do carbono, nitrogênio e enxofre. A biodegradação pode ocorrer somente na biosfera, sendo que os microrganismos são os principais responsáveis pela mesma (CHANDRA e RUSTGI, 1998).

A adesão microbiana sobre a superfície do material, bem como a sua colonização é uma etapa importante na biodegradação dos polímeros. Os microrganismos ao colonizar a superfície, formam biofilmes que são células embebidas em uma matriz de biopolímeros constituída de polissacarídeos e proteínas que eles mesmos produzem. Os biofilmes contêm populações de bactérias, fungos e protozoários e, se as condições permitirem, também poderão existir nematóides e larvas (FLEMMING, 1998).

Segundo estabelecido pela American Standard for Testing and Methods (ASTM-D-883-00, 2000), polímeros biodegradáveis são polímeros degradáveis nos quais a degradação resulta primariamente da ação de microrganismos tais como bactérias, fungos e algas de ocorrência natural. Em geral, derivam desse processo CO₂, CH₄, componentes celulares microbianos e outros produtos. A maioria dos compostos de alta massa molar que apresentam biodegradabilidade são poliésteres. Estes são polímeros contendo grupos funcionais ésteres em suas estruturas, que são facilmente atacadas por fungos através de hidrólise (ROSA *et al.*, 2002). Além dos fungos, bactérias e algas também atuam na biodegradação de materiais poliméricos. A biodegradação pode ocorrer em diferentes níveis estruturais: molecular, macromolecular, microscópico e macroscópico, dependendo do mecanismo (SINGH e SHARMA, 2007).

Estudos sobre a biodegradação de polímeros de origem bacteriana mostram que microrganismos secretam despolimerases extracelulares. A primeira descoberta sobre hidrólise de um polímero microbiano por enzimas específicas foi realizada com PHB. O nome destas enzimas (PHB-despolimerases) permaneceu mesmo depois de descobrir que tais enzimas são efetivas na catálise hidrolítica de outros poliésteres. Entretanto, em muitos estudos sobre biodegradação de poliésteres, alguns autores adotam outra nomenclatura, utilizando a abreviatura do nome do poliéster seguido de “despolimerase” (LUCAS *et al.*, 2008).

Dentre as características comuns das hidrolases (por ex. despolimerase) encontra-se o mecanismo de reação que utiliza três aminoácidos, aspartato, histidina e serina. O aspartato interage com o anel da histidina pra formar uma ligação de hidrogênio. O anel da histidina é então orientado para interagir com a serina. A histidina ataca como uma base, desprotonando a serina para gerar um grupo alcóxido muito nucleofílico. Na verdade é este grupo que ataca a ligação éster (o grupo alcóxido é um nucleófilo mais forte do que um grupo álcool) induzindo à formação de um grupo álcool terminal e um complexo acil-enzima. A seguir, a água ataca a ligação acil-enzima para produzir um grupo carboxila terminal e a enzima livre. Esta combinação de serina, histidina e aspartato é denominada de tríade catalítica (LUCAS *et al.*, 2008).

Várias bactérias e fungos capazes de excretar a enzima PHB-despolimerase foram isolados de diversos ambientes, por exemplo, *Acidovorax facilis*, *Aspergillus fumigatus*, *Pseudomonas lemoignei*, *Pseudomonas pickettii* (de solos), *Alcaligenes*

faecalis (de lodo ativado), *Acinetobacter johnsonii*, *Comamonas testosteroni*, *Flavobacterium johnsoniae*, *Pseudoalteromonas haloplanktis*, *Vibrio ordalii*, *Zooglea ramigera* (de água do mar) e *Pseudomonas stutzerii* (de lago) (AKMAL *et al.*, 2002; HOCKING *et al.*, 1996; LEATHERS *et al.*, 2002; SPYROS *et al.*, 1997).

Linos *et al.* (1999) isolaram uma Actinobactéria Gram-positiva, *Gordonia polyisoprenivorans*, de pneu, que demonstrou ser uma potente degradadora de borracha. Estudos realizados por Saeki *et al.* (2009) demonstraram que *Gordonia sp* é produtora de biosurfactantes que podem ser utilizados na remediação de derramamento de petróleo. Esta bactéria também pode ser potencialmente capaz de degradar outros polímeros, tanto sintéticos como naturais.

2.5. Avaliação da Biodegradação

A biodegradação pode ser caracterizada por perda de massa, mudanças na força tênsil, nas dimensões e nas propriedades químicas e físicas, bem como a produção de dióxido de carbono. Geralmente, o processo de degradação afeta a estabilidade térmica, as propriedades mecânicas, a cristalinidade, a distribuição e a espessura das lamelas e começa na interface amorfo/cristalina (SINGH e SHARMA, 2008).

Segundo Chandra e Rustgi (1998), durante a degradação, a cristalinidade do polímero aumenta. Isto é atribuído ao eventual desaparecimento das porções amorfas do polímero. A degradação dessas regiões (amorfas) ocorre antes que a das regiões cristalinas. Os microrganismos produzem enzimas extracelulares responsáveis pela degradação seletiva. Esta seletividade pode ser atribuída à menor organização das regiões amorfas, que permite o fácil acesso das enzimas às cadeias poliméricas.

Algumas características como rugosidade, formação furos ou fraturas, fragmentação, mudanças de cor ou formação de biofilmes na superfície do polímero podem ser indicações de ataque microbiano. Após uma degradação inicial, esferulitos cristalinos aparecem na superfície, o que pode ser explicado pela degradação preferencial da fração amorfa do polímero (SHAH *et al.*, 2008).

Hocking *et al.* (1996) relataram que a despolimerase A isolada de *Pseudomonas lemoignei* apresentou alta eficiência na degradação de ambas regiões (cristalina e amorfa) do PHB. Timmins *et al.* (1996), Tomasi e Scandola (1995) e Nishida e Tokiwa (1993) verificaram em seus estudos que a mudança na cristalinidade do PHB, durante a degradação enzimática, é pequena. Luo e Netravali (2003) constataram que a degradação do PHBV durante a compostagem ocorre na superfície do polímero e não discrimina entre as fases cristalina e amorfa. Estudos realizados por Spyros *et al.* (1997) demonstraram que a degradação do PHB e do PHBV por enzima PHB-despolimerase B de *P. lemoignei* ocorre tanto na fase amorfa como na fase cristalina, sendo que, no estágio inicial, a enzima degrada preferencialmente a fase amorfa; depois, a fase cristalina e, no estágio final, a degradação ocorre em ambas as fases, indiscriminadamente

Outro método empregado para avaliar a biodegradabilidade de polímeros, é o plaqueamento em ágar, que consiste de inoculação de espécies de microrganismos, na presença do polímero como única fonte de carbono, sob condições favoráveis de crescimento. Após a remoção das espécies, são verificadas as mudanças nas propriedades físicas ou químicas do material polimérico (KUMAR *et al.*, 1992). Na avaliação da biodegradabilidade de plásticos, também se utiliza o teste de zona clara em meio ágar sólido (AUGUSTA *et al.*, 1993). O meio sólido contém partículas de polímeros suspensos ou fragmento do filme polimérico e o inóculo de microrganismos específicos como bactéria ou fungo, sobre o polímero. A formação de uma área clara, distinta, em geral de forma circular, indica a degradação do polímero em moléculas menores e/ou solúveis ao redor da colônia (AUGUSTA *et al.*, 1993; SHAH *et al.*, 2008).

Uma vez que a interação entre microrganismos e polímeros inicia-se pela superfície, são empregadas técnicas específicas na análise da superfície polimérica.

2.6. Caracterização dos filmes

As técnicas mais empregadas para investigar as alterações na superfície polimérica têm sido espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier

(FTIR) e com reflectância total atenuada (IR-ATR), microscopia eletrônica de varredura (MEV), absorção no UV-Vis e calorimetria exploratória diferencial (DSC) (RATNER *et al.*, 1993).

2.6.1. FTIR

A técnica de espectroscopia de absorção no infravermelho, com transformada de Fourier (FTIR), é aplicada na investigação estrutural das matrizes poliméricas (BELTRÁN *et al.*, 1997). É uma técnica bastante sensível às pequenas mudanças na matriz polimérica, que é um sistema contendo regiões amorfas e cristalinas. (HONDA e OSAWA, 2002; KARAL, *et al.*, 1997; XU e GUO, 1995).

FTIR tem sido aplicado com sucesso nos estudos de processo de transição de fase cristalino-amorfa dos polímeros, devido ao fato de que as bandas de absorção no infravermelho são sensíveis às mudanças nas interações intermoleculares e intramoleculares, bem como mudanças conformacionais (CONTI *et al.*, 2006).

Os espectros de absorção no infravermelho de polímeros nos estados cristalino e amorfo podem diferir por, pelo menos, duas razões: primeira, interações intermoleculares específicas podem existir no polímero cristalino resultando na separação ou no estreitamento de determinadas bandas; segunda, algumas conformações específicas podem existir em apenas uma das fases, resultando em bandas que são características exclusivas de cada fase do material, amorfo ou cristalino (CONTI *et al.*, 2006). A espectroscopia no infravermelho permite explorar estrutura e interações moleculares em relação aos grupos funcionais. Por esta razão, ela tem sido usada extensivamente para elucidar a estrutura cristalina e amorfa dos polímeros (FURUKAWA *et al.*, 2007).

A técnica de FTIR também tem sido utilizada para detectar produtos de oxidação em filmes de poliolefinas e em PVC fototratado por UV (HOLLANDE e LAURENT, 1997), bem como para analisar possíveis interações entre componentes de blendas após a ação microbiana (CAMPOS *et al.*, 2004).

De acordo com HUANG *et al.* (2005), bandas entre 1000 e 900 cm^{-1} fornecem uma útil região para monitorar propriedades morfológicas, tais como a cristalinidade, do PHB em blendas. As bandas em 1228 e 1279 cm^{-1} são sensíveis à cristalinidade e são atribuídas a vibrações de grupos C – O – C (GALEGO *et al.*, 2000).

Segundo SATO *et al.* (2004 e 2005), a banda em 1720 cm^{-1} é atribuída ao estiramento do grupo C=O da fase cristalina e em torno de 1740 cm^{-1} é atribuída ao estiramento do grupo C=O na fase amorfa.

As bandas em 980, 1230, 1278 e 1724 cm^{-1} aumentam com o aumento da fase cristalina e aquelas em 1186 e 1741 cm^{-1} com a fase amorfa. Na fase cristalina, os segmentos predominantes são formados por estruturas helicoidais (banda em 1230 cm^{-1}), devido à aproximação dos átomos dos grupos carbonilas com os hidrogênios de outros segmentos da molécula. A banda em torno de 1380 cm^{-1} é atribuída à deformação dos grupos CH_3 . As bandas em 1186 e 1133 cm^{-1} são características de estiramento assimétrico e simétrico do grupo C – O – C, respectivamente (XU *et al.*, 2002).

Poucos estudos se referem à região correspondente ao estiramento de C-C (1000-800 cm^{-1}). Cinco bandas cristalinas em 978, 938, 929, 896 e 825 cm^{-1} podem ser identificadas. Percebe-se que uma parte da estrutura molecular dos monômeros de PHB é a mesma do PP e as bandas correspondentes aparecem entre 1000 e 800 cm^{-1} (ZHANG *et al.*, 2005).

2.6.2. Microscopia Eletrônica

A morfologia dos polímeros tem sido investigada utilizando-se técnicas de microscopia eletrônica de varredura (MEV) e transmissão (MET), contribuindo para a elucidação das propriedades e comportamento de materiais poliméricos (KACZMAREK, 1996).

Filmes de PVC submetidos a tratamento biológico, em chorume apresentaram numerosas bolhas na superfície polimérica observadas por MEV (FRANCHETTI *et al.*, 1999).

Segundo Corrêa *et al.* (2008), a biodegradação do PHB ocorre por camadas (layer-by-layer) e a técnica de MEV pode ser utilizada para visualizar ranhuras, fraturas e poros nas amostras de PHB expostas à biodegradação, constituindo evidências de tal processo.

2.7. Caracterização do Rio Atibaia

O rio Atibaia localiza-se na bacia hidrográfica do Rio Piracicaba, SP, Brasil, é um dos afluentes do Rio Tietê, possui cerca de 182 km de extensão e sofre um desnível altimétrico de 238 m. A região caracteriza-se pela intensa exploração agrícola (principalmente culturas de milho, cana-de-açúcar e cítricos), industrialização e desenvolvimento populacional. Em determinados segmentos não atende às especificações presentes na legislação para águas de abastecimento público (COMITÊ DAS BACIAS HIDROGRÁFICAS DOS RIOS PIRACICABA, CAPIVARI E JUNDIAÍ, 2000; UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA, 2001).

Segundo a pesquisadora Maria Rejane Siviero numa entrevista ao Jornal da Unicamp em outubro de 2003, as cidades Campinas, Valinhos, Vinhedo, Itatiba, Morungaba, Jarinu, Bragança Paulista e Atibaia lançam grande volume de esgoto doméstico e industrial no Rio Atibaia.

A refinaria de petróleo localizada na cidade de Paulínia, faz parte do pólo petroquímico de Paulínia, captando água do Rio Jaguari e descartando seu efluente no Rio Atibaia. Esses dois rios, em confluência, formam o Rio Piracicaba. O Rio Atibaia recebe nesta região grande aporte de esgoto urbano vindo da cidade de Campinas, Sumaré e Paulínia fazendo com que a qualidade da água deste corpo hídrico seja deteriorada neste ponto (CETESB, 2002).

A degradação dos filmes depende do tipo de ambiente e da microbiota envolvida, uma vez que as interações interfaciais polímero/meio/microrganismos são relevantes para o processo de biodegradação.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Material

3.1.1. Polímeros

Os polímeros utilizados foram polipropileno (PP), Suzano Petroquímica S.A., TS-6.100, M_w 145.000 g.mol⁻¹ e Poli(β -hidroxibutirato) (PHB), M_w 603.810 g.mol⁻¹, doação do Depto de Engenharia de Materiais - DEMA-UFSCar, São Carlos-SP.

3.1.2. Fonte dos microrganismos

Os microrganismos envolvidos nos ensaios de biodegradação foram os autóctones presentes nas águas do Rio Atibaia e no efluente bruto da refinaria de petróleo.

3.1.3. Meios de cultivo

Meio de cultura “plate count agar” (PCA) para plaqueamento e contagem de microrganismos. Composição do meio de cultura PCA (m/v) segundo Atlas (2004): 0,5% peptona; 0,25% extrato de levedura; 0,1% glicose; 1,5% ágar; água destilada; pH 7,0 (\pm 0,2) a 25° C.

Meio de cultura “ágar nutriente” (AN) para isolamento de bactérias. Composição do meio de cultura NA (m/v) segundo a Anvisa (2004): 0,3% extrato de carne; 0,5% peptona; 1,5% ágar; água destilada; pH 6,8 (\pm 0,2) a 25° C.

3.1.4. Meios de biotratamento

Os meios de biotratamento foram água do rio Atibaia coletada à montante e jusante, ou seja, antes e depois do descarte do efluente industrial de refinaria de petróleo, bem como o efluente bruto.

3.1.5. Equipamentos

- Balança analítica da marca CHYO modelo JK 200;
- Câmara digital da marca Sony modelo DSC P93;
- Espectrofotômetro IR com transformada de Fourier, marca Shimadzu, modelo FTIR – 8300;
- Estufa bacteriológica, modelo SL-101, marca SOLAB Equipamentos para Laboratórios;
- Frascos Erlenmeyer de 300 mL;
- Micrometro, marca Mitutoyo, modelo no. 7301;
- Microscópio eletrônico de varredura, marca Zeiss, modelo DSM 940-A;
- Microscópio óptico, marca BEL[®] photonics, B4 model, optech: optical technology Germany;
- Prensa hidráulica com aquecimento modelo SL–099, marca SOLAB.

3.2. Métodos

3.2.1. Preparo dos filmes e blendas

Filmes de 70µm de espessura foram obtidos por ~~pressão~~ dos polímeros em prensa aquecida (Fig. 4) sob temperatura de 175° C e 0,8 toneladas de pressão por

2 minutos e resfriados em temperatura ambiente de 25 a 26° C por 40 minutos. Nos filmes de PP e PHB foram utilizados 0,2g de cada polímero em pó. Os filmes da blenda (50% de PP e 50% de PHB) foram obtidos utilizando-se 0,1g de cada homopolímero.



Figura 4: prensa hidráulica com aquecimento modelo SL-099, marca SOLAB.

3.2.2. Preparo dos meios de tratamento microbiano

Como meio de tratamento, utilizou-se a água do Rio Atibaia coletada em dois pontos, montante (antes do descarte) e jusante (após o descarte do rejeito tratado da refinaria de petróleo) e, ainda, o efluente bruto, no qual a contagem microbiana foi maior. Os microrganismos autóctones, isto é, a própria microbiota dos respectivos meios, foram preservados e ativados com húmus de minhoca, a fim de aumentar a população microbiana.

Os meios para tratamento dos filmes foram classificados em A, B e C conforme a Figura 5.

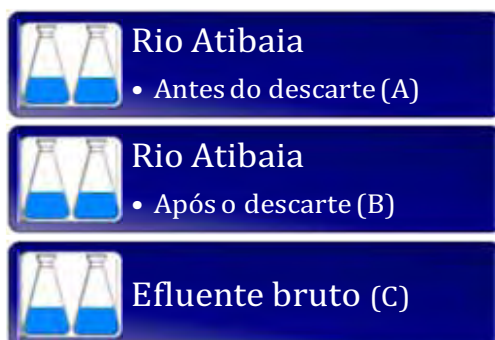


Figura 5: Meios empregados no tratamento dos filmes.

3.2.3. Tratamento microbiano

Os ensaios foram realizados em duplicatas. A cada Erlenmeyer foram adicionados 250 mL de meio líquido e 1,5 g de húmus de minhoca autoclavado.

Os meios líquidos não foram esterilizados, pois se pretendia verificar a biodegradação dos polímeros promovida pela microbiota do rio e do efluente.

O húmus foi esterilizado, uma vez que, sua função era servir de fonte inicial de carbono para o aumento populacional dos microrganismos presentes nos meios líquidos.

Como controle, foram mantidos, em duplicatas, frascos contendo 250 mL dos meios líquidos (A, B e C) com 1,5 g de húmus e, também, sem húmus. Para verificar a possibilidade de hidrólise química dos polímeros, amostras de filmes foram adicionados aos meios líquidos (A, B e C) autoclavados, bem como, em água destilada (Fig. 6).

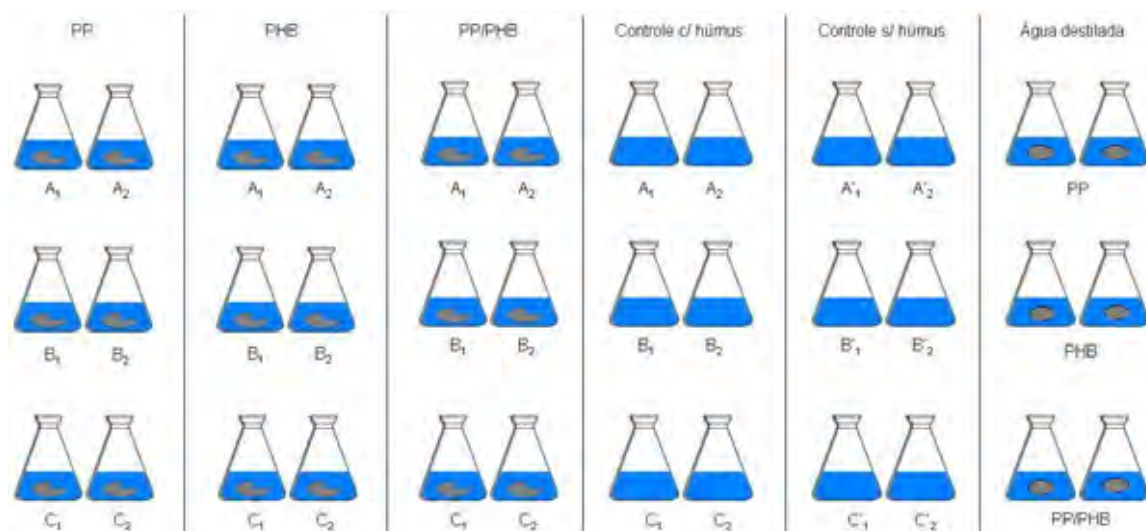


Figura 6: Tratamento microbiano dos filmes de PP, PHB e blenda de PP/PHB em 3 condições: A₁ e A₂ – Rio Atibaia antes do descarte; B₁ e B₂ – Rio Atibaia após o descarte; C₁ e C₂ – Efluente bruto. Obs.: Controles dos meios com/sem húmus e controle dos filmes em meios autoclavados e água destilada para verificar possível hidrólise.

Todos os frascos foram mantidos fechados com folha de alumínio em incubadora a 28° C. Transcorridos cinco dias de incubação, tempo para que a população microbiana aumentasse devido à fonte de carbono oferecida pelo húmus,

os filmes foram, então, colocados nos meios líquidos, onde permaneceram por 120 dias.

Obs.: De cada filme, foi removido $\frac{1}{4}$ (um quarto), que ficou guardado (filme original) para posterior comparação, submetendo-se $\frac{3}{4}$ (três quartos) ao biotratamento (filme biotratado).

3.2.4. Plaqueamento e contagem microbiana

Para verificar a quantidade de microrganismos presentes no efluente bruto e na água do rio Atibaia no início e no fim dos tratamentos dos filmes, realizou-se um plaqueamento inicial, após cinco dias de incubação e outro final, após os 120 dias de tratamento dos filmes em meio PCA pelo método *pour plate*.

As placas foram mantidas em estufa à temperatura de 35° C por cinco dias, quando procedeu-se a contagem, que foi expressa em unidades formadoras de colônias (UFC).

3.2.5. Isolamento bacteriano

Das placas obtidas após a contagem microbiana final, foram isoladas bactérias pelo método de estriamento em placa contendo meio de cultura ágar nutriente (AN) (PELCZAR *et al.*, 1997).

3.2.6. Identificação de bactéria

Um biotipo de colônia de bactéria destacou-se numericamente no biotratamento dos filmes, sendo isolada em meio de cultura agar nutriente por espalhamento, purificada por estriamento e enviada para identificação, que foi realizada pelo Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA) da Universidade Estadual de Campinas, utilizando dados moleculares de seqüenciamento e análise filogenética de fragmentos do gene RNA ribossomal 16S (LINOS *et al.*, 1999).

3.2.7. Análise visual

Os frascos contendo filme durante o ensaio foram fotografados com câmara digital da marca Sony modelo DSC P93.

3.2.8. Microscopia optica

Os filmes originais e biotratados foram analisados em microscópio óptico, marca BEL[®] photonics, B4 model, optech: optical technology Germany.

3.2.9. Medidas de massa

As massas dos filmes, antes e após o biotratamento, foram obtidas em balança analítica da marca CHYO modelo JK 200.

3.2.10. Contagem microbiana

Para monitorar a quantidade de microrganismos presentes na água do rio no início e no fim do tratamento dos filmes, utilizou-se a técnica do número mais provável com um plaqueamento inicial e outro final, após os 120 dias, em meio PCA pelo método *pour plate*. As contagens foram expressas em unidades formadoras de colônias (UFC).

3.2.11. Espectroscopia de absorção no infravermelho (FTIR)

Os filmes originais e biotratados foram analisados por FTIR, em espectrofotômetro IR com transformada de Fourier, marca Shimadzu, modelo FTIR – 8300, com resolução 4cm^{-1} . Aos espectros obtidos foi aplicado um tratamento matemático (desconvolução) para melhorar a resolução das bandas (Software: Origin 8.0, função Lorentziana, aplicada às bandas de carbonila, desconvoluídas para 2 bandas).

3.2.12. Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Os filmes originais e biotratados foram analisados sobre suportes de alumínio e recobertos com ouro, em câmara a vácuo, utilizando o metalizador MED 010, marca Balzers, com “sputtering”, num microscópio eletrônico de varredura (MEV) Zeiss DSM 940-A, à 3KV (Núcleo de Apoio à Pesquisa em Microscopia Eletrônica Aplicada à Agricultura-NAP/MEPA/Esalq/USP-Piracicaba, SP).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após incubação por 120 dias, os filmes de PP, PHB e blenda foram analisados, a fim de verificar mudanças ocorridas durante o biotratamento.

Em um dos frascos contendo efluente bruto, verificou-se que o filme de PHB degradou em 15 dias, destacando-se dos demais. Deste frasco foram retiradas alíquotas para isolamento e identificação dos microrganismos presentes. Do isolamento, resultou uma linhagem que se destacou na degradação. Esta linhagem foi identificada como sendo uma actinobactéria (actinomiceto) da espécie *Gordonia polyisoprenivorans*, degradadora de borracha descrita por Linos *et al.* (1999).

4.1. Análise visual

4.1.1. Filmes de PHB

Nos biotratamentos em água do Rio Atibaia antes do descarte do efluente (Fig. 7-a), o filme ficou recoberto com uma camada fina e clara de biofilme. No biotratamento em água do Rio Atibaia após o descarte do efluente (Fig. 7-b), o filme ficou totalmente coberto por um biofilme escuro e espesso. O ensaio correspondente ao efluente bruto (Fig. 7-c) apresentou degradação mais acentuada dos filmes de PHB, com turvação do líquido após 15 dias de biotratamento e sinais de deterioração dos filmes. Após seis semanas de tratamento neste meio, foi impossível recuperá-los para análises. Deste meio foi isolada e identificada a bactéria *Gordonia polyisoprenivorans* (Fig. 8)

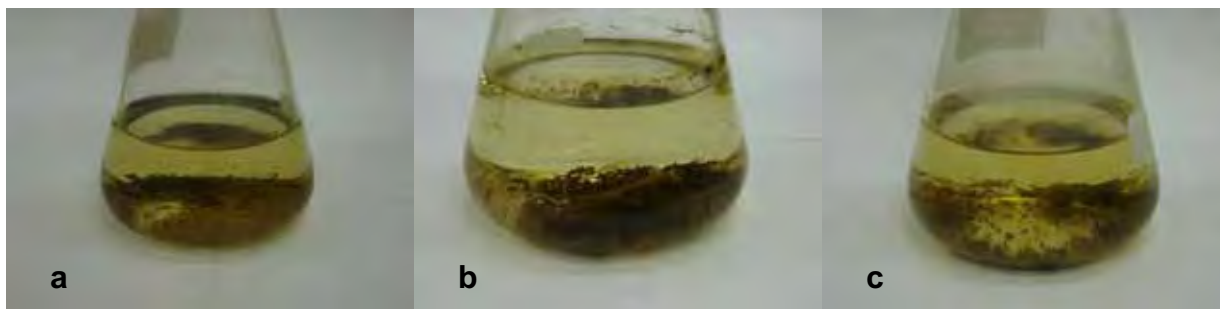


Figura 7: Filmes de PHB em água do rio Atibaia após 90 dias de biotratamento: (a) antes do descarte do efluente, (b) após o descarte do efluente e (c) efluente bruto.

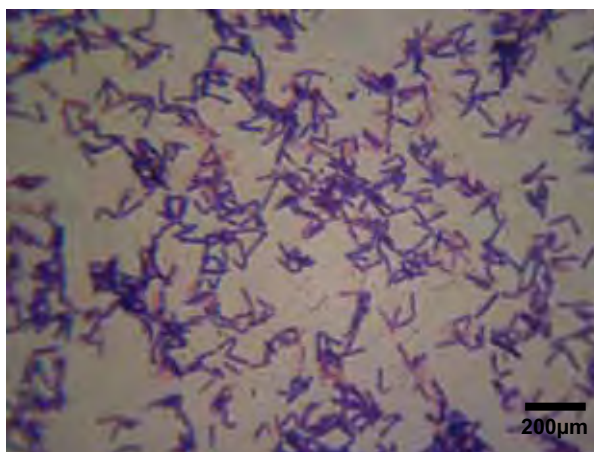


Figura 8: *Gordonia polyisoprenivorans* isolada do meio de biotratamento correspondente ao efluente bruto.

4.1.2. Blendas de PP/PHB

As blendas continham um claro e fino biofilme em toda sua superfície, indicando a colonização das mesmas por microrganismos.

O biofilme formado sobre a blenda submetida ao biotratamento em efluente bruto era mais escuro que os submetidos ao biotratamento em água do rio Atibaia (Fig. 9).



Figura 9: Blendas de PP/PHB em água do rio Atibaia após 120 dias de biotratamento: (a) antes do descarte do efluente, (b) após o descarte do efluente e (c) efluente bruto.

4.1.3. Filmes de PP

Os filmes de PP não apresentaram biofilme que pudesse ser visualizado ao olho nu, portanto não foram fotografados.

4.2. Microscopia óptica

Os filmes foram retirados de seus respectivos meios de biotratamento, e observados ao microscópio óptico, visualizando-se bactérias, fungos e protozoários sobre os mesmos.

O filme de PHB original apresentou em sua superfície marcas de riscos e ranhuras da base metálica da prensa e do Teflon® no qual o filme foi produzido (Fig. 10-a). Após o biotratamento em água do rio Atibaia, tais marcas não foram mais visualizadas, sugerindo que essa camada com as impressões dos riscos fora removida do filme, expondo camadas mais internas (Fig. 10-b e 10-c).

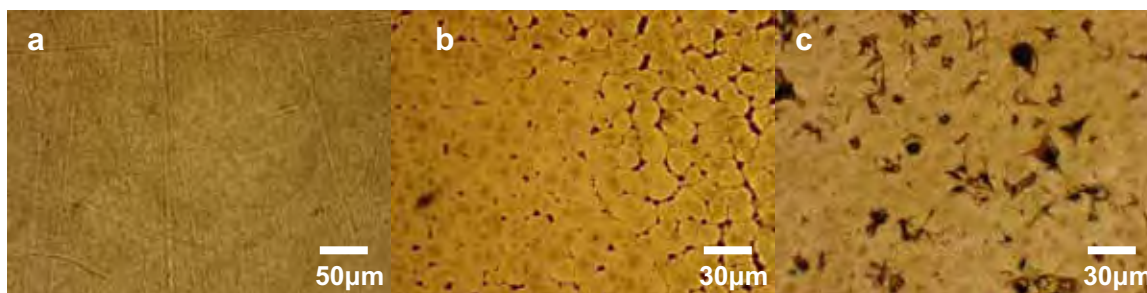


Figura 10: Filme de PHB: (a) filme original e filme biotratado em água do rio Atibaia: (b) antes e (c) após o descarte do efluente bruto.

Os filmes originais de PP/PHB também apresentaram riscos e outras marcas da prensa e do Teflon®, além de fases distintas, presença de heterogeneidades (Fig. 11-a).

Após o biotratamento em efluente bruto, a blenda sofreu significativas modificações em sua superfície, apresentando furos (Fig. 11-b) e remoção de camadas, descamações (Fig. 11-c).



Figura 11: Blenda de PHB/PP (a) original; (b) e (c) biotratada em efluente bruto por 120 dias.

Blendas submetidas ao tratamento em água do rio Atibaia, antes e após o descarte do efluente, sofreram modificações em suas superfícies, inclusive alteração de cor (Fig. 12).

Segundo Flemming (1998), biofilmes podem conter microrganismos que produzem pigmentos. Alguns destes pigmentos, em particular aqueles formados por algumas linhagens de fungos, são lipofílicos e tendem a difundir para dentro da matriz lipofílica do polímero.

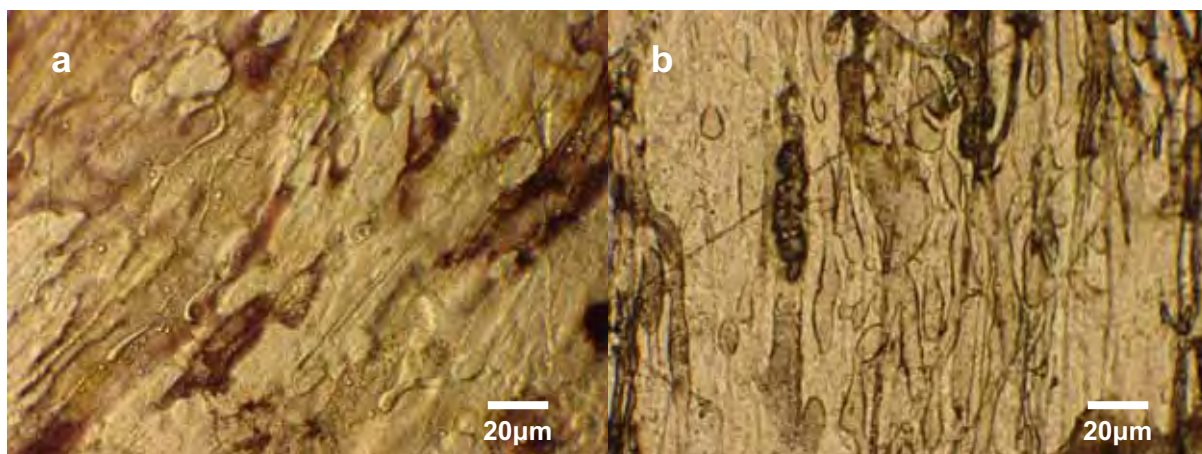


Figura 12: Blendas biotratadas em água do rio Atibaia: (a) antes e (b) após o descarte do efluente bruto.

Os filmes de PP não apresentaram modificações observadas por microscopia óptica. Segundo Arcana *et al.* (2006), o polipropileno é resistente à decomposição por microrganismos no meio ambiente.

4.3. Variação de massa

A determinação da perda de massa é o método mais comumente aplicado e relativamente sensível para determinar mudanças causadas pelo ataque microbiano nos polímeros (FLEMMING, 1998).

Comparando as variações de massa ocorridas nos meios de biotratamento, tanto a blenda como o PHB sofreram maior perda de massa no biotratamento em efluente bruto. Os filmes tratados em água do rio Atibaia após o descarte do efluente apresentaram maior perda de massa do que os tratados em água antes de receber o descarte (Tabela 1). Tal fato sugere que existe relação entre a taxa de biodegradação dos filmes e o efluente lançado no rio Atibaia.

Tabela 1: Valores percentuais de perda de massa dos filmes de blenda (PP/PHB) e homopolímeros submetidos ao biotratamento.

Filmes	Perda de massa (%)			
	Antes do descarte	Após o descarte	Efluente bruto	Controle
Blenda	25	26	36	---
PP	---	---	---	---
PHB	55	66	~100	---

Comparando-se as variações de massa dos filmes, a Tabela 1 indica que o PHB sofreu maior perda de massa em relação à blenda. Ao passo que o PP não apresentou perdas de massa em nenhum dos biotratamentos.

A variação de massa evidencia que a biodegradação nas blendas de PP/PHB (1:1) foi menor que no PHB, homopolímero. Este resultado indica que os microrganismos presentes no meio podem ter produzido enzimas que hidrolisaram o PHB. Estes resultados concordaram com Arcana *et al.* (2006), que realizaram experimentos com PHB e blendas de PHB/PP utilizando microrganismos de lodo ativado, observando que a biodegradação em blendas é menor do que no homopolímero (PHB) e constatou que a biodegradabilidade tende a aumentar lentamente com o aumento da fração de PHB contida na blenda.

4.4. Contagem microbiana

Na tabela 2 estão apresentados os valores relativos à contagem microbiana em unidades formadoras de colônias (UFC). Seguindo o método *pour plate* em meio de cultura PCA.

A contagem é maior no efluente bruto, seguida da água do rio Atibaia após o descarte e, finalmente, da água do rio Atibaia antes do descarte. Observa-se que após 120 dias, o número de UFC por mL diminuiu em todos os biotratamentos, sendo que nos meios em que havia o filme de PHB a contagem manteve-se maior em relação à blenda e esta em relação ao PP, evidenciando que o PHB constitui

uma fonte de carbono que alguns microrganismos podem utilizar para o seu desenvolvimento (SHIMAO, 2001).

Tabela 2: Contagem microbiana em unidades formadoras de colônias por mL de água do rio Atibaia antes e após do descarte do efluente e efluente bruto.

Unidades formadoras de colônias. mL ⁻¹				
Tempo (dias)		Antes do descarte	Após o descarte	Efluente bruto
5 (inicial)		2,8x10 ⁵	3,1x10 ⁶	2,9x10 ⁸
	Blenda	1,8x10 ³	1,2x10 ³	2,4x10 ⁴
120 (final)	PP	1,4x10 ²	2,1x10 ²	3,1x10 ²
	PHB	2,6x10 ⁴	3,0x10 ⁵	1,7x10 ⁷

Em relação ao PP sua hidrofobicidade limita a interação entre o polímero e as enzimas, dificultando o ataque das mesmas e, conseqüentemente, a biodegradação (ARCANA, 2006). Por isso, a contagem foi menor nos biotratamentos em que havia PP, uma vez que este polímero não serviu de fonte de carbono aos microrganismos.

Nos meios que continham a blenda, microrganismos se desenvolveram e se mantiveram em maior número em relação ao PP, provavelmente devido à fração PHB constituinte da blenda.

4.5. FTIR

Estas medidas analisam os filmes originais em comparação com os biotratados.

Os espectros dos filmes de PHB e blenda foram normalizados pela intensidade de absorvância de uma banda considerada de padrão interno em 1380 cm⁻¹, atribuída à deformação simétrica de grupos CH₃. Para os espectros de PP, o padrão foi 1461 cm⁻¹, banda atribuída ao estiramento dos grupos CH₂ (BLOEMBERGEN *et al.*, 1986; FURUKAWA *et al.*, 2007; HADAD *et al.* 2005; XU *et al.*,

2002) e deconvoluídos pela função Lorentziana (FORATO *et al.*, 1997; KANSIZ *et al.*, 2007), para obter melhor resolução das bandas (separação em picos).

Foram consideradas alterações espectrais como aumento ou diminuição de intensidade (mais que 10%), deslocamento, aparecimento e desaparecimento de banda(s).

É importante observar que os filmes de PHB e blends não sofreram reação de hidrólise química nos controles (água do rio autoclavada e água destilada). Portanto, as mudanças espectrais verificadas por FTIR foram atribuídas à ação microbiana.

4.5.1. Filmes de PHB

A figura 13 compara os espectros de FTIR dos filmes de PHB original (a) com o biotratado (b) em água do rio Atibaia antes do descarte do efluente da Replan. A partir destes foram obtidos os índices de carbonila apresentados na Tabela 3.

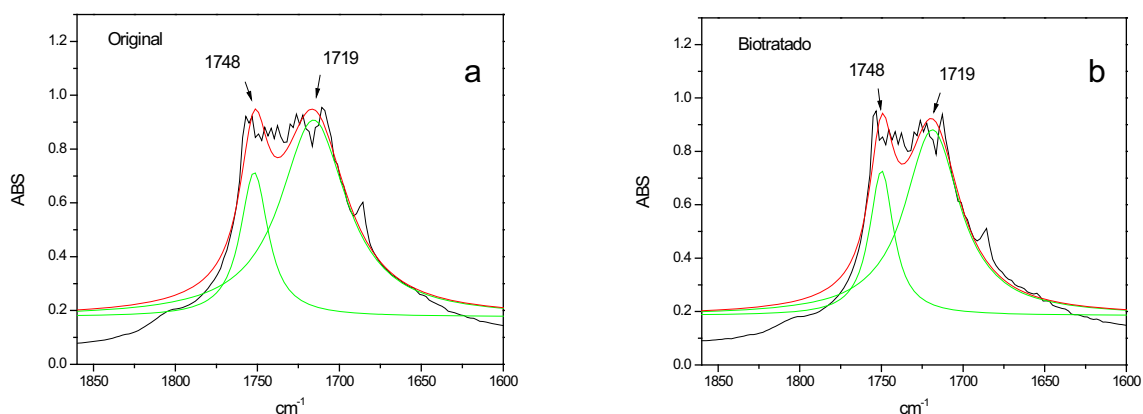


Figura 13: Espectros de FTIR com ajuste Lorentziano de filmes de PHB original (a) e biotratado (b), na faixa de 1860 – 1600 cm^{-1} , em água do rio Atibaia antes do descarte do efluente. Obs.: absorvância em 1380 cm^{-1} como padrão interno.

Tabela 3: Índices de Carbonila de fase amorfa e cristalina calculados para filmes de PHB original e biotratado em água do Rio Atibaia antes do descarte do efluente.

Índice de Carbonila		
PHB	Original	Biotratado
Fase amorfa (ABS _{1748/1380})	0,54	0,53
Fase cristalina (ABS _{1719/1380})	0,73	0,70

A figura 14 apresenta outra faixa do espectro de FTIR (1500 – 1000 cm⁻¹) para o PHB original e biotratado em água do Rio Atibaia antes do descarte do efluente.

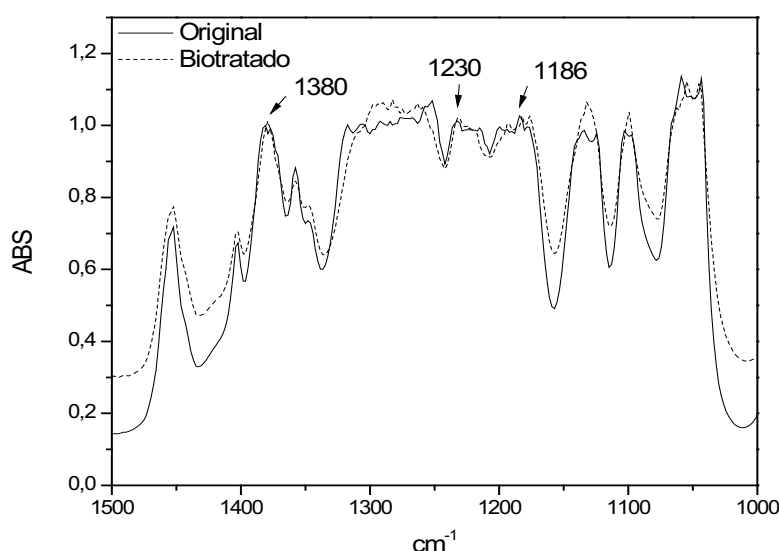


Figura 14: Espectros de FTIR de filmes de PHB original e biotratado, na faixa de 1500 – 1000 cm⁻¹, em água do rio Atibaia antes do descarte do efluente. Obs.: absorvância em 1380 cm⁻¹ como padrão interno.

A Tabela 4 compara índices de fase amorfa e de fase cristalina dos filmes de PHB original e biotratado em água do rio Atibaia antes do descarte do efluente. Para isso foram utilizados os dados da figura 14, dividindo-se os valores de absorvância da banda em 1186 cm⁻¹ atribuída ao estiramento simétrico de grupo C-O-C de fase amorfa e da banda em 1230 cm⁻¹ atribuída à conformação helicoidal de cadeia (fase cristalina) pela banda de referência em 1380 cm⁻¹, mantida como padrão interno (BLOEMBERGEN *et al.*, 1986; XU *et al.*, 2002).

Tabela 4: Índices de fase amorfa e cristalina de filmes de PHB original e biotratado em água do rio Atibaia antes do descarte do efluente.

PHB	Original	Biotratado
Fase amorfa ($ABS_{1186/1380}$)	0,54	0,53
Fase cristalina ($ABS_{1230/1380}$)	0,73	0,70

Os índices de fase amorfa e fase cristalina, calculados a partir das bandas de carbonila, bem como os calculados a partir dos grupos C-O-C e conformação helicoidal de cadeia evidenciam que não houve diferenças significativas entre as fases (amorfa e cristalina) após o biotratamento dos filmes de PHB em água do Rio Atibaia antes do descarte do efluente. Sugerindo que a degradação evidenciada pela perda de massa ocorre em ambas as fases, amorfa e cristalina.

A figura 15 compara os espectros de FTIR dos filmes de PHB original (a) com o biotratado (b) em água do Rio Atibaia após o descarte do efluente da Replan. A partir destes foram obtidos os índices de carbonila apresentados na Tabela 5.

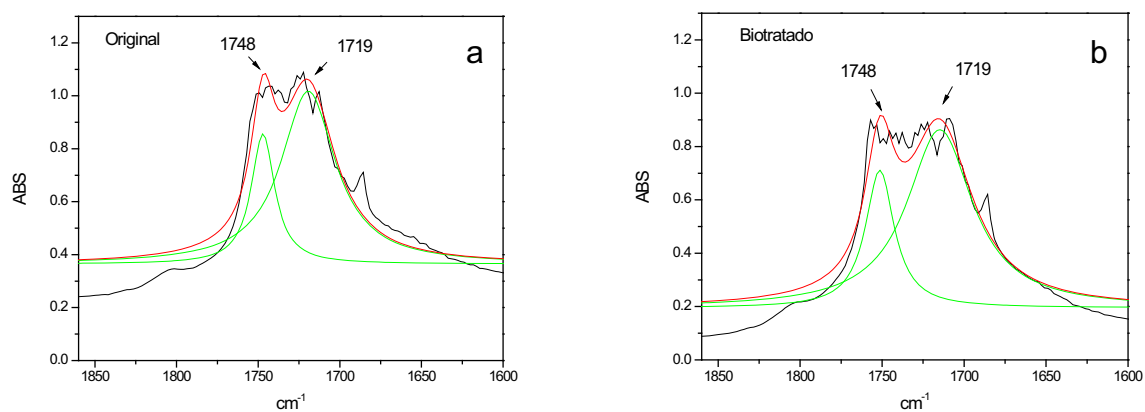


Figura 15: Espectros de FTIR com ajuste Lorentziano de filmes de PHB original (a) e biotratado (b), na faixa de 1860 – 1600 cm^{-1} , em água do rio Atibaia após o descarte do efluente. Obs.: absorvância em 1380 cm^{-1} como padrão interno.

Tabela 5: Índices de Carbonila de fase amorfa e cristalina calculados para filme de PHB original e biotratado em água do Rio Atibaia após o descarte do efluente.

Índice de Carbonila		
PHB	Original	Biotratado
Fase amorfa (ABS _{1748/1380})	0,51	0,49
Fase cristalina (ABS _{1719/1380})	0,67	0,65

Em relação ao índice de carbonila, não há diferença significativa entre fases amorfa e cristalina, sugerindo que o ataque enzimático (microbiano) ocorre em ambas as fases, diminuindo, tanto a carbonila da fase amorfa como da fase cristalina.

A figura 16 apresenta outra região do espectro de FTIR (1500 – 1000 cm⁻¹) para o PHB original e biotratado em água do Rio Atibaia após o descarte do efluente.

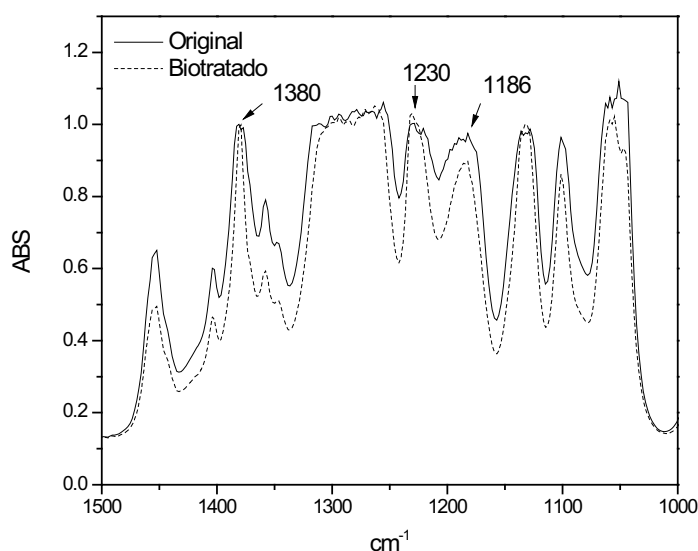


Figura 16: Espectros de FTIR de filmes de PHB original e biotratado, na faixa de 1500 – 1000 cm⁻¹, em água do rio Atibaia após o descarte do efluente. Obs.: absorvância em 1380 cm⁻¹ como padrão interno.

A Tabela 6 compara índices de fase amorfa e de fase cristalina, relativos às bandas em 1186 cm⁻¹ e 1230 cm⁻¹, respectivamente, dos filmes de PHB original e biotratado em água do Rio Atibaia após o descarte do efluente.

Tabela 6: Índices de fase amorfa e cristalina de filmes de PHB original e biotratado em água do Rio Atibaia após o descarte do efluente.

PHB	Original	Biotratado
Fase amorfa (ABS _{1186/1380})	0,96	0,89
Fase cristalina (ABS _{1230/1380})	1,00	1,03

Os dados da Tabela 6 permitem inferir que houve uma diminuição de ambas as fases após o biotratamento, sendo que o consumo da fase amorfa foi maior. Isto pode ser explicado pelo fato de o ataque enzimático ocorrer nas extremidades das cadeias, principalmente da fase amorfa. Para que o índice de fase cristalina se mantivesse praticamente inalterado após o biotratamento, levando em consideração que houve perda de massa, houve consumo da fração cristalina, caso contrário esta teria aumentado significativamente, sendo verificado pela banda em 1230 cm⁻¹.

Segundo Bonartseva *et al.* (2002) e Chandra e Rustgi (1998), a degradação do PHB é seguida de aumento de cristalinidade do polímero. Enquanto que Spyros *et al.* (1997) verificaram que pode ocorrer degradação de ambas as fases e isto depende do tipo de enzima, microrganismo e do tempo de biotratamento do polímero. Timmins *et al.* (1996) explicaram que, como a degradação das regiões cristalinas ocorreram na mesma proporção das regiões amorfas, então a razão entre fases amorfa e cristalina se mantiveram constante no material remanescente. Spyros *et al.* (1997) explicam que a cristalinidade pode afetar a taxa total de degradação devido a mudanças de características da interface amorfa/cristalina, bem como das características da superfície do filme, como sua hidrofobicidade, modificando, assim, a interação com as enzimas.

4.5.2. Filmes de PP

Os filmes de PP não sofreram mudanças quando analisados por FTIR.

O que é mostrado na figura 17 ocorre com os filmes de PP originais e biotratados nos meios propostos neste trabalho.

Segundo Arcana *et al.* (2006), o PP é um polímero que resiste à umidade devido a suas propriedades hidrofóbicas o que dificulta o ataque enzimático, tornando-o resistente à decomposição por microrganismos no ambiente.

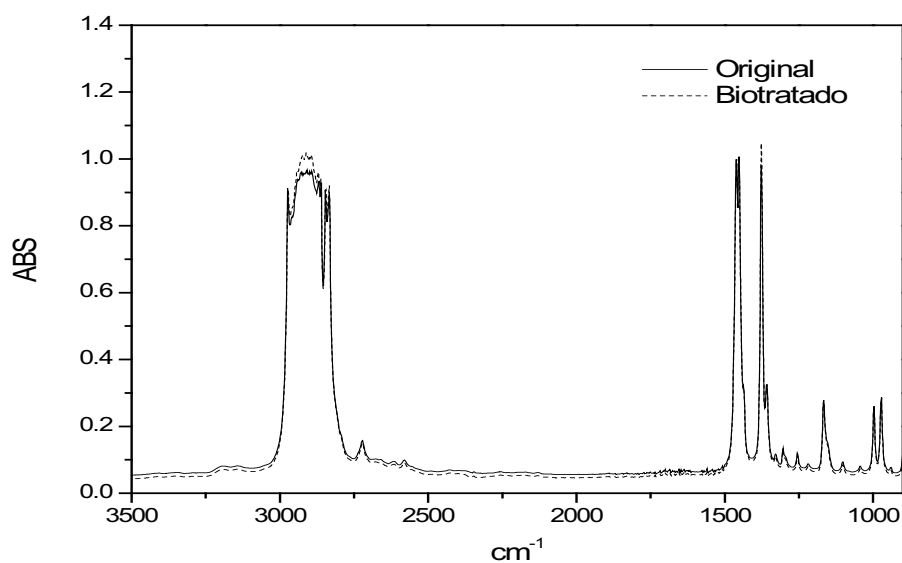


Figura 17: Espectros de FTIR de filmes de PP original e biotratado em efluente bruto, na faixa de 3500 – 1000 cm⁻¹. Obs.: absorvância em 1461 cm⁻¹ como padrão interno.

4.5.3. Blendas de PP/PHB

A blenda biotratada em água do rio Atibaia antes do descarte do efluente apresentou diminuição na intensidade das bandas em 1745 e 1721 cm⁻¹, atribuídas ao estiramento de grupos C=O de fase amorfa e cristalina respectivamente (FURUKAWA *et al.*, 2007; XU *et al.*, 2002) (Fig. 18).

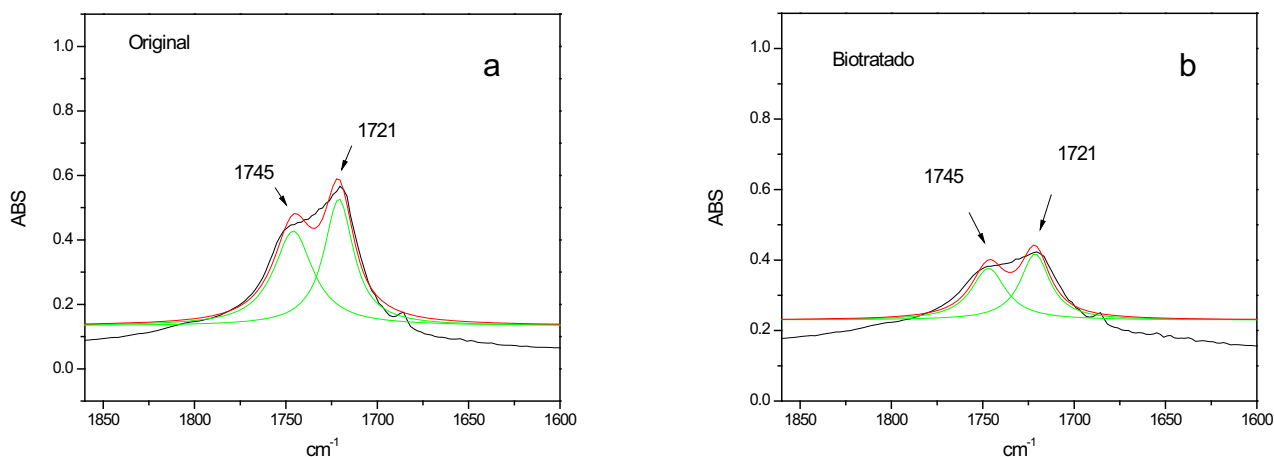


Figura 18: Espectros de FTIR com ajuste Lorentziano de blenda original (a) e biotratada (b), na faixa de 1850 – 1600 cm^{-1} , em água do Rio Atibaia antes do descarte do efluente. Obs.: absorvância em 1380 cm^{-1} como padrão interno.

A Tabela 7 compara índices de carbonila de fase amorfa (1745 cm^{-1}) e de fase cristalina (1721 cm^{-1}) dos filmes de blenda PP/PHB original e biotratado em água do Rio Atibaia antes do descarte do efluente.

Tabela 7: Índices de Carbonila de fase amorfa e cristalina calculados para filmes da blenda de PHB/PP original e biotratado em água do Rio Atibaia antes do descarte do efluente.

Índice de Carbonila		
PP/PHB	Original	Biotratado
Fase amorfa ($A_{1745/1380}$)	0,29	0,14
Fase cristalina ($A_{1721/1380}$)	0,39	0,19

Após o biotratamento em água do Rio Atibaia antes do descarte do efluente houve uma diminuição em torno de 52% do índice de carbonila, tanto para a fase amorfa, como para a fase cristalina. Evidenciando a degradação proporcional de ambas as fases devido à solubilização dos compostos oxidados após o ataque microbiano.

A partir dos dados obtidos dos espectros de FTIR dos filmes de blenda original e biotratado em água do Rio Atibaia após o descarte do efluente (Fig. 19),

foram calculados os índices de carbonila amorfa e cristalina apresentados na Tabela 8.

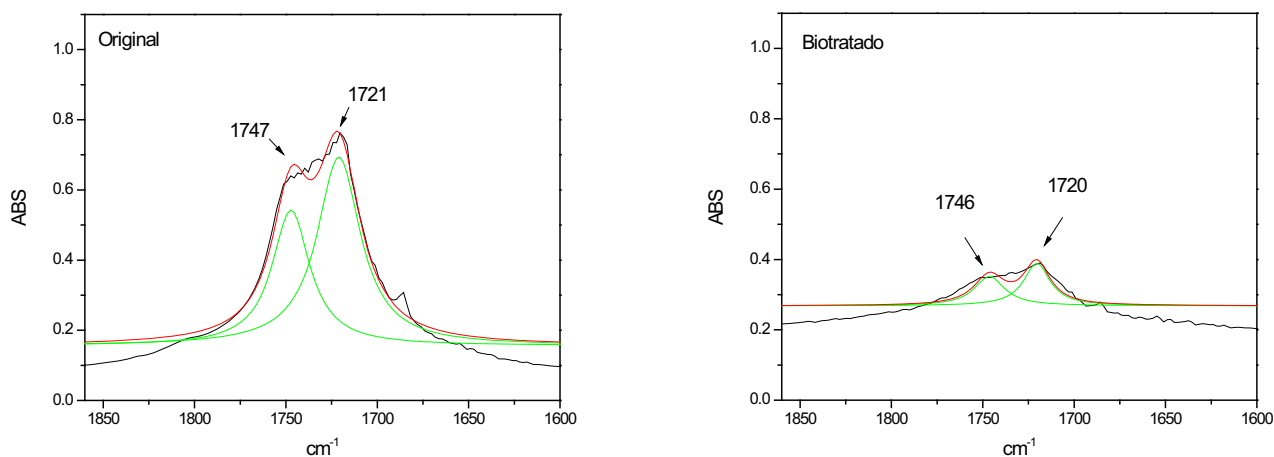


Figura 19: Espectros de FTIR com ajuste Lorentziano de blenda original (a) e biotratada (b), na faixa de 1850 – 1600 cm^{-1} , em água do rio Atibaia após o descarte do efluente. Obs.: absorvância em 1380 cm^{-1} como padrão interno.

A Tabela 8 compara os índices de carbonila de fase amorfa e cristalina dos filmes da blenda de PP/PHB original e biotratado em água do Rio Atibaia após o descarte do efluente.

Tabela 8: Índices de Carbonila de fase amorfa e cristalina calculados para filmes de blenda PHB/PP original e biotratado em água do Rio Atibaia após o descarte do efluente.

Índice de Carbonila		
PP/PHB	Original	Biotratado
Fase amorfa ($\text{ABS}_{1745/1380}$)	0,38	0,08
Fase cristalina ($\text{ABS}_{1721/1380}$)	0,54	0,12

Houve uma diminuição proporcional de cerca de 78% dos índices de carbonila tanto amorfa como cristalina após o biotratamento, concordando com Spyros *et al.* (1997).

No presente trabalho, verificou-se que houve diminuição proporcional de fase amorfa e cristalina para a fração PHB da blenda de PHB/PP.

É provável que a diminuição dos índices de carbonila de fase amorfa e de fase cristalina também tenha sido proporcional na blenda biotratada em efluente bruto (Fig. 20).

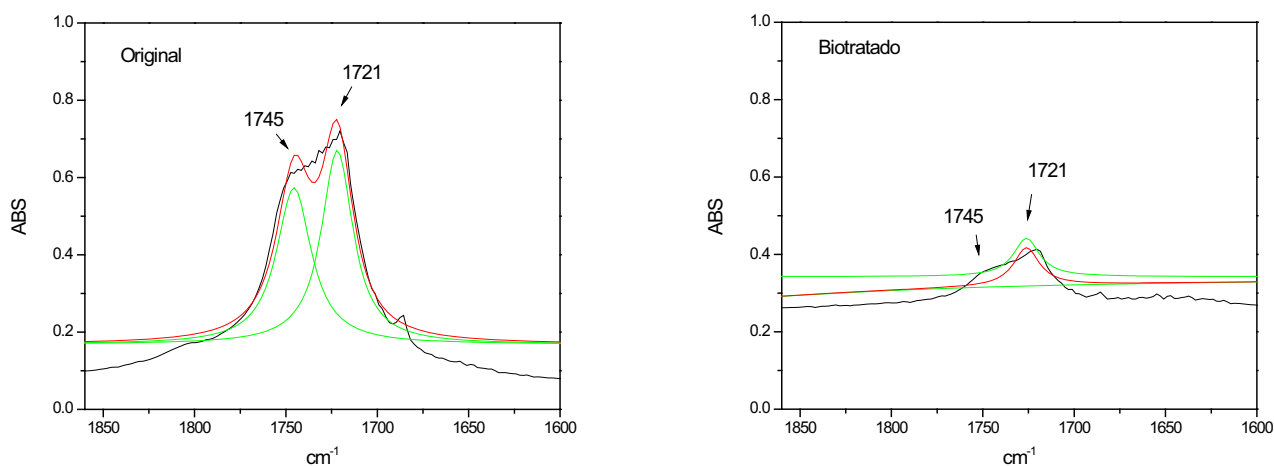


Figura 20: Espectros de FTIR com ajuste Lorentziano de blenda original (a) e biotratada (b), na faixa de 1850 – 1600 cm^{-1} , em efluente bruto. Obs.: absorvância em 1380 cm^{-1} como padrão interno.

A Tabela 9 compara os índices de carbonila de fase amorfa e cristalina dos filmes de blenda PP/PHB original e biotratado em efluente bruto.

Tabela 9: Índices de Carbonila de fase amorfa e cristalina calculados para filmes da blenda de PHB/PP original e biotratado em água do Rio Atibaia após o descarte do efluente.

Índice de Carbonila		
PP/PHB	Original	Biotratado
Fase amorfa ($\text{ABS}_{1745/1380}$)	0,40	---
Fase cristalina ($\text{ABS}_{1721/1380}$)	0,50	0,1

Entretanto a intensidade para a banda amorfa foi muito baixa o que pode ter impossibilitado o tratamento pelo ajuste da função Lorentziana naquele ponto.

O filme da blenda biotratado em efluente bruto apresentou-se mais degradado do que os biotratados em água do Rio Atibaia (antes e após o descarte do efluente), provavelmente, devido à presença de grande quantidade da actinobactéria *Gordonia polyisoprenivorans*, que foi eficiente na degradação de PHB.

É provável que a degradação ocorra tanto na fase amorfa como na cristalina, proporcionalmente, como verificado nos ensaios realizados com blendas e PHB (homopolímero) em água do Rio Atibaia.

4.6. Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Esta medida, antes e após os diferentes biotratamentos, foi importante para a investigação da morfologia dos filmes.

4.5.1. Filmes de PHB

A figura 21-a, referente à micrografia de MEV do filme original de PHB, mostra uma superfície com marcas da prensa e do Teflon[®] nos quais o filme foi produzido. Após o biotratamento do filme de PHB em água do rio Atibaia antes e após o descarte do efluente da Replan, observa-se uma estrutura porosa com furos, sugerindo degradação e remoção da camada com as marcas da prensa (Fig. 21-b e 21-c). As formações regulares percebida nesta micrografias aparecem com formações esferulíticas, que restaram após a remoção de fase amorfa e cristalina do PHB.

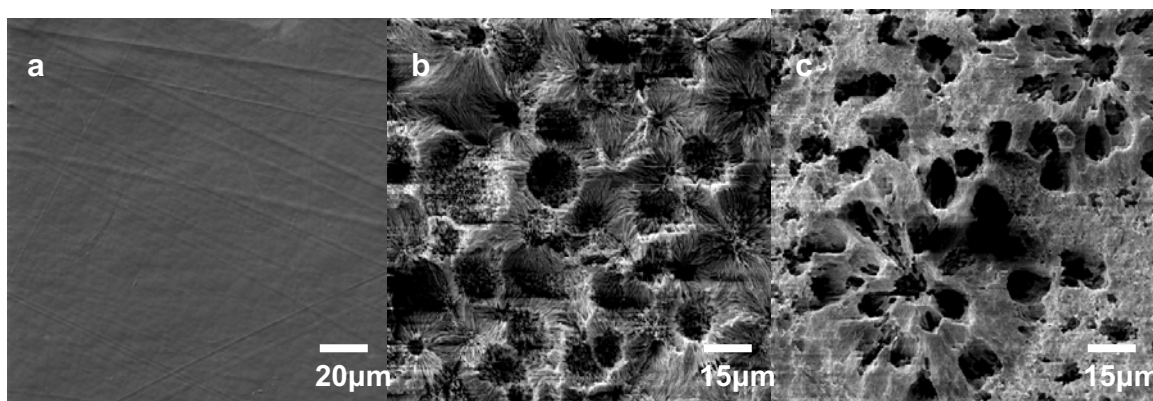


Figura 21: MEV de filmes de PHB: (a) filme original; (b) biotratado em água do rio Atibaia antes do descarte do efluente; (c) biotratado em água do rio Atibaia após o descarte do efluente da Replan.

A remoção de camadas e a formação de poros, devido à ação microbiana na superfície do filme, intensifica mais a colonização do mesmo por microrganismos, expondo o polímero ao contato com hidrolases que agem sobre os carbonos dos grupos carbonila que são os sítios de ataque destas enzimas (LUCAS *et al.*, 2008).

4.5.2. Filmes de PP

As micrografias de MEV dos filmes de PP estão apresentadas na figura 22.

Na figura 22-a tem-se uma superfície de filme original com marcas e riscos resultantes do processo de produção do filme, prensa e Teflon[®] e esferulitos, estruturas geométricas, poliédricas, indicando um alto grau de organização estrutural do polímero.

Os grânulos na superfície dos filmes biotratados (figuras 22-b e 22-d) podem ser resíduos de biofilme que restaram após a lavagem dos mesmos, ou algum outro material aderido ou depositado durante o biotratamento. A estes grânulos não foi associado algum indício de biodegradação por estar evidente que os mesmos encontram-se acima dos riscos e marcas da prensa e do Teflon[®].

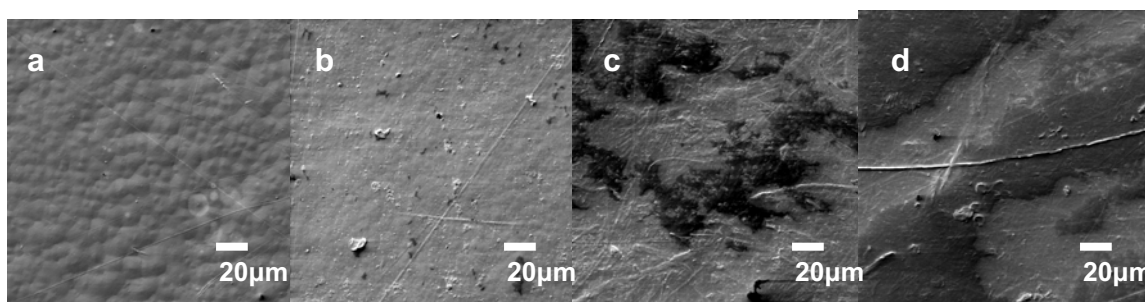


Figura 22: MEV de filmes de PP: (a) filme original; (b) biotratado em água do rio Atibaia antes do descarte do efluente; (c) biotratado em água do rio Atibaia após o descarte do efluente; (d) efluente bruto da Replan.

Entretanto, ainda em relação aos filmes biotratados (figuras 22-c e 22-d), existem manchas escuras em suas superfícies, que podem ser material oleoso depositado no filme, uma vez que o polipropileno é hidrofóbico e interage com os

hidrocarbonetos presentes no efluente da Replan e na água do rio Atibaia após receber o efluente.

Torna-se difícil atribuir ao PP algum indício de biodegradação nos 120 dias de biotratamento, uma vez que sua hidrofobicidade dificulta a colonização de sua superfície por microrganismos, bem como o ataque enzimático.

4.5.3. Blendas de PP/PHB

As micrografias de MEV das blendas revelam uma característica do processo de biodegradação, a descamação de camada por camada que é uma particularidade do PHB (CORRÊA *et al.*, 2008).

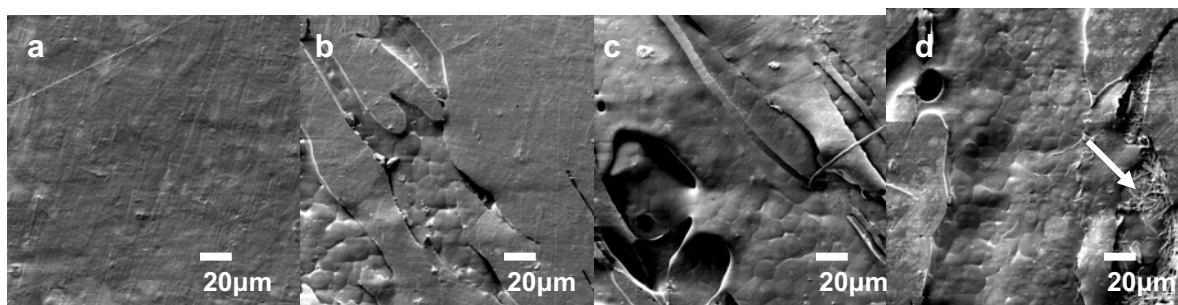


Figura 23: MEV de blendas de PP/PHB: (a) filme original; (b) biotratado em água do rio Atibaia antes do descarte do efluente; (c) biotratado em água do rio Atibaia após o descarte do efluente; (d) efluente bruto da Replan.

A mistura de PP e PHB produziu um material heterogêneo concordando com Arcana *et al.* (2006)., marcado pela prensa e Teflon[®] (Fig. 23-a, ver também micrografia óptica Fig. 11-a).

Na figura 23-b, é possível visualizar uma primeira camada com sinais de degradação, provavelmente de PHB, que contém as marcas do processamento do filme. Nas figuras 23-c e 23-d, nota-se que outras camadas estão sendo expostas, além de furos e irregularidades observadas, sugerindo que a biodegradação ocorre na fração de PHB por camadas (layer-by-layer) como em Corrêa *et al.* (2008). Na figura 23-d (seta indicativa), parece ter ocorrido adesão de actinobactéria sobre a superfície do filme. Pode-se sugerir que na blenda, o PHB encontra-se circundado

por PP o que o torna menos disponível à degradação, neste caso o PP encapsula o PHB, funcionando como uma barreira e impedindo que os microrganismos e/ou suas enzimas tenham acesso ao PHB na blenda.

5. CONCLUSÃO

O efluente bruto de refinaria de petróleo e a água do Rio Atibaia possuem microrganismos capazes de degradar o PHB, como a actinobactéria, *Gordonia polyisoprenivorans*, que encontrou condições para seu desenvolvimento em meio contendo hidrocarbonetos de baixa massa molar.

O filme de PHB é mais facilmente degradado que a blenda de PP/PHB (1:1), enquanto que o PP não sofre degradação no período estudado.

Quando tratados em efluente bruto, onde a carga microbiana é maior, a degradação dos filmes de PHB e blenda é mais intensa, seguida pelo tratamento em água do Rio Atibaia após o descarte do efluente e, finalmente, por água do Rio Atibaia antes do descarte do efluente.

O PP (homopolímero) mostra-se resistente à biodegradação mesmo quando tratado pela carga microbiana presente no efluente e na água do Rio Atibaia, no período estudado.

A degradação dos filmes de PHB e da fração PHB das blendas de PP/PHB ocorre proporcionalmente nas fases amorfa e cristalina do PHB.

A actinobactéria, *Gordonia polyisoprenivorans*, mostrou ser potencialmente capaz de degradar os filmes de PHB e da blenda de PP/PHB (1:1), nas condições estudadas.

6. PERSPECTIVAS FUTURAS

Este trabalho evidenciou que um rejeito industrial (efluente bruto) pode ser utilizado como fonte de microrganismos para a degradação de polímeros.

A bactéria isolada do efluente (*Gordonia polyisoprenivorans*) vem sendo estudada na produção de biosurfactantes e na degradação de borracha.

Trabalhos futuros serão realizados com *G. polyisoprenivorans* para a verificação de seu potencial aplicado à biodegradação de polímeros.

7. BIBLIOGRAFIA

ABIQUIM, 2009, disponível em <http://www.abiquim.org.br/resinastermoplasticas / estatisticas_32.asp> acessado em maio 2009.

AKMAL, D.; AZIZAN, M. N.; MAJID, M. I. A. Biodegradation of microbial polyesters P(3HB) and P(3HB-co-3HV) under the tropical climate environment. **Polym. Degrad.Stabil.** v. 80, p. 513-518, 2003.

AMASS, W.; AMASS, A.; TIGHE, B. A review of biodegradable polymers: uses, current developments in the synthesis and characterization of biodegradable polyesters, blends of biodegradable polymers and recent advances in biodegradation studies. **Polym. Internat.**, v. 47, p. 89-144, 1998.

ANDERSON, A. J.; DAWES, E. A.; Occurrence, metabolism, metabolic role, and industrial uses of bacterial polyhydrocyalkanoates. **Microbiol. Rev.**, v. 54, p. 450-472, 1990.

ANVISA, Descrição dos meios de cultura empregados nos exames microbiológicos, módulo IV, 2004, disponível em <www.anvisa.gov.br/servicosaude/microbiologia/mod_4_2004.pdf> acessado em abril 2009.

ARCANA, I. M.; SULAEMAN, A.; PANDIANGAN, K. D.; HANDOKO, A.; LEDYASTUTI, M. Synthesis of polyblends from polypropylene and poly(R,S)- β -hydroxybutyrate, and their characterization, **Polym. Internat.**, v. 55, p. 435-440, 2006.

ASTM D883-00, Standard Terminology Relating to Plastics, 2000.

ATLAS, R.M. Handbook of microbiological media. London: CRC Press. p. 1390, 2004.

AUGUSTA, J.; MÜLLER, R-J; WIDDECKE, H., A rapid evaluation plate-test for the biodegradability of plastics. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 39, p. 673-678, 1993.

BELTRÁN, M.; GARCIA, J.C.; MARCILLA, A. Infrared spectral changes in PVC and plasticized PVC during gelation and fusion, **Eur. Polym. J.**, v. 33, p. 453-462, 1997.

BILLINGHAM, N. C.; HOAD O.J.; CHENARD, F.; WHITEMAN, D.J., **Macromol. Symp.** 1999. In: POSPISIL, J. Degradation and aging of polymers blends. Thermomechanical and thermal degradation. **Polym. Degrad. Stabil.**, v.65, p. 405-14, 1999.

BLOEMBERGEN, S.; HOLDEN, D. A.; HAMER, G. K.; BLUHM, T. L.; MARCHESSAULT, R. H., studies of composition and crystallinity of bacterial poly(β -hydroxybutyrate-co- β -hydroxyvalerate), **Macromol. V.** 19, p. 2865-2871, 1986.

BONARTSEVA, G. A. **Microbiology**, 2002, In: CORRÊA, M. C. S.; REZENDE, M. L.; ROSA, D. S.; AGNELLI, J. A. M.; NASCENTE, P. A. P. Surface composition and

morphology of poly(3-hydroxybutyrate) exposed to biodegradation, **Polymer Testing**, v. 27, p. 447-452, 2008.

BRANDL, H.; GROSS, R. A.; LENZ, R. W.; FULLER, R. C. Plastics from bacteria and for bacteria: Poly(β -hydroxyalkanoates) as natural, biocompatible, and biodegradable polyesters, **Advanc. Biochem. Engineer. Biotechnol.**, v. 41, p. 77-93, 1990.

BYRON, D. Novel biodegradable microbial polymers. 1990. In: DA SILVA, L. F. et al. Produção Biotecnológica de Poli-hidroxiálcanoatos para a Geração de Polímeros Biodegradáveis no Brasil. **Quím. Nova**, São Paulo, v. XY, n.00, p. 1-12, 2007.

CAMPOS, A., Blendas de PVC/PCL foto/termo e biotratados com fungos de solo (*Phanerochaete chrysosporium* e *Aspergillus fumigates*), dissertação (mestrado em ciências biológicas: microbiologia aplicada), Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2004.

CETESB – Relatório da Qualidade das Águas Internas do Estado de São Paulo de 2001. São Paulo, 2002. In: WIECZOREC, A. et al. Melhoria na Qualidade da Água pela Implantação de Um Novo Sistema de Tratamento de Efluente Industrial na Refinaria Replan/Petrobrás, **Holos Environment**, v. 5, n. 1, p. 23, 2005.

CHANDRA, R.; RUSTGI, R. Biodegradable Polymers. **Progr. Polym. Sci.** v. 23, p. 1273-1335, 1998.

CHIELLINI, E.; SOLARO, R. Biodegradable polymeric materials, **Advanced Materials**, v.8 p. 305-313, 1996.

COMITÊ DAS BACIAS HIDROGRÁFICAS DOS RIOS PIRACICABA, CAPIVARI E JUNDIAÍ. Relatório zero relatório de situação das bacias hidrográficas dos Rios Piracicaba, Capivari e Jundiaí. [CDROM]. São Paulo: CBH-PCJ, 2000. (UGRHI 5).

CONTI, D. S.; YOSHIDA, M. I.; PEZZIN, S. H.; COELHO, L. A. F. Miscibility and crystallinity of poly(3-hydroxybutyrate)/poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) blends. **Thermochimica Acta**, v. 450, p. 61-66, 2006.

CORRÊA, M. C. S.; REZENDE, M. L.; ROSA, D. S.; AGNELLI, J. A. M.; NASCENTE, P. A. P. Surface composition and morphology of poly(3-hydroxybutyrate) exposed to biodegradation, **Polymer Testing**, v. 27, p. 447-452, 2008.

DA SILVA, L. F.; GOMEZ, J.G.C.; ROCHA, R.C.S.; TARCIRO, M.K.; PRADELLA, J.G.C., Produção Biotecnológica de Poli-hidroxiálcanoatos para a Geração de Polímeros Biodegradáveis no Brasil. **Quím. Nova**, São Paulo, v. XY, n.00, p. 1-12, 2007.

DOI, Y. Microbial Polyesters. 1990. In: ROCHA, R. C. S. et al. Controle da Biossíntese de Poli-hidroxiálcanoatos Bacterianos Através do Fluxo de Substratos. **Quim. Nova**. V. 30, n. 01, p. 53-55, 2007.

FADINI, P. S.; FADINI, A. A. B., Lixo: desafios e compromissos, **Quím. Nova na Escola**, edição especial, 2001.

FLEMMING, H. C. Relevance of biofilms for the biodeterioration of surfaces of polymeric materials, **Polym. Degrad. Stabil.**, v. 59, p. 309-315, 1998.

FORATO, L. A.; BERNARDES FILHO, R.; COLNAGO, L. A.. Estudo de métodos de aumento de resolução de espectros de FTIR para análise de estruturas secundárias de proteínas. **Quím. Nova**, v. 21, n. 2, p. 146-150, 1997

FORMOLO, M.C.; DUARTE, M.A.T. SCHNEIDER, A.L.S.; FURLAN, S. A.; PEZZIN; A.P.T. Polihidroxicanoatos: biopoliésteres produzidos a partir de fontes renováveis. **Revista Saúde e Ambiente**, v.4, n.2, p.14 - 21, 2003.

FOX, D. W.; ALLEN, R. B. High performance polymers and composites. 1999. In: POSPISIL, J. Degradation and aging of polymers blends. Thermomechanical and thermal degradation. **Polym. Degrad. Stabil.**, v.65, p. 405-14, 1999.

FRANCHETTI, S. M. M.; MARCONATO, J. C., Polímeros biodegradáveis – uma solução parcial para diminuir a quantidade dos resíduos plásticos, **Quím. Nova**, v. 29, n. 4, p. 811-816, 2006.

FRANCHETTI, S. M. M.; SILVA, E. R.; TROMBINI, R. C. Biotransformation of PVC films by liquid waste from landfill, **Arq. Inst. Biol.**, 66, p. 133-136, 1999.

FURUKAWA, T.; SATO, H.; MURAKAMI, R.; ZHANG, J.; NODA, I.; OCHIAI, S.; OZAKI, Y., Comparison of miscibility and structure of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate)/poly(L-lactic acid) blends with those of poly(3-hydroxybutyrate)/poly(L-lactic acid) blends studied by wide angle X-ray diffraction, differential scanning calorimetry, and FTIR microspectroscopy, **Polymer**, v. 48, p. 1749-1755, 2007.

GALEGO, N.; ROZSA, C.; SANCHEZ, R.; FUNG, J.; VAZQUEZ, A.; TOMAS, J.S., **Polymer Testing**, 2000. In: REIS, K. C.; PEREIRA, J.; SMITH, A. C.; CARVALHO, C. W. P.; WELLNER, N.; YAKIMETS, I. Characterization of polyhydroxybutyrate-hydroxyvalerate (PHB-HV) / maize starch blends films, **Journal of Food Engineering**, v. 89, p. 361-369, 2008.

GOMEZ, J. G. C. e BUENO NETTO, C. L. Produção de poliésteres bacterianos. In: LIMA, U. D. A. Biotecnologia Industrial. v. 3 São Paulo: Editora Edgar Blucher, p. 219-248, 2001

GOMEZ, J. G. C.; RODRIGUES, M. F. A.; ALLI, R. C. P.; SILVA, L. F.; OLIVEIRA, M. S.; BUENO NETTO, C. L.; **Anais do 2º Congresso Brasileiro de Polímeros**, São Paulo, Brasil, 1993.

HADAD, D.; GERESH, S.; SIVAN, A. Biodegradation of polyethylene by the thermophilic bacterium *Brevibacillus borstelensis*. **J. App. Microbiol.**, n. 98, p. 1093-1100, 2005.

HE, M.; XIAO, B.; HU, Z.; LIU, S.; GUO, X.; LUO, S., Syngas production from catalytic gasification of waste polyethylene: Influence of temperature on gas yield and composition, **Intern. J. Hydrogen Energy**, v. 34, p. 1342–1348, 2009.

HOCKING, P. J.; MARCHESSAULT, R.H.; TIMMINS, M.R.; LENZ, R.W.; FULLER, C., Enzymatic Degradation of Single Crystals of Bacterial and Synthetic Poly(β -hydroxybutyrate), **Macromol.**, v. 29, p. 2472-2478, 1998.

HOLLANDE, S.; LAURENT, J-L., Study of discolouring change in PVC, plasticizer and plasticized PVC films, **Polym. Degrad. Stabil.**, v. 55, p. 141-145, 1997.

HONDA, Y.; OSAWA, Z. Microbial denitrification of wastewater using biodegradable polycaprolactone, **Polym. Degrad. Stabil.**, 76, 321-327, 2002.

HUANG, H.; HU, Y.; ZHANG, J.; ZHANG SATO, H.; NODA, I. H., OZAKI, Y., Miscibility and hydrogen-bonding interaction in biodegradable polymer blends of poly(3-hydroxybutyrate) and a partially hydrolyzed poly(vinil alcohol), **Journal Physical Chemistry**, vol. 109, p. 19175-19183, 2005.

HUANG, S. J. In: Comprehensive Polymer Science, Eastmond, G. C.; Ledwith, A.; Russo, S.; Sigwalt, P. (eds), Pergamon Press, Oxford, vol. 6, p. 597, 1989.

IBGE, 2000, disponível em <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/condicaodevida/pnsb/lixo_coletado/lixo_coletado110.shtm> acessado em maio 2009.

KACZMAREK, H. Changes of polymer morphology caused by U.V. irradiation: Surface damage polymer, **Polym. Degrad. Stabil.**, v. 37, p. 189-194, 1996.

KANSIZ, M.; DOMINGUEZ-VIDAL, A.; McNAUGHTON, D.; LENDL, B., Fourier-transform infrared (FTIR) spectroscopy for monitoring and determining the degree of crystallization of polyhydroxyalcanoates (PHAs), **Anal Bioanal Chem.**, v. 388, p. 1207-1213, 2007.

KARAL, O.; HAMURCU, E.; BAYSAL, B.M., Blends of polycaprolactone – poly(dimethylsiloxane) – polycaprolactone triblock copolymer with poly(vinyl chloride): preparation and characterization, **Polym. Degrad. Stabil.**, v. 38, p. 6071-6078, 1997.

KONNING, C.; VAN-DUIN, M.; PAGNOULLE, C.; JEROME, R., Prog. Polym. Sci. 1998. In: POSPISIL, J. Degradation and aging of polymers blends. Thermomechanical and thermal degradation. **Polym. Degrad. Stabil.**, v.65, p. 405-14, 1999.

KUMAR, G. S.; KALOAGAN, V.; NANDI, U.S., Biodegradable polymers: prospects, problems and progress. **J. Mat. Sci. Macromol. Chem. Phys.**, c. 22, v.2, p. 225-260, 1992.

LA MANTIA, F. P. Handbook of polymer degradation. In: POSPISIL, J. Degradation and aging of polymers blends. Thermomechanical and thermal degradation. **Polym. Degrad. Stabil.**, v.65, p. 405-14, 1999.

LANDIS, W. G.; YU, M. H. Introduction to Environmental toxicology: Impacts of Chemicals Upon Ecological Systems. Boca Raton: Lewis, p. 328, 1985.

LEATHERS, T. D.; GOVIND, N. S.; GREENE, R. V., Biodegradation of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) by a tropical marine bacterium,

Pseudoalteromonasi sp. NRRL B-30083. **J. Polym. Environm.** V. 8, n. 3, p. 119-124, 2002.

LINOS, A.; STEINBUHEL, A.; SPROER, C.; KROPPENSTEDT, R.M., *Gordonia polyisoprenivorans* sp. Nov., a rubber-degrading actinomycete isolated from na automobile tyre, **Int. J. System. Bacteriol.**, v. 49, p. 1785-1791, 1999.

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

LUO, S.; NETRAVALLI, A. N., A study of physical and mechanical properties of poly(hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate) during composting, **Polym. Degrad. Stabil.**, v.80, p. 56-66, 2003.

MANO, E. B.; MENDES, L. C., Introdução a polímeros, 2ª ed. Editora Edgard Blücher LTDA, São Paulo, 1999.

NISHIDA H; TOKIWA, Y. **J Appl. Polym. Sci.** 1992. In: LUO, S.; NETRAVALLI, A. N., A study of physical and mechanical properties of poly(hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate) during composting, **Polym. Degrad. Stabil.**, v.80, p. 56-66, 2003.

NONATO, R. V.; MANTELATO, P. E.; ROSSELL, C. E. V.; Appl. Microbiol. Biotechnol. 2001. In: DA SILVA, L. F. et al. Produção Biotecnológica de Poli-hidroxialcanoatos para a Geração de Polímeros Biodegradáveis no Brasil. **Quím. Nova**, São Paulo, v. XY, n.00, p. 1-12, 2007.

PELCZAR JR., M. J.; CHAN, E. C. S.; KRIEG, N. R. Microbiologia: Conceitos e Aplicações, vol. 1, 2ª Edição, Editora Makron Books, São Paulo, 1997.

PLASTIVIDA, 2005, disponível em <http://www.plastivida.org.br/reciclagem/pes_mercado02.htm> acessado em maio 2009.

POSPISIL, J. Degradation and aging of polymers blends. Thermomechanical and thermal degradation. **Polym. Degrad. Stabil.**, v.65, p. 405-14, 1999.

RAMSAY, J. A.; ALY HASSAN, M. C.; RAMSAY, B. A.; Can. J. Microbiol. 1995. In: DA SILVA, L. F. et al. Produção Biotecnológica de Poli-hidroxialcanoatos para a Geração de Polímeros Biodegradáveis no Brasil. **Quím. Nova**, São Paulo, v. XY, n.00, p. 1-12, 2007.

RATNER, B. D.; LACH-SCAMPAVA, D.; CASTNER, D. G. ESCA surface characterization of four IUPAC reference polymers, **Biom.**, 14, p. 148-152, 1993.

REIS, K. C.; PEREIRA, J.; SMITH, A. C.; CARVALHO, C. W. P.; WELLNER, N.; YAKIMETS, I. Characterization of polyhydroxybutyrate-hydroxyvalerate (PHB-HV) / maize starch blends films, **Journal of Food Engineering**, v. 89, p. 361-369, 2008.

ROSA, D. S.; CHUI, Q.S.H.; PANTANO FILHO, R.; AGNELLI, J.A.M., Avaliação da Biodegradação de Poli-beta-(Hidroxibutirato), Poli-beta-(Hidroxibutirato-co-valerato) e Poli-épsilon-(caprolactona) em Solo Compostado. **Polímeros**, São Carlos, v. 12, n. 4, p. 311-317. 2002.

SAEKI, H.; SASAKI, M.; KOMATSU, K.; MIURA, A.; MATSUDA, H., Oil spill remediation by using the remediation agent JE1058BS that contains a biosurfactant produced by *Gordonia* sp. Strain JE-1058. **Biores. Technol.**, v. 100, p. 572-577, 2009.

SATO, H. et al. **Journal of Molecular Structure**, p. 35-46, 2005. In: REIS, K. C.; PEREIRA, J.; SMITH, A. C.; CARVALHO, C. W. P.; WELLNER, N.; YAKIMETS, I. Characterization of polyhydroxybutyrate-hydroxyvalerate (PHB-HV) / maize starch blends films, **Journal of Food Engineering**, v. 89, p. 361-369, 2008.

SATO, H. et al. **Macromolecules**, v. 37, p. 7203, 2004. In: REIS, K. C.; PEREIRA, J.; SMITH, A. C.; CARVALHO, C. W. P.; WELLNER, N.; YAKIMETS, I. Characterization of polyhydroxybutyrate-hydroxyvalerate (PHB-HV) / maize starch blends films, **Journal of Food Engineering**, v. 89, p. 361-369, 2008.

SCHMIDELL, W. ; VITORATTO, E. . O desafio do lixo urbano. **Revista Politécnica**, Brasil, v. 204, p. 40-42, 1992.

SCOTT, G. Polymers and the environment, RSC Paperbacks, The Royal society of Chemistry, UK, 1999.

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

SHIMAO, MASAYUKI, Biodegradation of plastics, **Curr. Opinion in Biotechnology**, v. 12, p. 242-247, 2001.

SINGH, B.; SHARMA, N., Mechanistic implications of plastic degradation, **Poym. Degrad. Stabil.**, v. 93, p. 561-584, 2008.

SPINACÉ, M. A. S.; PAOLI, M. A., A tecnologia da reciclagem de polímeros, **Quim. Nova**, v. 28, n. 1, p. 65-72, 2005.

SPYROS, A.; KIMMICH, R.; BRIESE, B.H.; JENDROSSEK, D., ¹H NMR imaging study of enzymatic degradation in poly(3-hydroxybutyrate) and poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate). evidence for preferential degradation of the amorphous phase by PHB depolymerase B from *pseudomonas lemoignei*, **Macromol.**,v. 30, p. 8218-8225, 1997.

STEINBÜCHEL, A. Polyhydroxyalkanoic acids. 1991. In: DA SILVA, L. F. et al. Produção Biotecnológica de Poli-hidroxialcanoatos para a Geração de Polímeros Biodegradáveis no Brasil. **Quím. Nova**, São Paulo, v. XY, n.00, p. 1-12, 2007.

STEINBÜCHEL, A.; VALENTIN, H. E.; Diversity of bacterial polyhydroxyalkanoic acids. **FEMS Microbiology Letters**, vol. 128, p. 219 – 228, 1995.

SUDESH, K.; ABE.; H. E.; DOI, Y.; Prog. Polym. Sci. 2000. In: Squio, C. R.; Aragão, G. M. F. Estratégias de Cultivo para Produção dos Plásticos Biodegradáveis Poli(3-hidroxibutirato) e Poli(3-hidroxibutirato-co-3-hidroxivalerato) por Bactérias. **Quim. Nova**. V. 27. n. 4. p. 615-622, 2004.

TIMMINS, R. et al, *Macromol Chem Phys* 1996. In: LUO, S.; NETRAVALLI, A. N., A study of physical and mechanical properties of poly(hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate) during composting, **Polym. Degrad. Stabil.**, v.80, p. 56-66, 2003.

TOMASI, G; SCANDOLA, M., *J Macromol Sci, Pure Appl Chem* 1995. In: LUO, S.; NETRAVALLI, A. N., A study of physical and mechanical properties of poly(hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate) during composting, **Polym. Degrad. Stabil.**, v.80, p. 56-66, 2003.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA. Estudos das condições de dispersão dos efluentes da refinaria de Paulínia – REPLAN, no rio Atibaia, para avaliação da contribuição do descarte para qualidade da água. Convênio Petróleo Brasileiro S.A. – Petrobrás – REPLAN. São Paulo: UNESP, 2001. (Projeto de pesquisa - Fundação para o Desenvolvimento da UNESP, Instituto de Biociências de Rio Claro).

UTRACKI, L. A. *Polymer blends handbook*. 1999. In: POSPISIL, J. Degradation and aging of polymers blends. Thermomechanical and thermal degradation. **Poym. Degrad. Stabil.**, v.65, p. 405-14, 1999.

VASANTHAN N.; SALEM D. R. **J. Polym. Sci. Polym. Phys. Ed**, 39(5): 536-47, 2001. In: XU, JUN. et al. In situ FTIR study on melting and crystallization of polyhydroxyalkanoates, **Polymer**, v. 43, p. 6893-6899, 2002.

WIECZOREC, A.; ANGELIS, D. F.; FURLAN, L. T.; CORRÊA JR., B. Melhoria na Qualidade da Água pela Implantação de Um Novo Sistema de Tratamento de Efluente Industrial na Refinaria Replan/Petrobrás, **Holos Environment**, v. 5, n. 1, p. 23, 2005.

XU, J.; GUO, B-H.; YANG, R.; WU, Q.; CHEN, G-Q.; ZHANG, Z-M., In situ FTIR study on melting and crystallization of poly(hydroxyalkanoates), **Polymer**, v. 43, p. 6893-6899, 2002.

XU, X.; GUO, S. A study on morphological structure of low molecular weight PVC prepared by vibromilling degradation, **Polymer**, v. 34, p. 621-632, 1995.

YOUNESI, H.; NAJAFPOUR, G.; MOHAMED, A. R., Ethanol and acetate production from synthesis gas via fermentation processes using anaerobic bacterium, *Clostridium ljundahlii*, **Biochem. Engineer. J.**, v. 27, p. 110-119, 2005.

ZHANG, J.; SATO, H.; NODA, I., OZAKI, Y. Conformation rearrangement and molecular dynamics of poly(3-hydroxybutyrate) during the melt-crystallization process investigated by infrared and two-dimensional infrared correlation spectroscopy, **Macromol.**, v.38, p. 4274-4281, 2005.