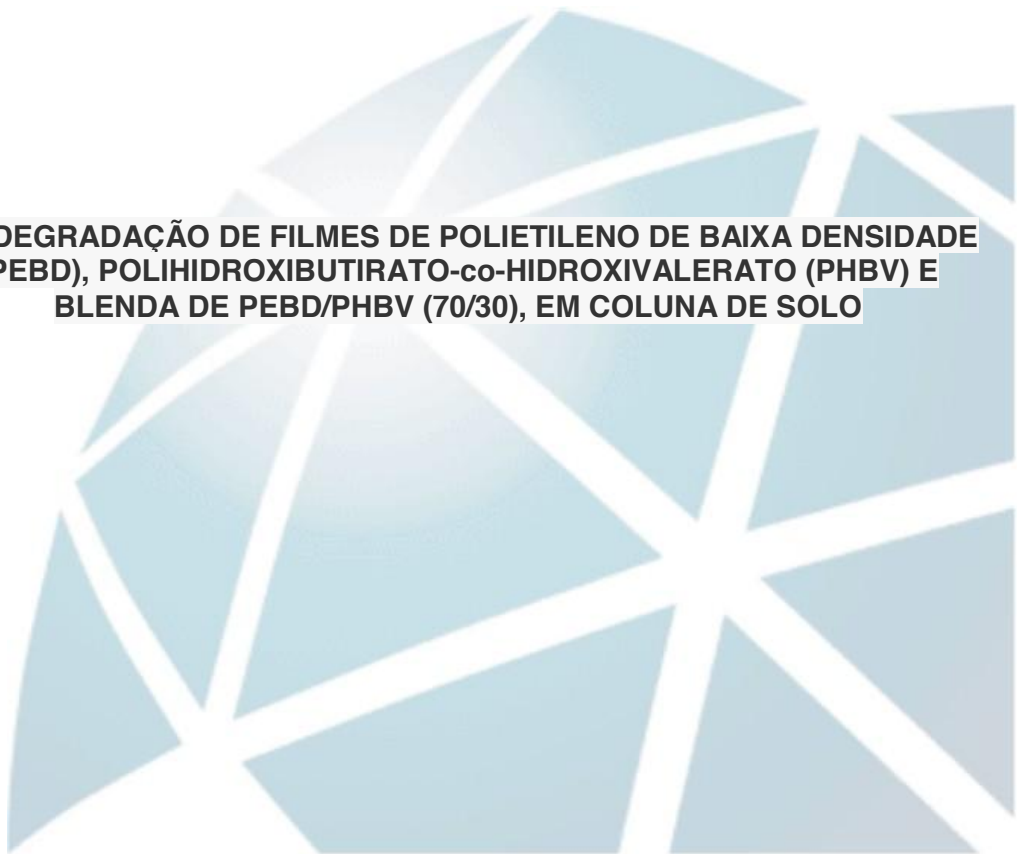

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
MICROBIOLOGIA APLICADA**

ELAINE CRISTINA BUCIOLI



**BIODEGRADAÇÃO DE FILMES DE POLIETILENO DE BAIXA DENSIDADE
(PEBD), POLIHIDROXIBUTIRATO-co-HIDROXIVALERATO (PHBV) E
BLENDAS DE PEBD/PHBV (70/30), EM COLUNA DE SOLO**

Rio Claro-SP
2014

ELAINE CRISTINA BUCIOLI

BIODEGRADAÇÃO DE FILMES DE POLIETILENO DE BAIXA DENSIDADE (PEBD), POLIHIDROXIBUTIRATO-co-HIDROXIVALERATO (PHBV) E BLENDAS DE PEBD/PHBV (70/30), EM COLUNA DE SOLO.

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” Claro, como requisito para obtenção do grau de Mestre em Ciências Biológicas (Microbiologia Aplicada).

Orientador: José Carlos Marconato
Co-orientadora: Suely Patrícia Costa Gonçalves

Rio Claro-SP
2014

547.87 Bucioli, Elaine Cristina
B921b Biodegradação de filmes de Polietileno de Baixa
Densidade (PEBD), Polihidroxitirato-co-Hidroxivalerato
(PHBV) e blenda de PEBD/PHBV (70/30), em coluna de solo
/ Elaine Cristina Bucioli. - Rio Claro, 2014
54 f. : il., figs., tabs.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista,
Instituto de Biociências de Rio Claro
Orientador: José Carlos Marconato
Coorientador: Suely Patrícia Costa Gonçalves

1. Polímeros. 2. Blendas - Uso de. 3. Polímeros sintéticos.
I. Título.

Ficha Catalográfica elaborada pela STATI - Biblioteca da UNESP
Campus de Rio Claro/SP

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: BIODEGRADAÇÃO DE FILMES DE POLIETILENO DE BAIXA DENSIDADE (PEBD), POLIHIDROXIBUTIRATO-co-HIDROXIVALERATO (PHBV) E BLENDAS DE PEBD/PHBV (70/30), EM COLUNA DE SOLO

AUTORA: ELAINE CRISTINA BUCIOLI

ORIENTADOR: Prof. Dr. JOSÉ CARLOS MARCONATO

CO-ORIENTADORA: Profa. Dra. SUELY PATRÍCIA COSTA GONÇALVES

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de MESTRE EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (MICROBIOLOGIA APLICADA), pela Comissão Examinadora:


Prof. Dr. JOSÉ CARLOS MARCONATO

Departamento de Bioquímica e Microbiologia / Instituto de Biociências de Rio Claro


Profa. Dra. SANDRA MARA MARTINS FRANCHETTI

Departamento de Bioquímica e Microbiologia / Instituto de Biociências de Rio Claro


Profa. Dra. ADRIANA DE CAMPOS

Embrapa Instrumentação Agropecuária - CNPDIA, São Carlos - SP

Data da realização: 03 de abril de 2014.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais, Ariovaldo e Valdelice, com todo meu amor e gratidão, pela minha formação, toda orientação recebida, carinho, presença e apoio incondicional constante.

Todas as minhas conquistas e realizações devo a vocês.

AGRADECIMENTO

À Deus, pela vida e todo ensinamento.

Ao Prof. Dr. José Carlos Marconato, pela oportunidade, orientação, amizade e confiança.

À Suely Patrícia Costa Gonçalves pelo projeto e todas orientações técnicas.

Ao Adriano Uemura de Faria, por todas orientações, contribuições, ensinamentos, apoio e motivação. Obrigada pelo professor e principalmente pelo amigo que você foi nesse período.

À Prof. Dra. Sandra Mara Martins Franchetti, pelas contribuições, ensinamentos, apoio e amizade.

Ao Programa de Pós Graduação em Microbiologia Aplicada e todos os docentes do Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista – Rio Claro, pela oportunidade, contribuições e todo conhecimento fornecido.

Ao NAP/MEPA - Esalq/USP de Piracicaba, pelas imagens de microscopia eletrônica de varredura, em especial ao técnico Renato Salaroli.

À minha filha Daniela, meu amor maior, pelo tempo e atenção cedidos involuntariamente para que esse projeto fosse concluído. Obrigada por cada olhar, sorriso e carinho que me motivam a seguir sempre.

À minha família, em especial minha irmã Ana Paula, por todo apoio, amizade, compreensão e sempre estar ao meu lado. Ao meu cunhado Luis Gustavo e a minha sobrinha Heloísa por todo apoio e carinho.

Aos meus amigos muito mais que especiais, pelo apoio, incentivo, pela compreensão da minha ausência e principalmente por sempre estarem de alguma forma ao meu lado.

Ao Complexo educacional, EDUQ. Agradeço ao Eraldo Joanoni (*in memoriam*) e ao Pedro Luís Antonelli, que muito mais que amigos, me abriram as portas da área acadêmica, sempre me orientando e apoiando. Agradeço à Blenda, coordenadora pedagógica, e o Eraldo Henrique Joanoni, diretor dessa instituição, pelo apoio, compreensão e toda ajuda que me deram nesse período.

À CAPES, por fomentar esse trabalho através da bolsa de mestrado.

“Todo homem por natureza, deseja saber.”
(Aristóteles, 384 - 322 a.C)

“Deve-se evitar toda precipitação e todo o preconceito ao se analisar um assunto e só ter por verdadeiro o que for claro e distinto.”
(René Descartes, 1596 - 1650).

RESUMO

Os plásticos são materiais que possuem larga escala de aplicação industrial e trazem importância econômica para sociedade atual. O uso dos plásticos sintéticos em embalagens e produtos descartáveis gera impactos sócio-ambientais devido ao descarte e disposição inadequada deste material. Uma das alternativas para minimizar esses impactos é a produção de blendas que possuam características próprias ao uso e que após a utilização, sejam absorvidas em um período curto de tempo pelo meio ambiente. Esse trabalho avaliou a biodegradação dos filmes de PHBV (poli(hidroxi-butirato-co-hidroxi-valerato)), dos filmes de PEBD (polietileno de baixa densidade) e da blenda de PEBD/PHBV (70/30), em coluna de solo, utilizando metodologias como: Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) e avaliação da perda de massa. Foi observado que o PHBV se biodegradou em 30 dias de exposição ao solo, período menor de exposição comparado ao PEBD e a blenda, 180 dias. Através do MEV foi possível observar mudanças micro morfológicas significativas na superfície dos filmes de PHBV e da blenda (furos, fraturas, descamações e erosões), o que complementa os valores encontrados de perda de massa, em que o PHBV teve uma redução de 43,9% e a blenda uma redução de 15,7%, nos respectivos períodos do processo biodegradativo. Os espectros de FTIR forneceram informações importantes para avaliação da biodegradação, pois foram capazes de mostrar as alterações estruturais relevantes após o processo biodegradativo, tal como a hidrólise de ésteres do PHBV na interfase entre o PEBD e PHBV. Através das análises de FTIR verificou se alteração de cristalinidade dos materiais poliméricos, que foi um indicativo que auxiliou a avaliação da biodegradação dos filmes. A blenda nessa proporção (70:30), demonstrou ser susceptível à comunidade microbiana do solo, sofrendo mudanças significativas na sua morfologia.

Palavras-chave: PEBD. PHBV. Blendas. Biodegradação. Solo.

ABSTRACT

Plastics are materials with large-scale industrial application and economic importance to modern society. The use of synthetic plastics in packaging and disposable products generates socio- environmental due to improper disposal and disposal of this material impacts . One alternative to minimize these effects is the production of blends which have their own characteristics and use after use, to be absorbed in a short period of time in the environment . This study evaluated the biodegradation of PHBV films (poly (hydroxybutyrate-co- hydroxyvalerate)) , films of LDPE (low density polyethylene) and LDPE blend / PHBV (70/30) in the soil column using methodologies as: Scanning Electron Microscopy (SEM) , Fourier Transform Infrared (FTIR) and weight loss evaluation. PHBV was biodegraded within 30 days of exposure to the soil , the less exposure time compared to LDPE and blends in 180 days . Through SEM we observed significant micro morphological changes on the surface of PHBV and blend films (holes , fractures , desquamation and erosions) , which complements the values found of mass loss , where the PHBV decreased by 43.9 % and the blend showed a reduction of 15.7% in the respective periods of the biodegradation process. The FTIR spectra provide important information for assessing biodegradation because they showed the important structural changes after the biodegradation process , such as hydrolysis of esters of PHBV at the interface between LDPE and PHBV . Using FTIR analysis was verified crystallinity change of the polymer materials, which was an indication of the films biodegradation. The blend in this ratio, shown to be susceptible to the soil microbial community, undergoing significant changes in its morphology.

Keywords: LDPE. PHBV. Blends. Biodegradation. Soil.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1	POLÍMEROS.....	4
2.1.1	<i>Polietileno</i>	6
2.1.2	<i>Polihidroxialcanoatos</i>	8
2.1.3	<i>Blendas</i>	9
2.2	DEGRADAÇÃO POLIMÉRICA	9
2.3	AVALIAÇÃO DA DEGRADAÇÃO MICROBIANA.....	14
2.3.1	<i>Medida de massa</i>	14
2.3.2	<i>Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)</i>	14
2.3.3	<i>Espectroscopia de Absorção no Infravermelho (FTIR)</i>	15
3	MATERIAL E MÉTODO	16
3.1	MATERIAL	16
3.1.1	<i>Polímeros</i>	16
3.1.2	<i>Coluna de Solo</i>	16
3.2	MÉTODO	16
3.2.1	<i>Preparo dos filmes</i>	16
3.2.2	<i>Biotratamento</i>	17
3.2.3	<i>Caracterização do solo</i>	18
3.2.3.1	Determinação do teor de matéria orgânica do solo	18
3.2.3.2	Determinação do pH do solo.....	18
3.2.3.3	Determinação da umidade gravimétrica do solo	19
3.2.4	<i>Quantificação de micro-organismos do solo</i>	19
3.3	TÉCNICAS EMPREGADAS NA AVALIAÇÃO DA DEGRADAÇÃO	21
3.3.1	<i>Determinação gravimétrica dos filmes poliméricos</i>	21
3.3.2	<i>Espectroscopia de absorção no infravermelho</i>	21
3.3.3	<i>Microscopia eletrônica de varredura</i>	21
4	RESULTADOS E DISCUSSÕES	22
4.1	COLONAS DE SOLO.....	22
4.2	POLÍMEROS.....	27
4.2.1	<i>Análise Visual</i>	27
4.2.2	<i>Medida de Massa</i>	30
4.2.3	<i>Microscopia eletrônica de varredura</i>	33
4.2.4	<i>Infravermelho com transformada de Fourier</i>	36
4.2.4.1	<i>PHBV</i>	37
4.2.4.2	<i>PEBD</i>	40
4.2.4.3	<i>BLENDA</i>	41
5	CONCLUSÃO	46
	BIBLIOGRAFIA	47

1 INTRODUÇÃO

Os plásticos sintéticos têm grande importância econômica e estão inseridos no cotidiano da sociedade atual. Por ser versátil, de baixo custo e possuir características que favorecem sua utilização, esse material vem substituindo outras matérias primas na confecção de artefatos, trazendo benefícios como praticidade, inovações de produtos e melhorias nos processos industriais (SCOTT, 1999; CANGEMI; SANTOS; NETO, 2005; FARIA, 2009).

O campo de aplicação dos materiais plásticos, assim como seus benefícios, são inúmeros, dentre eles se destacam a construção civil, as indústrias automotiva, alimentícia, farmacêutica, a área agrícola e, principalmente, o uso deste material como embalagens e artigos descartáveis diversos (CANTO, 2001; SARANTÓPOULOS et al, 2002).

O uso dos plásticos sintéticos em embalagens e descartáveis gera impactos sócio-ambientais devido ao descarte e disposição inadequados deste material, levando ao rápido acúmulo e permanência no meio ambiente. Sendo assim, as mesmas propriedades que conferem vantagens ao material, tais como a durabilidade e a resistência, passam a ser desafios no que diz respeito à deterioração do mesmo no meio ambiente (RIBEIRO et al, 2009; CAMPOS; MARCONATO; MARTINS-FRANCHETTI, 2012; OLIVEIRA, 2012).

Diante do cenário atual mundial, que envolve maior preocupação com questões ambientais, surgem diversas pesquisas sobre plásticos biodegradáveis, buscando materiais que possuam um tempo de biodegradação menor que o dos plásticos considerados convencionais sem prejuízo das propriedades que lhes conferem a viabilidade de uso. Esses estudos estão presentes na produção de polímeros por micro-organismos a partir de fontes renováveis, na obtenção de blendas de polímero sintético com polímero biodegradável, bem como na adição de componentes que favoreçam processos de degradação (sais metálicos, fotossensibilizantes, fibras vegetais, etc.), entre outros (SHAH et al, 2008; SINGH et al, 2008; NOWAK et al, 2011; PASSOS, 2013).

A biodegradação, no que se refere às mudanças físicas e químicas causadas pela ação microbiana em um determinado material, inicia-se pela aderência dos micro-organismos à superfície do mesmo e depende das características do próprio material como hidrofobicidade, da quantidade de substrato e de condições

ambientais como pH, temperatura, luz, presença de oxigênio e nutrientes essenciais. Portanto, o conhecimento do processo de biodegradação desses plásticos é importante e auxilia os estudos de obtenção de materiais com essa propriedade. (GU, 2003; SINGH; SHARMA, 2008; NOWAK et al, 2011).

Uma vez que o PEBD é um polímero amplamente utilizado em diversos setores da sociedade, sendo alto o seu consumo e seu descarte, é importante conhecer o comportamento do mesmo no meio ambiente, bem como propor possíveis alternativas para minimizar o impacto ambiental que ele possa provocar.

O PHBV é um copolímero natural, biodegradável, sintetizado por bactérias e que possui propriedades físicas e mecânicas próximas aos termoplásticos mais utilizados, tais como o polietileno e o polipropileno (LUO; NETRAVALI, 2003; REDDY et al 2003).

O uso de blendas poliméricas tem como objetivo obter materiais com propriedades diferenciadas para o uso. No caso da blenda de PEBD/PHBV (70:30), é importante investigar a influencia do PHBV na biodegradação do PEBD, que é bastante resistente ao ataque microbiano.

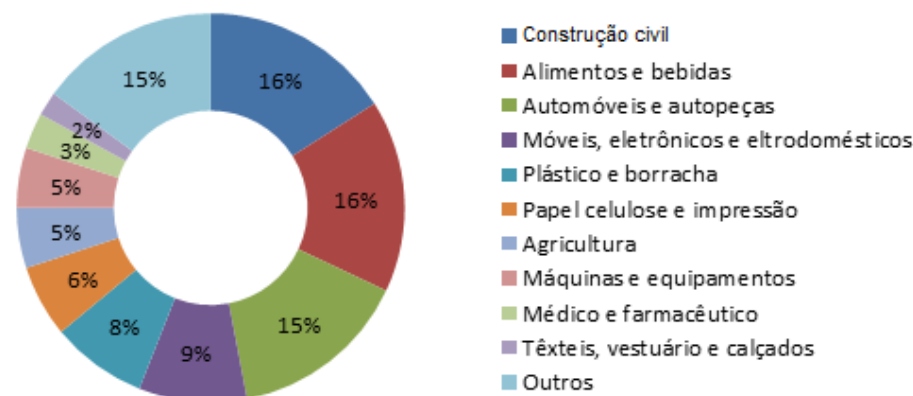
Este trabalho teve como objetivo a investigação da biodegradação em solo de filmes de polietileno de baixa densidade (PEBD), de filmes de polihidroxibutirato-co-valerato (PHBV), e da blenda desses polímeros PEBD/PHBV na proporção de 70:30.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

O plástico está presente nos mais variados setores com aplicações diversificadas, sendo um importante segmento da indústria química no Brasil. No Perfil 2012 da Indústria Brasileira de Transformação de Material Plástico a ABIPLAST apresenta dados importantes da indústria do plástico no país, a qual agrega cerca de 12 mil empresas, gerando renda e empregos, sendo o terceiro maior empregador da indústria de transformação, com 348 mil postos de trabalho. Ainda, segundo a mesma fonte de informação, a indústria de transformação do plástico processou cerca de 6,66 mil toneladas de material, resultando num faturamento de 56,49 bilhões de reais.

Encontramos o plástico tanto em produtos simples como em produtos complexos que exigem tecnologia de última geração para serem fabricados. Essa diversidade de usos do material plástico decorre da sua capacidade de substituir materiais como vidro, metal, madeira e papel, de maneira a manter ou melhorar a qualidade e as propriedades dos produtos por ele constituídos (SCOTT, 1999; GOMEZ; BUENO NETTO, 2001; ABIPLAST 2012). Com o avanço das tecnologias, podemos notar que o plástico está ganhando espaço e seu consumo vem aumentando significativamente. Dentre esses setores, destacam-se a construção civil, indústria automotiva, indústria de embalagens para diversos fins, agricultura, indústria de eletrônicos e eletrodomésticos, área médico-farmacêutica, e outras (CANTO, 1995; SARANTÓPOULOS et al, 2002; FARIA, 2009; ABIPLAST, 2012). A figura 1 apresenta os principais setores consumidores de plásticos, segundo o Perfil de 2012 da Indústria Brasileira de Transformação de Material Plástico (ABIPLAST 2012).

Figura 1 – Porcentagens de consumo de plásticos referentes a cada setor industrial.



Fonte: Adaptado (ABIPLAST, 2012)

Desta forma, o plástico surge como uma alternativa para solucionar problemas decorrentes do avanço da tecnologia e da demanda da sociedade por bens de consumo duráveis e não duráveis. Dentre as diversas resinas termoplásticas existentes no mercado, destacam-se o polipropileno (PP), polietileno (PE) e policloreto de vinila (PVC), que juntos representam 83% da matéria-prima utilizada. Esses plásticos são obtidos principalmente do petróleo, através de reações de polimerização, sendo, portanto constituídos de macromoléculas chamadas genericamente de polímeros.

2.1 POLÍMEROS

Polímeros são macromoléculas caracterizadas por seu tamanho, estrutura química e interações intra e intermoleculares. Possuem unidades químicas, denominadas monômeros, que são unidas por ligações covalentes, se repetindo ao longo da cadeia (MANO; MENDES, 1999; SARANTÓPOULOS et al, 2002; HOURSTON, 2010). Quando a cadeia polimérica apresenta um único tipo de monômero é chamada como homopolímero, quando na constituição de sua cadeia houver mais que uma unidade monomérica, se refere a um copolímero (MANO, 1991; FARIA, 2009).

Segundo Mano e Mendes (1999) os polímeros mais importantes industrialmente são de origem sintética e possuem uma quantidade de

comonômeros (copolímeros) com o intuito de modificar algumas características do homopolímero de interesse.

Os polímeros podem ser, quanto a origem, naturais, como a seda e a celulose, ou sintéticos, como o polipropileno (PP), o polietileno (PE), o poli(cloreto de vinila) (PVC) etc (SPINACÉ; PAOLI, 2005); sendo classificados como termoplásticos (plásticos), termofixos e borrachas (CANEVAROLO, 2002; MANO; PACHECO; BONELLI, 2005).

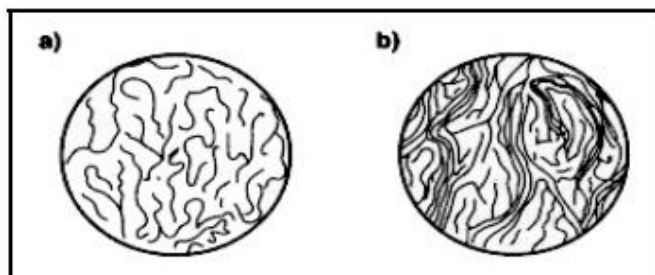
Os termoplásticos mais utilizados são o PP, o PE, o PET (poli tereftalato de etileno), o PVC e o poliestireno (PS). Eles possuem características, como resistência a impactos, baixo custo de obtenção e possibilidades de inúmeras aplicações que faz com que o consumo desses materiais seja grande mundialmente (SIVAN, 2011).

Os polímeros apresentam frações amorfa e cristalina. A fração cristalina dos polímeros apresenta um empacotamento entre as moléculas de uma forma ordenada. Devido essas interações intermoleculares, esses polímeros são mais duros e resistentes. Como exemplos de polímeros semicristalinos podemos citar o polietileno, o polipropileno e as poliamidas (PACÁKOVÁ; VIRT, 2005; HOURSTON, 2010).

Os polímeros amorfos possuem uma estrutura molecular suficientemente irregular para evitar a cristalização. Como exemplos de plásticos amorfos, podemos citar o poliestireno, os copolímeros de acrilonitrilo-co-butadieno-estireno, estireno-co-acrilonitrilo, polimetilmetacrilato, poli (cloreto de vinila), acetatos de celulose, policarbonatos à base de óxido de fenileno, resinas, etc (CAIRE, 2005; PACÁKOVÁ; VIRT, 2005).

A figura 2 mostra esquematicamente a estrutura de um polímero amorfo e de um polímero semicristalino.

Figura 2 - a) Polímero Amorfo, b) Polímero Semicristalino



Fonte: (CAIRE, 2005).

A fração cristalina de uma molécula de polímero confere a resistência ao material e a amorfa contribui para a elasticidade do mesmo (SARANTÓPOULOS et al, 2002).

Na década de 80, começaram os estudos a respeito de plásticos susceptíveis a ataque microbiano (biodegradáveis), em ambientes com população microbiana ativa (SHAH et al, 2008). Foi identificado que alguns poliésteres (polímeros biodegradáveis), como os poli-hidroxicanoatos (PHA), possuem propriedades semelhantes aos plásticos convencionais, oferecendo uma oportunidade para reduzir o consumo dos polímeros considerados não biodegradáveis (SHAH et al, 2008; BRITO et al, 2011).

2.1.1 Polietileno

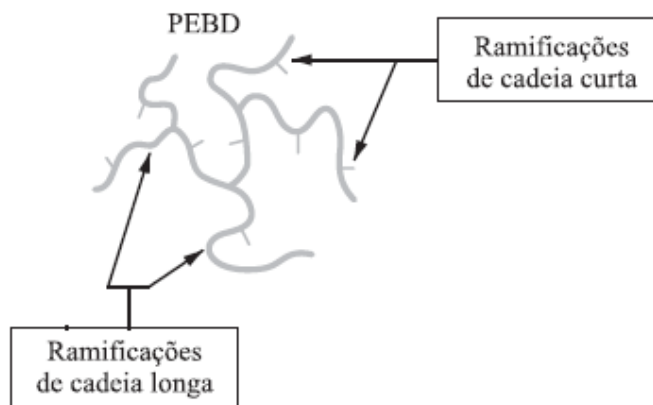
O polietileno é uma poliolefina, cuja estrutura básica se dá pela ligação de várias unidades de $(-CH_2-)$, tornando-o hidrofóbico e de alta massa molecular, o que dificulta sua degradação no meio ambiente (SARANTÓPOULOS et al, 2002; CANEVAROLO, 2004).

Possui ramificações ou cadeias laterais curtas que são em sua maioria o radical n-butila, porém grupos etila e n-hexila, também são formados pela transferência de cadeia intramolecular (SARANTÓPOULOS et al, 2002; COUTINHO; MELLO; MARIA, 2003).

Este polímero pode ainda ser classificado como polietileno de alta densidade (PEAD) e polietileno de baixa densidade (PEBD). O último é bastante utilizado pela sua resistência a produtos químicos, flexibilidade e transparência (RAJANDAS et al, 2012).

A figura 3 esquematiza uma molécula de polietileno de baixa densidade (PEBD) com suas respectivas ramificações.

Figura 3 - Ilustração esquemática das ramificações presentes em uma molécula de PE.



Fonte: (COUTINHO; MELLO; MARIA, 2003).

A estrutura química da molécula de um polímero determina suas características físicas (resistência a tração, transparência, flexibilidade, dureza, hidrofobicidade, moldabilidade, ponto de fusão, cristalinidade, densidade, temperatura de transição vítrea, etc) (MANO; MENDES, 1999; SARANTÓPOULOS et al, 2002; CANEVAROLO, 2004). Por apresentar alta hidrofobicidade o PEBD é considerado de difícil biodegradação, devido à baixa assimilação dos micro-organismos por esse polímero. A tabela 1 apresenta algumas propriedades físicas do polietileno de baixa densidade.

Tabela 1 - Propriedades gerais do PEBD

Propriedades do PEBD	
Propriedade	Valores
Ponto de Fusão - Tm (°C)	110 -120
Cristalinidade (%)	50 - 60
Densidade (g/cm ³)	0,92 – 0,94
Temperatura de Transição Vítrea -Tg (°C)	- 120

Fonte: Adaptado pelo autor (MANO; MENDES, 1999; SARANTÓPOULOS et al, 2002; COUTINHO; MELLO; MARIA, 2003).

2.1.2 Polihidroxialcanoatos

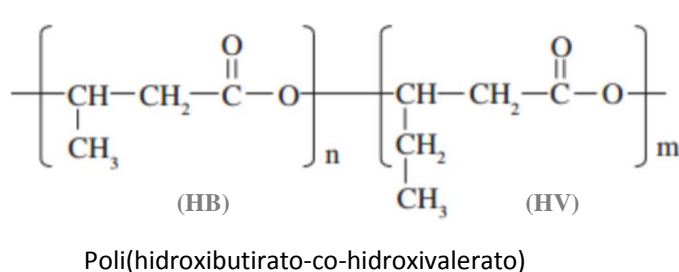
Os polihidroxialcanoatos (PHAs) são poliésteres naturais, biodegradáveis, sintetizados por bactérias, através da fermentação de açúcares, lipídios, ácidos orgânicos, entre outras substâncias, que o produzem intracelularmente como fonte energética (REDDY et al 2003; PHILIP; KESHAVARZ; ROY, 2007; SILVA et al, 2007).

Os PHAs possuem propriedades físicas e mecânicas próximas às dos termoplásticos mais utilizados, como o polipropileno (PP) e o polietileno (PE), além de apresentarem a vantagem de serem provenientes de uma fonte renovável e boa suscetibilidade à biodegradação (LUO; NETRAVALI, 2003; REDDY et al 2003; PASSOS, 2013). Apresentam excelentes aplicações no setor de embalagens e filmes, devido a sua alta resistência à umidade, gordura e mudanças de temperaturas e a propriedade de barreira a gases (PELLICANO; PACHEKOSKI; AGNELLI, 2009).

O PHB, poli(hidroxibutirato) (PHB), é o polímero mais usual dos PHAs. A adição de moléculas hidroxivalerato (HV) à cadeia de PHB configura o copolímero poli(hidroxibutirato-co-hidroxivalerato) (PHBV), que é obtido pela alteração de substratos no processo fermentativo de obtenção do copolímero, resultando na formação de um material com propriedades físicas e mecânicas melhores em relação ao PHB puro, por exemplo, maior resistência à quebra (EL-HADI et al, 2002; SINGH et al, 2008; WENG et al, 2010).

A figura 4 mostra a estrutura monomérica do poli(hidroxibutirato-co-hidroxivalerato).

Figura 4 - Fórmula estrutural do poli(hidroxibutirato-co-valerato)



Fonte: Adaptado pelo autor (ROSA et al, 2004)

Segundo Choi, Kim e Rhee (2004), a biodegradabilidade do PHBV aumenta à medida que o teor de HV aumenta na macromolécula, pois apresenta um grau de desordem maior, constituindo a parte mais amorfa.

2.1.3 Blendas

Blendas são misturas de polímeros que apresentam como vantagens: melhorias nas propriedades de um polímero, adaptando-o a um uso específico, melhorias nos processos de obtenção, redução de custos, aumento da biodegradabilidade, entre outras (AVELLA et al, 2000; ROSTAMI, 2000).

Atualmente, muitas blendas têm sido estudadas mostrando um campo de propriedades capaz de abranger um grande espectro de necessidades específicas.

Quando o foco é sustentabilidade ambiental, um polímero ideal é aquele passível de ser absorvido pelo ambiente depois de um tempo pré-determinado de acordo com a vida útil do material (RATAJSKA; BORYNIEC, 1998). Com a utilização de blendas é possível melhorar a biodegradabilidade (diminuir o tempo) de materiais considerados não biodegradáveis.

Devido ao PHBV possuir propriedades próximas à dos polímeros sintéticos utilizados em larga escala, como o PEBD e o PP, diversas blendas estão sendo estudadas visando à redução da quantidade utilizada dos polímeros convencionais (provenientes de fontes não renováveis) e a melhoria de sua biodegradabilidade no meio ambiente (AVELLA et al, 2000; PASSOS, 2013).

2.2 DEGRADAÇÃO POLIMÉRICA

O processo de degradação é o resultado da interação do material polimérico com o ambiente no qual está inserido, alterando sua estrutura e suas propriedades mecânicas, elétricas, químicas ou térmicas (ALBERTSSON; KARLSSON, 1990; FERREIRA, 2004). As alterações causadas pela degradação fazem com que os materiais poliméricos tenham perdas nas suas funções de uso (SIVAN, 2011).

Em relação à intensidade da degradação ela pode ser superficial, alterando o aspecto visual dos polímeros (cor, descamação, trincas) e estrutural, quando ocorre alteração das propriedades mecânicas, térmicas, elétricas, etc., comprometendo o desempenho estrutural do material polimérico (PAOLI, 2008). Dentre os tipos de

degradação que podem ocorrer em um material polimérico temos: a degradação térmica, mecânica, hidrolítica, química, microbiológica (biodegradação) e a induzida por radiação (exposição aos raios ultra-violeta) (FERREIRA, 2004; PAOLI, 2008; SHAH et al, 2008).

As mudanças que ocorrem em um polímero durante a sua degradação dependem do tipo de polímero e sua composição, da sua forma física e do processo de degradação envolvido, sendo que elas podem ser classificadas em alterações químicas e físicas. Nas alterações químicas podemos encontrar formação de insaturações e grupos funcionais tais como carbonilas, hidroperóxidos e hidroxilas. Como alterações físicas, temos a redução na massa molecular, resistência à tração, alongamento, erosão superficial, entre outros (SCOTT, 1999; FERREIRA, 2004; BAYARY; SEVERCAN, 2005; SINGH et al, 2007; PAOLI, 2008; MUMTAZ; KHAN; HASSAN, 2010).

Biodegradação pode ser definida, para materiais expostos em ambientes naturais, como sendo: a fragmentação, perda de propriedades mecânicas ou modificações químicas, através de ação microbiana. O processo degradativo de um material polimérico pode ocorrer de maneiras diferentes, sendo abiótica ou biótica ou a combinação sinérgica dessas, conduzindo a diferentes graus de degradação do polímero (fragilização, fragmentação, solubilização, etc.) (MARTINS-FRANCHETTI; MARCONATO, 2006; MUMTAZ; KHAN; HASSAN, 2010).

A biodegradação é promovida por enzimas excretadas por micro-organismos e pode ocorrer sob condições aeróbias ou anaeróbias, levando a uma desintegração completa ou parcial do material. Polímeros de cadeias lineares são geralmente menos biodegradáveis do que os polímeros de cadeias ramificadas, devido o alto grau de empacotamento molecular que apresentam. Já os polímeros ramificados, não possuem um grau de empacotamento tão elevado, devido às ramificações, tornando as interações mais fáceis de serem rompidas (AKMAL; AZIZA; MAJID, 2002; PHILIP; KESHAVARZ; ROY, 2007; AMMALA et al 2011).

Segundo Paoli (2008), o grau de cristalinidade de um polímero é uma propriedade importante a ser considerada na biodegradação dos materiais poliméricos. Os polímeros formam sólidos com uma fase cristalina e outra amorfa e a relação estequiométrica entre elas é chamada de grau de cristalinidade (expresso em porcentagem). Nestas fases cristalinas podemos ter a formação de cristalitos

com diferentes morfologias (esferulitos ou lamelas) (CHANDRA; RUSTGI, 1998; CANEVALORO, 2004; PAOLI, 2008).

A taxa da biodegradação enzimática tende a diminuir com o aumento da cristalinidade, do tamanho do cristalito e da temperatura de transição vítrea (T_g) (EL-HADI et al, 2002; MONTORO et al, 2010). Entretanto, há casos em que durante o processo de biodegradação ocorre o consumo de ambas as fases, tanto amorfa como cristalina, do polímero, verificando uma diminuição até mesmo proporcional de ambas (SPYROS et al, 1997; LUO; NETRAVALI, 2003; FARIA, 2009).

A taxa de biodegradação também é influenciada pela população microbiana presente no ambiente, pela temperatura, pH, umidade e propriedades do material polimérico a ser degradado (AKMAL et al, 2003; PHILIP; KESHAVARZ; ROY, 2007; LUCAS et al, 2008; SHAH et al, 2008).

A comunidade microbiana do solo se caracteriza pela abundância e diversidade, onde a maioria se encontra em micro colônias, ligadas às superfícies das partículas do solo (figura 5) (MADIGAN et al, 2004; PREVIATI et al, 2012). Os espaços presentes no solo são favorecidos pela diferença de tamanhos das partículas presentes, que podem variar de 0,002mm a 2 mm (MADIGAN et al, 2004).

A concentração da população microbiana é maior na camada superficial do solo (serapilheira) e engloba os fungos, bactérias e actinobactérias (MADIGAN et al, 2004; OZAKI, 2008; QUADROS, 2013) .

O comportamento dos micro-organismos no solo, é influenciado pela quantidade e tipos de nutrientes, umidade, grau de aeração, temperatura e pH (PELCZAR; REID; CHAN, 1997).

A avaliação das densidades populacionais na comunidade microbiana nos solos pode ser realizada através de técnicas de cultivo em placas, exame microscópio direto e técnicas de enriquecimento (TORTORA; FUNKE; CASE, 2003).

Figura 5 – Habitat microbiano do solo



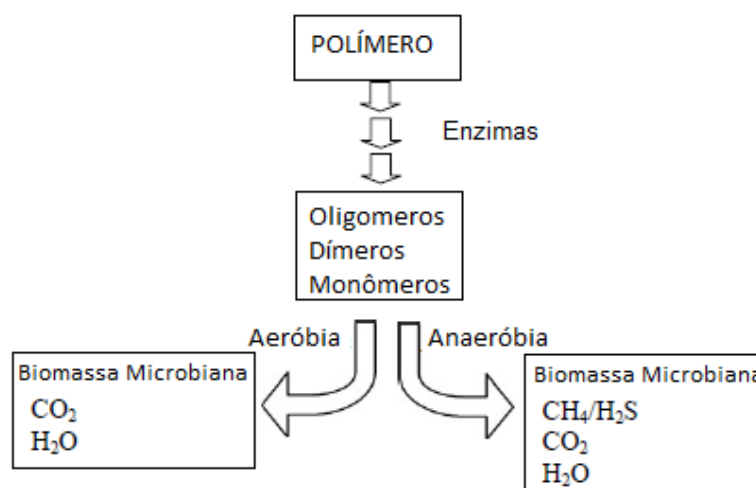
Fonte: (MADIGAN et al, 2004)

Akmal et al (2003), realizaram um estudo onde foi comparado a taxa de biodegradação do PHBV em relação ao PHB e constataram que essa taxa foi aproximadamente cinco vezes mais rápida no copolímero do que no homopolímero, observando que a degradação destes dois poliésteres é dependente da quantidade de unidades de HV na molécula. Nesse mesmo estudo, os autores identificaram que o mecanismo de biodegradação dos polímeros em questão, ocorreu via ataque na superfície pela hidrólise enzimática (enzimas despolimerases), por micro-organismos pré-selecionados de amostras de lodo ativado, solo, água de lago e água de mar proveniente do oceano Índico (*Bacillus* sp., *Enterobacter* sp., *Proteus* sp., *Alcaligenes* sp., *Micrococcus* sp., *Pseudomonas* sp.), reduzindo a espessura do filme (ação nas camadas superficiais) e sua massa gravimétrica.

Os autores Ratajska e Boryniec (1998), citam uma sequência do que se conhece sobre um processo biodegradativo de polímeros: a) as moléculas biodegradáveis presentes na superfície do polímero são as primeiras a sofrerem ataque dos micro-organismos; b) os fragmentos são removidos e a coesão do material é reduzida, havendo aumento da razão entre a sua área superficial e o volume, tornando o material mais susceptível a ação microbiana; c) os micro-organismos conseguem atingir camadas mais profundas do material alterando tensões mecânicas no material. O que realmente degrada o material são as enzimas despolimerases, produzidas pelos micro-organismos (RATAJSKA; BORYNIEC, 1998; PHILIP; KESHAVARZ; ROY, 2007).

A figura 6 esquematiza o processo de biodegradação de um polímero, pela ação da enzima despolimerase, em condições aeróbias e anaeróbias.

Figura 6 - Diagrama esquemático de biodegradação de um polímero sob condições aeróbias e anaeróbias



Fonte: Adaptada (GU, 2003)

Philip, Keshavarz, Roy (2007) identificaram micro-organismos dos gêneros *Pseudonocardia*, *Micromonospora*, *Thermomonospora*, *Streptosporangium*, *Streptomyces*, predominantes no processo de biodegradação do PHB em meio ambiente. Os autores também identificaram que a maioria das bactérias produtoras de PHAs são capazes de degradar polímeros intracelularmente. Além de bactérias, as algas e fungos presentes no meio ambiente, são capazes de atacar a superfície do polímero, através de excreção das enzimas extracelulares.

Para aumentar a biodegradabilidade do PE algumas ações podem ser aplicadas como: pré tratamentos térmico e radiação ultravioleta, adição de produtos pró-oxidantes na formulação do polímero e a elaboração de blendas, utilizando polímeros biodegradáveis, naturais ou sintéticos, com o PE (VIJAYA; REDDY, 2008; ARKTKAR et al, 2009; BHARDWAJ; GUPTA; TIWARI, 2012).

2.3 AVALIAÇÃO DA DEGRADAÇÃO MICROBIANA

Diversas técnicas são utilizadas para avaliar a biodegradação de materiais poliméricos como: Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC), Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) e com Refletância Atenuada (FTIR-ATR), Microscopia de Força Atômica (AFM), perda de massa e alteração de massa molecular.

Dentre essas técnicas, medidas de perda de massa, MEV e FTIR, foram utilizados neste trabalho para investigar mudanças morfológicas e estruturais nos filmes de PHBV, PEBD e da blenda PEBD/PHBV.

2.3.1 Medida de massa

A avaliação da perda de massa dos filmes poliméricos, é amplamente aplicada em ensaios de biodegradação (SHAH et al, 2008).

Segundo Sudhakar et al (2008), a medida de perda de massa é uma maneira simples e rápida de inferir a biodegradação de polímeros, pois com a ação de micro-organismos ocorre uma perda da integridade do polímero levando à perda de massa.

2.3.2 Microscopia Eletrônica de Varredura

A microscopia eletrônica de varredura é utilizada para avaliar a morfologia dos polímeros. Em investigações de biodegradação em materiais poliméricos é utilizada para verificar a extensão da degradação microbiana na superfície do material (DEDAVID; GOMES; MACHADO, 2007; MUMTAZ; KHAN; HASSAN, 2010).

Após o processo biodegradativo, a superfície dos filmes podem apresentar erosões, descamações, rugosidades, alteração de coloração, rachaduras e outras alterações detectáveis pelo MEV (SHAH et al, 2008).

2.3.3 Espectrometria de Infravermelho com Transformada de Fourier

A Espectrometria de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) é um dos métodos mais utilizados na análise de polímeros, pois permite identificar grupos funcionais presentes na superfície polimérica e o índice de cristalinidade do material (relação entre a fração amorfa e cristalina) (GULMINE et al, 2003; LUO; NETRAVALI, 2003; PACÁKOVÁ; VIRT, 2005).

Algumas pesquisas vem buscando medir a cristalinidade de forma indireta, e a espectroscopia de infravermelho é uma dessas maneiras, utilizando para isso a relação das intensidades das bandas relacionadas às fases cristalinas e amorfas, presentes nos espectros dos polímeros analisados (FEI et al, 2003).

Os espectros de infravermelho até a região de 4000 cm^{-1} são amplamente empregados para caracterizar e verificar alterações moleculares em polímeros submetidos a algum tipo de tratamento. Durante o processo de biotratamento, pode ocorrer biodegradação do material, resultando no aparecimento de algumas bandas, devido a formação e/ou transformação de grupos funcionais, ou mesmo o desaparecimento de outras, quando comparados os espectros antes e após o biotratamento (SHAH et al, 2008; SUDHAKAR et al, 2008).

3 MATERIAL E MÉTODO

3.1 MATERIAL

3.1.1 Polímeros

Nesse estudo foram utilizados os seguintes polímeros:

- Poli(hidroxibutirato-co-hidroxivalerato) (PHBV) – 18% de hidroxivalerato; ($M_w = 237.500$) fornecido pelo Prof. José A. Agnelli - DEMA-UFSCar, São Carlos - SP.
- Polietileno de baixa densidade (PEBD)- Fortymil: (densidade $0,922 \text{ g/cm}^3$), índice de fluidez 3.8 g/10 min , fornecido pelo Prof. Guilhermino J. M. Fachine – Escola de Engenharia Mackenzie/SP.
- Blenda: PEBD/PHBV na proporção em massa de 70/30.

3.1.2 Coluna de Solo

O solo utilizado nos ensaios de biodegradação foi coletado no campus da UNESP de Rio Claro sem a serapilheira e devidamente peneirado em malha de $1,68 \text{ mm}$.

3.2 MÉTODO

3.2.1 Preparo dos filmes

Os polímeros PEBD, PHBV e a blenda de PEBD/PHBV (70/30) foram previamente processados em reômetro de torque, modelo Haake PolyLab 900, à 170°C e 60 rpm (Depto. de Engenharia Metalúrgica e de Materiais, USP/SP) garantindo uma boa dispersão dos materiais (GONÇALVES; MARTINS-FRANCHETTI, 2013).

Os filmes do polímero PEBD e da blenda de PEBD/PHBV (70/30) foram preparados através da prensagem com aquecimento de aproximadamente $0,25 \text{ g}$ de cada polímero a temperatura de 170°C , por 3 minutos a 89 kgf.cm^{-2} de pressão e

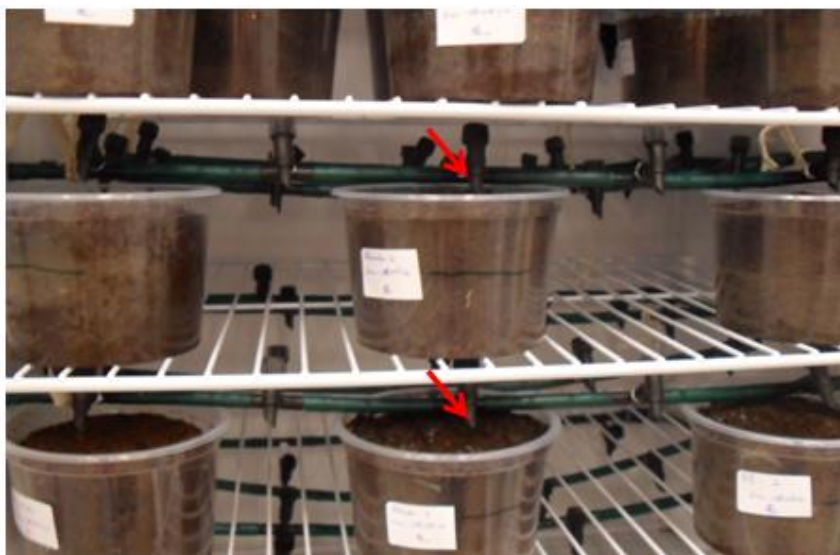
resfriados à temperatura ambiente de $26^{\circ}\text{C} \pm 1$. Os filmes de PHBV foram prensados a $71,3 \text{ kgf.cm}^{-2}$, a 170°C por um tempo de 2,5 minutos. Todos os filmes obtidos apresentaram espessura média de $80 \mu\text{m}$ e foram cortados em dimensões de $3 \text{ cm} \times 3 \text{ cm}$.

Os filmes não submetidos ao biotratamento foram designados de filmes *originais*, a fim de diferenciá-los dos filmes *biotratados*, ou seja, submetidos ao biotratamento.

3.2.2 Biotratamento

O biotratamento dos filmes poliméricos foi realizado em colunas de solo. Para montagem dessas colunas foram utilizados recipientes de polipropileno contendo 350g de solo. O filme foi posicionado na coluna de solo, de modo que se mantivessem as mesmas proporções de solo sobre e sob o filme. As colunas de solo foram mantidas em estufa a 28°C , tendo a umidade do solo controlada por meio de um sistema de gotejamento conforme mostra a figura 7.

Figura 7 - Colunas de solo em estufa BOD com sistema de gotejamento indicado por setas.



Fonte: Elaborado pelo autor.

O período de biotratamento para os filmes de PHBV foi de 30 dias, sendo que a cada 10 dias ocorreu uma retirada de amostra dos filmes para avaliação da

biodegradação. Para os filmes de PEBD e blenda, o período foi de 180 dias, sendo as amostras dos filmes retiradas a cada 60 dias. Os ensaios foram realizados em duplicatas e uma coluna contendo somente solo foi mantida como controle para cada período de retirada das amostras para posterior avaliação.

O período de retirada dos filmes de PHBV foi menor que os demais, por ser um polímero cuja biodegradação ocorre mais rapidamente quando comparado ao PEBD e blenda.

As amostras biotratadas foram lavadas delicadamente com água destilada, secas em papel de filtro e submetidas às análises para posterior comparação com os filmes originais.

3.2.3 Caracterização do solo

O solo foi caracterizado em relação ao teor de matéria orgânica, pH e umidade: antes e depois dos ensaios de biotratamento dos filmes.

3.2.3.1 Determinação do teor de matéria orgânica do solo

A determinação do teor de matéria orgânica foi realizada pelo método de combustão em mufla (PEREIRA et al, 2006), em que o solo foi colocado em cadinhos de porcelana e submetido à temperatura de 600 °C por 4 horas, então resfriado em dessecador. Nesse método, a matéria orgânica é queimada, restando apenas a inorgânica (m_q). Através da expressão abaixo, determinou-se o teor de matéria orgânica na amostra de solo:

$$\% \text{ MO} = [(m_s - m_q) / m_s] \cdot 100$$

Sendo:

% MO = porcentagem de matéria orgânica do solo;

m_s = massa inicial;

m_q = massa do solo após ser submetido à combustão.

3.2.3.2 Determinação do pH do solo

Para determinar o pH do solo, foi utilizado o método sugerido pela Embrapa (1997). Em que adiciona-se 25,0 mL de solução de CaCl_2 (cloreto de cálcio) a 0,01

mol/L a 10,00g de solo. Homogeneizando essa suspensão por agitação magnética durante 15 minutos e, em seguida, mantém-se em repouso por 15 minutos. Após este período, o pH da suspensão foi determinado pelo método potenciométrico.

3.2.3.3 Determinação da umidade gravimétrica do solo

Para a determinação da umidade gravimétrica do solo, foi utilizado o método de secagem em estufa (EMBRAPA, 1997), em que 5,0 g de amostra foi colocada em um cadinho de porcelana de massa conhecida, e submetida a uma temperatura de 105 °C por 24 horas. Após este período, a amostra de solo foi resfriada em dessecador (25°C ±1) e a massa restante, determinada. Esta corresponde à amostra seca, isenta de água superficial (m_s). Através da expressão abaixo, determinou-se o teor de umidade gravimétrica na amostra de solo:

$$\% \text{ Umidade Gravimétrica} = [(m_u - m_s) / m_u] \cdot 100$$

Sendo:

% Umidade Gravimétrica = porcentagem de água superficial no solo;

m_u = massa inicial;

m_s = massa do solo após ser submetido ao processo de secagem.

3.2.4 Quantificação de micro-organismos do solo

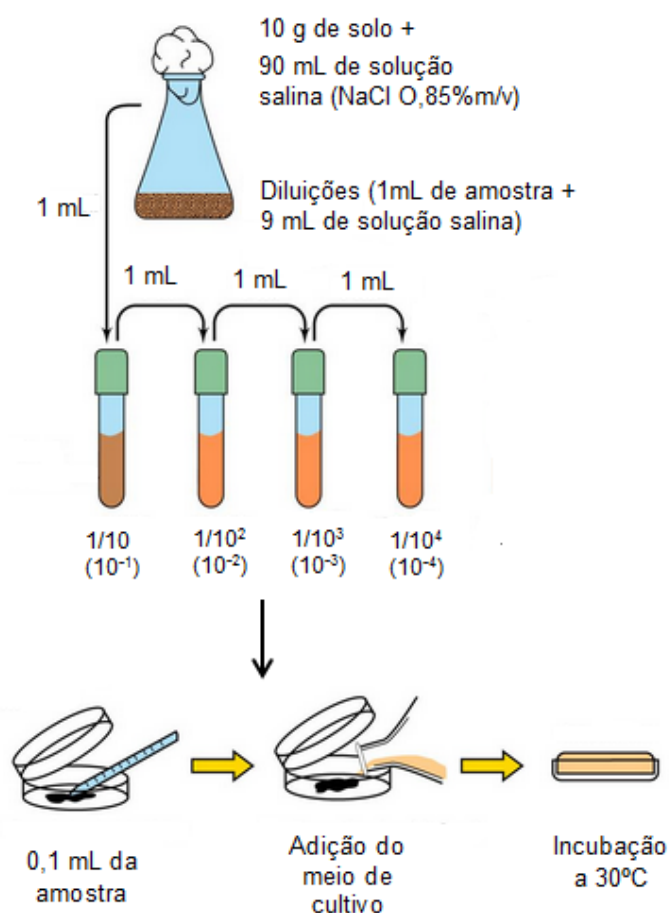
Para a determinação da contagem das unidades formadoras de colônias (UFC) dos micro-organismos do solo foi utilizada a técnica de contagem de células viáveis em plaqueamento por *Pour Plate*, com diluições em série (PELCZAR; REID; CHAN, 1997; TORTORA; FUNKE; CASE, 2003; MADIGAN et al, 2004).

A amostra foi preparada, adicionando-se 10,00g de solo em 90 mL de solução salina (NaCl 0,85%*m/v*), sendo a suspensão homogeneizada em agitador magnético por 15 minutos e mantida em repouso por mais 15 minutos. Uma alíquota de 1 mL do sobrenadante foi retirada e transferida para um tubo de ensaio contendo 9,0mL de solução salina estéril, homogeneizado e seguindo, dessa forma, sucessivas séries de diluições decimais, conforme exemplifica a figura 8.

Para o plaqueamento dos fungos foi utilizada a diluição de 10^{-2} e para o plaqueamento de bactérias e actinobactérias, a diluição de 10^{-4} . Essas diluições

foram escolhidas mediante testes prévios de modo que as contagens fossem possíveis e enquadradas entre 30 e 300 unidades formadoras de colônias. Os meios de cultivos utilizados para contagem foram o *Plate Count Agar* para bactérias, *Actinomycete Isolation Agar* para actinobactérias e *Potato Dextrose Agar* com adição de cloranfenicol para fungos. As placas de Petri (em duplicata) para cada diluição foram incubadas em estufa bacteriológica a $30\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1$, por 24 - 48 horas.

Figura 8 – Preparo e plaqueamento para quantificação de micro-organismos do solo.



Fonte: Elaborado pelo autor.

3.3 TÉCNICAS EMPREGADAS NA AVALIAÇÃO DA DEGRADAÇÃO

3.3.1 Determinação gravimétrica dos filmes poliméricos

Todos os filmes tiveram suas massas determinadas antes e após o processo de biotratamento, através de balança analítica, marca *Chyo* modelo JK-200, a fim de determinar o percentual de perda de massa dos filmes após os ensaios de biotratamento.

3.3.2 Espectroscopia de Absorção no Infravermelho

As análises de Espectroscopia de Absorção no Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) das amostras, foram realizadas nos filmes (antes e após o biotratamento), utilizando espectrofotômetro de infravermelho, marca Shimadzu, modelo Prestige, com resolução de 4 cm^{-1} e 16 varreduras para identificação das bandas características das amostras.

As regiões espectrais correspondentes às vibrações $\nu_{\text{C=O}}$ (grupo carbonila) foram resolvidas por ajuste *Lorentziano*, afim de obter duas bandas, sendo uma correspondente à vibração de carbonila de fase amorfa e outra, cristalina (FORATO et al, 1997; FEI et al, 2003; KANZIS et al, 2007). A partir de então, os índices de carbonilas amorfa e cristalina foram obtidos e comparados (FEI et al, 2003; FARIA, 2009; PASSOS, 2013).

3.3.3 Microscopia eletrônica de varredura

Os filmes poliméricos originais e biotratados foram analisados em microscópio eletrônico de varredura LEO 435 VP, após serem metalizados com ouro em metalizador *Sputter Baltec SCD 050*.

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 COLUNAS DE SOLO

Amostras do solo utilizado nas colunas de biodegradação foram analisadas, antes e após os respectivos períodos em que os filmes foram submetidos ao processo biodegradativo. Dessa forma, foi possível avaliar as condições essenciais para o desempenho microbiano durante o processo.

Como relatado anteriormente, o PHBV é um polímero considerado biodegradável, sendo assimilado com mais facilidade pelos micro-organismos presentes no solo em um período mais curto. Esta é razão pela qual sua retirada foi realizada em tempo menor (10, 20 e 30 dias). Por outro lado, as amostras de blenda e de PEBD foram retiradas posteriormente e em um intervalo de tempo maior (60, 120 e 180 dias).

As amostras de solo utilizadas para a biodegradação dos filmes de PHBV foram coletadas em um período diferente das amostras coletadas para a biodegradação dos filmes de PEBD e PEBD/PHBV (70:30). Ambas foram retiradas da mesma região do jardim da Unesp/RC. O solo utilizado para biodegradação dos filmes de PHBV foi denominado como Solo PHBV, o solo utilizado para biodegradação dos filmes de PEBD, Solo PEBD e o solo utilizado para biodegradação da blenda, Solo BLENDA.

As investigações realizadas foram: teor de matéria orgânica, pH, umidade e contagem microbiana (células viáveis), conforme relatado anteriormente.

A matéria orgânica presente no solo é proveniente de fontes naturais, como folhas, galhos, animais mortos e micro-organismos (PELCZAR; REID; CHAN, 1997). Vijaya e Reddy (2008), identificaram que os micro-organismos presentes no solo, durante a biodegradação, utilizam alguns tipos de polímeros como fonte de carbono para seu desenvolvimento.

Os valores de matéria orgânica encontrados nas amostras de solo, estão presentes na tabela 2. Observamos que os valores referentes a porcentagem do teor de matéria orgânica, apresentaram uma decaída comparando-os antes e após o processo de biodegradação (último período), o que se deve ao consumo da matéria orgânica pelos micro-organismos. O solo PHBV, apresentou uma redução de 1,5%, o solo PEBD 2,5% e o solo BLENDA 1,9%. O solo que teve uma redução do teor de matéria orgânica mais expressiva foi o solo PEBD, provavelmente pela preferência

dos micro-organismos autóctones pela matéria orgânica presente no solo, uma vez que o PEBD tem baixa assimilação por estes.

Tabela 2 - Valores de percentagem de matéria orgânica no solo, avaliados durante os respectivos períodos de biotratamento.

Biotratamento (dias)	Matéria Orgânica (%)		
	Solo PHBV	Solo PEBD	Solo BLENDA
0	46,5	68	68
10	44,1	*	*
20	47,1	*	*
30	45,0	*	*
60	*	69,7	69,3
120	*	56,7	62
180	*	65,5	66,1

* não amostrado Erro ± 0,20%

Fonte: Elaborado pelo autor.

Outro fator importante que afeta o desenvolvimento microbiano é o pH. Durante as investigações de biodegradação, essa característica é sistematicamente monitorada, pois pode tanto favorecer quanto inibir a ação microbiana. Luo e Netravali (2002) identificaram que o processo biodegradativo do PHBV em solo preparado, ocorreu a um pH de 7,5. Weng et al (2010) avaliaram a degradação do PHBV (3% de HV) em meio preparado e os valores de pH obtidos durante as 12 semanas do processo variou de 6,4 a 8,8.

Os valores de pH do presente trabalho se encontram na tabela 3. O solo PHBV avaliado em um período de 30 dias, demonstrou uma tendência de elevação do pH. Os solos PEBD e BLENDA apresentaram ao longo de 180 dias uma redução do pH, alterando de 6,5 a 5,6. As condições físicas e químicas no solo determinam os micro-organismos predominantes.

Tabela 3 - Valores de pH encontrados nas amostras de solo durante os respectivos períodos de biotratamento.

Biotratamento (dias)	pH		
	Solo PHBV	Solo PEBD	Solo BLENDA
0	6,0	6,5	6,5
10	6,3	*	*
20	6,2	*	*
30	6,4	*	*
60	*	6,3	6,3
120	*	5,9	6,0
180	*	5,7	5,6

* não amostrado

Fonte: Elaborado pelo autor.

Os valores do teor de umidade encontrados ao longo dos períodos biodegradativo se encontram na tabela 4. A umidade do solo foi ajustada para 60%. Durante os experimentos foi adicionado água, por sistema de gotejamento, para manutenção da umidade nas colunas de biodegradação. Estudos comprovam que a manutenção do teor de água, entre os valores de 40 a 50%, fornecem resultados satisfatórios de biodegradação de polímeros satisfatórios (ALBERTSSON; KARLSSON, 1990; LUO; NETRAVALI, 2002; VIJAYA; REDDY, 2008).

A média do teor de umidade, durante do experimento, para o solo PHBV foi de 32,5%, solo PEBD, 48,1% e do solo BLENDA, 48,7%. Essa diferença se deu pelo processo de adição de água ocorrer manualmente. Mesmo o solo PHBV estando abaixo dos 40%, ocorreu hidrólise enzimática nos filmes presentes nessas colunas (figura 10).

Tabela 4 - Valores de porcentagem de umidade no solo, avaliados durante os respectivos períodos de biotratamento.

Biotratamento (dias)	Umidade (%)		
	Solo PHBV	Solo PEBD	Solo BLENDA
0	33,7	47,8	47,8
10	31,1	*	*
20	34,7	*	*
30	30,5	*	*
60	*	53,3	55,0
120	*	42,7	44,4
180	*	48,5	47,6

* não amostrado

Erro \pm 0,17%

Fonte: Elaborado pelo autor.

As tabelas 5, 6 e 7 apresentam os valores das contagens de UFC para bactérias, actinobactérias e fungos, respectivamente, considerando os períodos dos processos biodegradativo.

Como relatado anteriormente, no solo há abundância e grande diversidade microbiana. As bactérias representam a maior parte da população, tanto em quantidade quanto em variedade (PELCZAR; CHAN; KRIEG, 1997). As espécies mais comuns encontradas no solo são *Bacillus*, *Staphilococcus*, *Streptococcus*, *Clostridium*, *Arthrobacter*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Azotobacter*, *Comamonas* e *Nitrobacter* (PELCZAR; CHAN; KRIEG, 1997; MADIGAN et al, 2004; VIJAYA, REDDY, 2008; BHARDWAJ; GUPTA; TIWARI, 2012).

Os actinobactérias são capazes de degradar substâncias complexas e as espécies mais comumente encontradas são *Nocardia*, *Streptomices* e *Micromonospora* (PELCZAR; CHAN; KRIEG, 1997; MADIGAN et al, 2004; VIJAYA, REDDY, 2008; SHAH; HASAN; HAMEED, 2010).

A maioria dos fungos que habitam o solo estão próximos a superfície devido a presença de oxigênio. Algumas espécies mais comuns são *Penicillium*, *Mucor*, *Rhizopus*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Cladosporium*, *Gliocadium* e *Trichoderma* (ALBERTSSON; KARLSSON, 1990; PELCZAR; CHAN; KRIEG, 1997; CHANDRA; RUSTGI, 1998; GU, 2003; VIJAYA, REDDY, 2008; BHARDWAJ; GUPTA; TIWARI, 2012).

Tanto os fungos quanto as actinobactérias são ativos na decomposição de constituintes orgânicos complexos como lignina e pectina.

Os valores obtidos de UFC no presente estudo, indica que o processo de biodegradação dos polímeros não alterou significativamente a microbiota existente no solo.

Tabela 5 - Valores das contagens das UFC de bactérias nos solos utilizados nas colunas de degradação, considerando o tempo do processo biodegradativo.

Biotratamento (dias)	UFC.mL ⁻¹ de Bactérias		
	Solo PHBV	Solo PEBD	Solo BLENDA
0	4,5 X10 ⁵	23,0 X10 ⁵	23,0 X10 ⁵
10	4,5 X10 ⁵	*	*
20	4,9 X10 ⁵	*	*
30	6,5 X10 ⁵	*	*
60	*	3,8 X10 ⁵	7,3 X10 ⁵
120	*	4,3 X10 ⁵	6,7 X10 ⁵
180	*	6,8 X10 ⁵	12,2 X10 ⁵

* não amostrado

Fonte: Elaborado pelo autor.

Tabela 6 - Valores das contagens das UFC de actinobactérias nos solos utilizados nas colunas de degradação, considerando o tempo do processo biodegradativo.

Biotratamento (dias)	UFC.mL ⁻¹ de Actinobactérias		
	Solo PHBV	Solo PEBD	Solo BLENDA
0	4,8 X10 ⁵	2,6 X10 ⁶	2,6 X10 ⁶
10	3,8 X10 ⁵	*	*
20	2,1 X10 ⁵	*	*
30	10,3 X10 ⁵	*	*
60	*	3,1 X10 ⁵	2,1 X10 ⁵
120	*	5,0 X10 ⁵	4,3 X10 ⁵
180	*	4,5 X10 ⁵	62,5 X10 ⁵

* não amostrado

Fonte: Elaborado pelo autor.

Tabela 7 - Valores das contagens das UFC de fungos nos solos utilizados nas colunas de degradação, considerando o tempo do processo biodegradativo.

Biotratamento (dias)	UFC.mL ⁻¹ de Fungos		
	Solo PHBV	Solo PEBD	Solo BLENDA
0	7,0 X10 ³	6,1 X10 ³	6,1 X10 ³
10	4,8 X10 ³	*	*
20	1,9 X10 ³	*	*
30	**	*	*
60	*	2,5 X10 ²	1,5 X10 ²
120	*	3,9 X10 ³	4,9 X10 ³
180	*	4,2 X10 ³	4,4 X10 ³

* não amostrado **Não houve desenvolvimento de colônias

Fonte: Elaborado pelo autor.

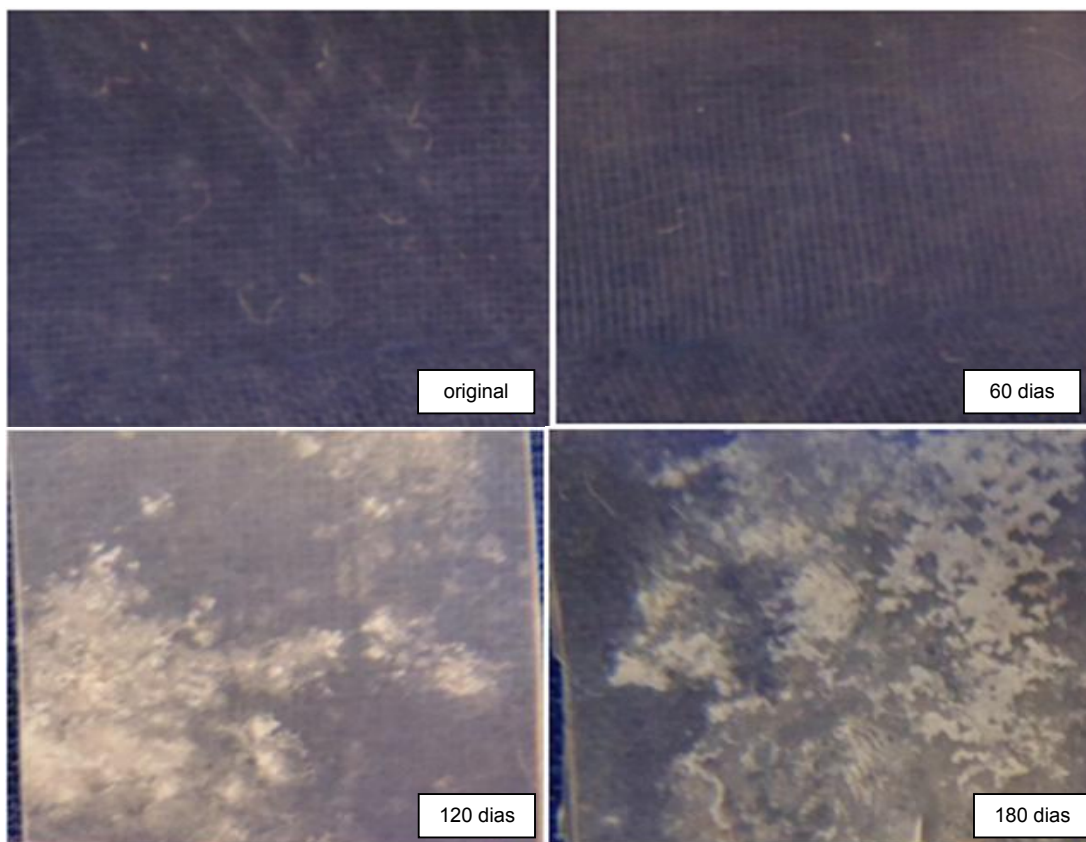
4.2 POLÍMEROS

4.2.1 Análise Visual

Os filmes de PHBV, PEBD e da blenda (70:30) foram fotografados antes e após os períodos de biodegradação em coluna de solo. As alterações visuais são as primeiras indicações de ataque microbiano nos filmes poliméricos (SHAH et al, 2005).

As fotografias dos filmes de PEBD estão presentes na figura 9. Pode ser observado uma superfície lisa e homogênea no filme original e no filme submetido a 60 dias de biodegradação. Algumas manchas apareceram após 120 dias de processo biodegradativo. Em nenhum período houve presença de furos ou qualquer tipo de ruptura nos filmes de PEBD causados pelo processo biodegradativo. Mumtaz, Khan e Hassan (2010) evidenciaram visualmente uma significativa biodegradação do PEBD em um período maior de exposição ao solo (730 dias), sob influência de radiação solar.

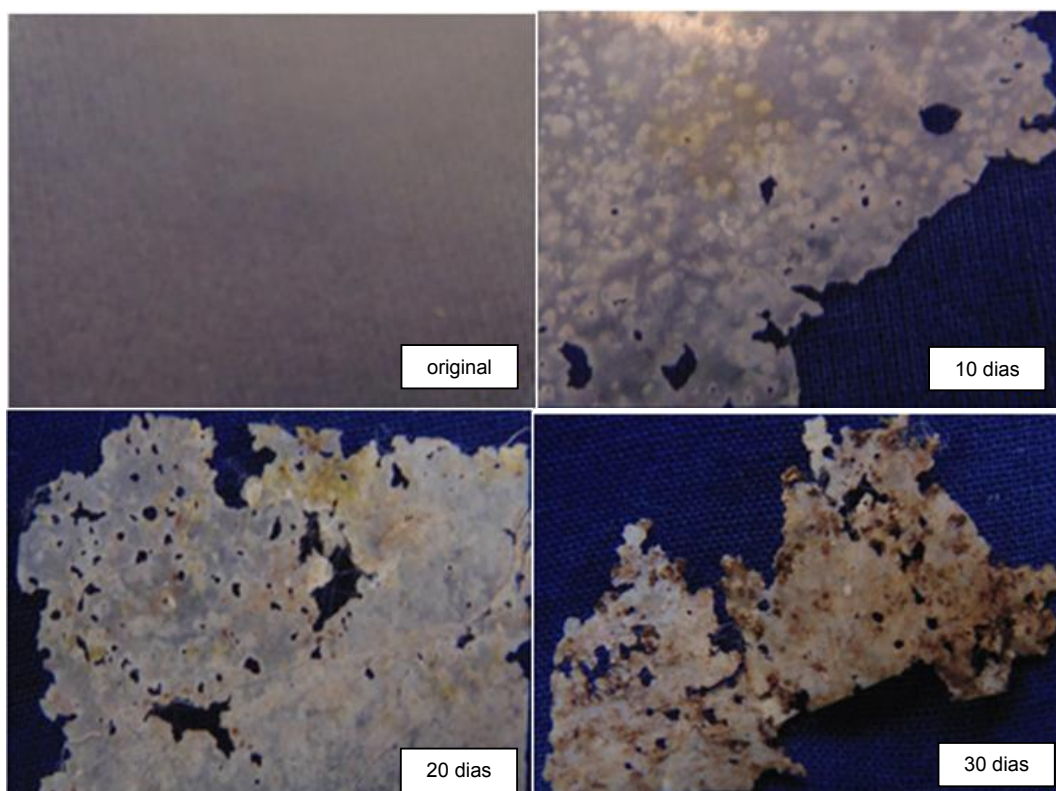
Figura 9 - Filmes de PE após processo de biodegradação em coluna de solo.



Fonte: Elaborado pelo autor.

As fotografias presentes na figura 10, mostram as alterações visuais ocorridas nos filmes de PHBV. O filme original apresentava uma homogeneidade em toda superfície e após 10 dias do processo, o filme apresentava modificação em toda sua extensão, como presença de muitos pontos esbranquiçados, opacidade e manchas. Estava mais quebradiço, havendo presença de buracos, inclusive perda de partes do filme. Nos períodos posteriores houve intensificação das manchas, fragilidade e opacidade e algumas partes do filme já não puderam ser detectadas devido ao intenso processo biodegradativo. Os resultados corroboram com os encontrados em outros estudos, como Weng et al (2010) e Gonçalves (2009).

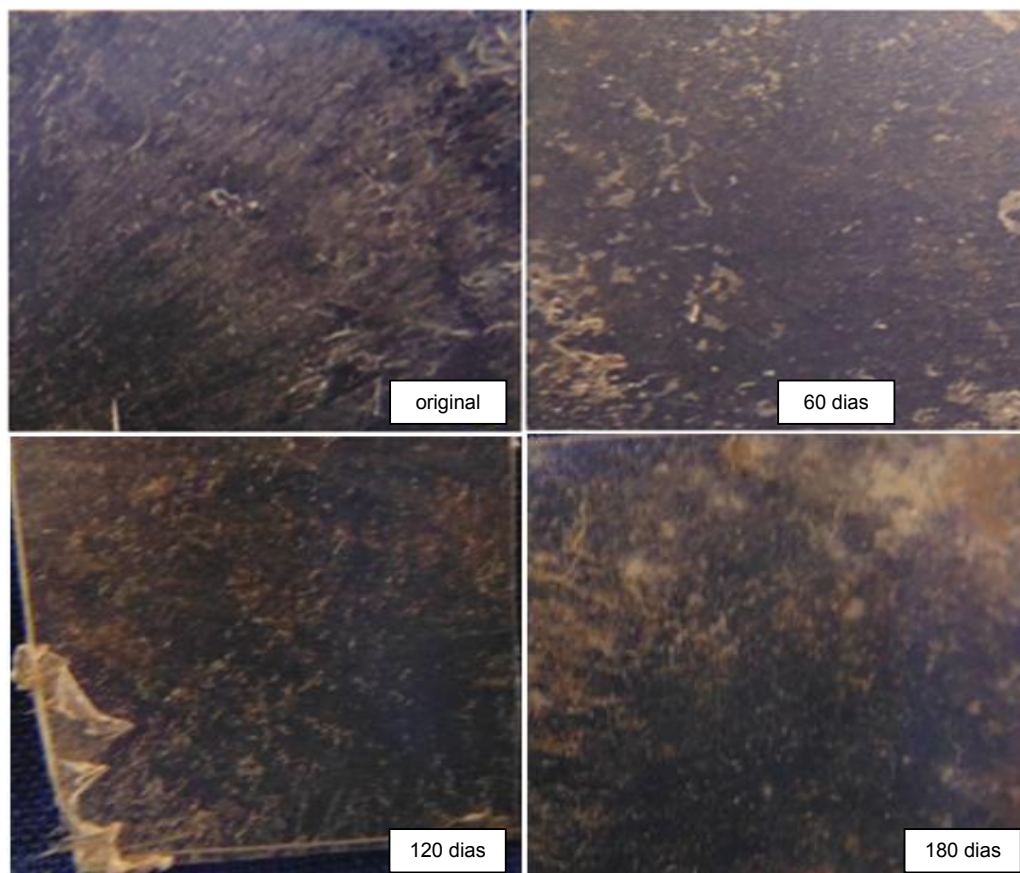
Figura 10 - Imagens dos filmes de PHBV após o processo de biodegradação em coluna de solo.



Fonte: Elaborado pelo autor.

No filme original da blenda (figura 11), podemos identificar uma certa heterogeneidade, devido a imiscibilidade do PE com o PHBV, apresentando áreas com translucidez diferenciadas. Após 60 dias de biodegradação os filmes se apresentaram mais opaco, com manchas, se intensificando com o aumento de exposição ao solo e havia descamações evidenciando o início do processo biodegradativo.

Figura 11 - Filmes da Blenda após o processo de biodegradação em coluna de solo.



Fonte: Elaborado pelo autor.

4.2.2 Medida de Massa

A variação de massa de filmes submetidos a biotratamento constitui um dado importante para avaliar a biodegradação que o material pode ter sofrido. Quando parte do material for consumida ou até mesmo despreendida para o meio, a variação de massa é negativa, indicando sua perda. Entretanto, há casos em que a massa aumenta conforme o biotratamento, o que pode ser verificado pela inserção de elementos de massa maior, como o oxigênio, à cadeia polimérica ou, até mesmo, adesão de micro-organismos e seus componentes extracelulares como hifas de fungos e polissacarídeos de bactérias. Quando a adesão do biofilme for intensa e não removida totalmente pelo processo de limpeza do material, após o biotratamento, o filme pode apresentar um aumento da massa (CHANDRA; RUSTIGI, 1998; FLEMING, 1998; LUCAS et al, 2008; SHAH et al, 2008).

Na tabela 8 podemos comparar as perdas de massas dos filmes de PHBV, Blenda e PEBD ao longo do biotratamento. Os filmes de PHBV, com dez dias de biotratamento, apresentaram perda significativa de massa em torno de 11% em relação ao original. Essa perda se intensificou, tendo um incremento de 27% nos dez dias seguintes, atingindo o valor de 38% após vinte dias. No entanto, após mais dez dias o incremento na perda foi de 5%, obtendo 44% após 30 dias de biotratamento. Inicialmente a perda de massa aumenta lentamente, pois nesse momento estão envolvidas etapas que dependem da colonização da superfície do polímero por micro-organismos, seguida da produção e secreção de enzimas que promovem a hidrólise do material (FLEMING, 1998). Por ser mais suscetível à degradação, à medida em que ocorre o consumo do hidroxivalerato, resta uma fração maior de hidroxibutirato que, é mais cristalino e resistente à biodegradação (CHANDRA; RUSTIGI, 1998; CHOI; KIM; HYUNG; RHEE, 2004; SHAH et al, 2008).

Resultados obtidos por Luo e Netravali (2002) corroboram este estudo, demonstrando que os filmes de PHBV, perderam aproximadamente 80% da sua massa original depois de 50 dias de exposição em meio de compostagem. Nesse período, a degradação foi tão intensa que os filmes de PHBV se fragmentaram não sendo possível sua recuperação. Os autores evidenciaram que a taxa de perda de massa muda com o aumento do tempo de biodegradação, verificaram que essa perda foi menor no início (10 primeiros dias), aumentando com o tempo (entre 10 e 40 dias) e diminuindo após 40 dias de biodegradação. Os autores atribuíram a perda de massa dos filmes à atividade microbiana e à presença da enzima despolimerase, o que favoreceu o processo de biodegradação dos filmes de PHBV, porém não houve consumo preferencial entre as fases amorfa e cristalina.

Tabela 8 - Valores de porcentagem de perda de massa dos filmes de PHBV, blenda e PEBD durante os respectivos períodos de biotratamento.

Biotratamento (dias)	Perda de massa (%)		
	PHBV	PEBD	BLENDA
10	11,5	*	*
20	38,5	*	*
30	43,9	*	*
60	*	0,0	15,5
120	*	0,5	15,8
180	*	1,5	15,9

* não amostrado

Erro \pm 0,17%

Fonte: Elaborado pelo autor.

Os filmes de PEBD apresentaram uma perda de massa de 0,5 e 1,5% após 120 e 180 dias respectivamente (tabela 8), valores bastante inferiores quando comparados à perda de massa do PHBV. O polietileno é um polímero resistente à biodegradação, a ausência de grupos hidrofílicos confere a este polímero característica hidrofóbica o que dificulta a adesão e consequente colonização da superfície do material por micro-organismos (ALBERTSSON; KARLSSON, 1990; CHIELLINI; CORTI; SWIFT, 2003; GU 2003). Neste estudo os filmes de PEBD não foram submetidos a nenhum tratamento prévio. Normalmente, quando se evidencia biodegradação em polietileno, é porque o polímero foi submetido ao termo e/ou fototratamento previamente, ou porque contém algum agente pró-oxidante em sua composição. Por outro lado, cadeias parafínicas lineares abaixo de 500 Da ou n-alcenos com até 44 carbonos (tetracontano) podem ser significativamente utilizadas como fonte de carbono por micro-organismos (CHIELLINI; CORTI; SWIFT, 2003).

A blenda de PEBD/PHBV na proporção de 70:30, apresentou perda de massa em torno de 15,7%. Uma vez que a constituição da mesma é uma mistura de frações de ambos os polímeros, é plausível que a fração consumida seja de PHBV, no entanto o percentual de perda de massa é inferior ao do co-polímero biodegradável. Isso pode ser explicado pelo menor teor de PHBV presente na blenda, portanto, uma menor fração estaria susceptível à ação microbiana, além do que, a presença do PEBD atua como um “modulador” do processo de biodegradação, de certa forma,

conferindo, proteção ao PHBV e, assim, impossibilitando o pleno acesso do mesmo pelos micro-organismos presentes no solo, tal como em PP/PHB (FARIA; MARTINS-FRANCHETTI, 2010).

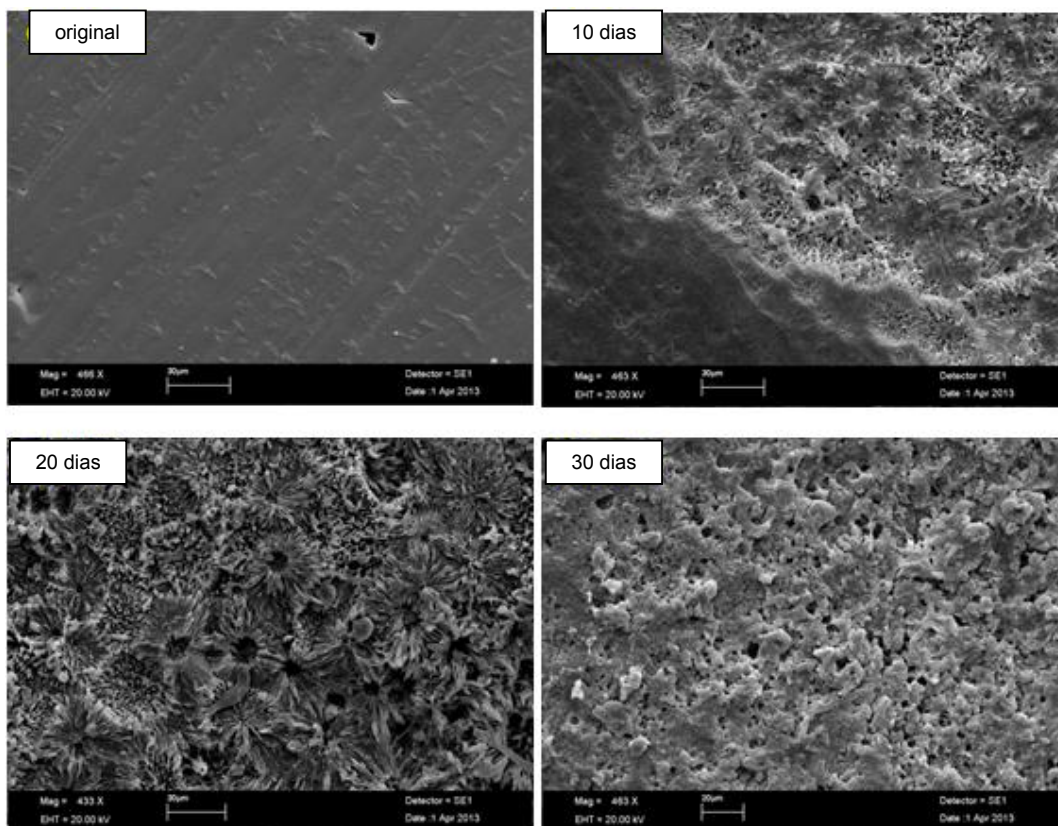
4.2.3 Microscopia Eletrônica de Varredura

Os aspectos micro-morfológicos da superfície dos filmes submetidos ao biotratamento foram analisados mediante medidas de MEV e comparados com os filmes originais.

A figura 12 compara micrografias de filmes de PHBV submetidos ao biotratamento durante 10, 20 e 30 dias com o filme original.

O filme original apresenta uma superfície relativamente regular com algumas imperfeições e riscos provenientes da prensagem do material entre folhas de alumínio durante a produção do mesmo. Aos dez dias de biotratamento, a superfície do filme se mostrou modificada. À medida que transcorreu o tempo, vinte e trinta dias, as modificações foram acentuando, surgindo, furos e descamações na superfície do filme; evidenciando que a degradação do material ocorreu primeiramente pela erosão da superfície, provocada pela ação microbiana no filme e depois se aprofundou, adentrando nas demais camadas do material (WENG et al, 2013).

Figura 12 - MEV de Filmes de PHBV, original e biotratados

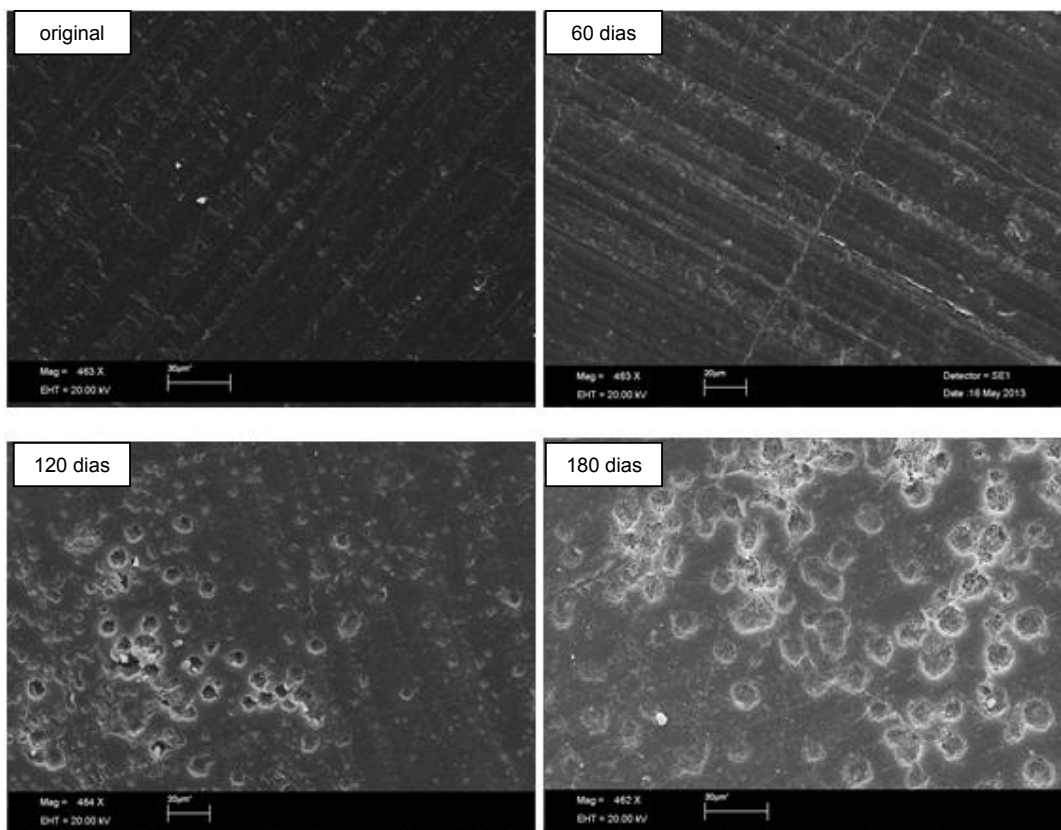


Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

Ao analisar as imagens de MEV referentes aos filmes de PEBD, observa-se que os filmes original e biotratado por 60 dias apresentam semelhanças (figura 13), riscos são encontrados na superfície de ambos (marcas do processamento do material na prensa).

Nos filmes biotratados por 120 e 180 dias foram encontrados furos e evidências de algum tipo de erosão que podem ser atribuídos à colonização da superfície do material. Os micro-organismos presentes no solo produzem material extracelular, especialmente, exopolissacarídeos e proteínas que aderem às partículas do solo formando micro-agregados (BRADING; JASS; LAPPIN-SCOTT, 2003; MADIGAN et al, 2004). Quando em contato com a superfície do polímero, esse material extracelular proveniente de bactérias e actinobactérias, juntamente com hifas de fungos, podem aderir ao mesmo e iniciar a colonização do filme (FLEMING, 1998; LUCAS et al, 2008), levando à erosão da superfície do material.

Figura 13 - MEV de Filmes de PEBD, original e biotratados.

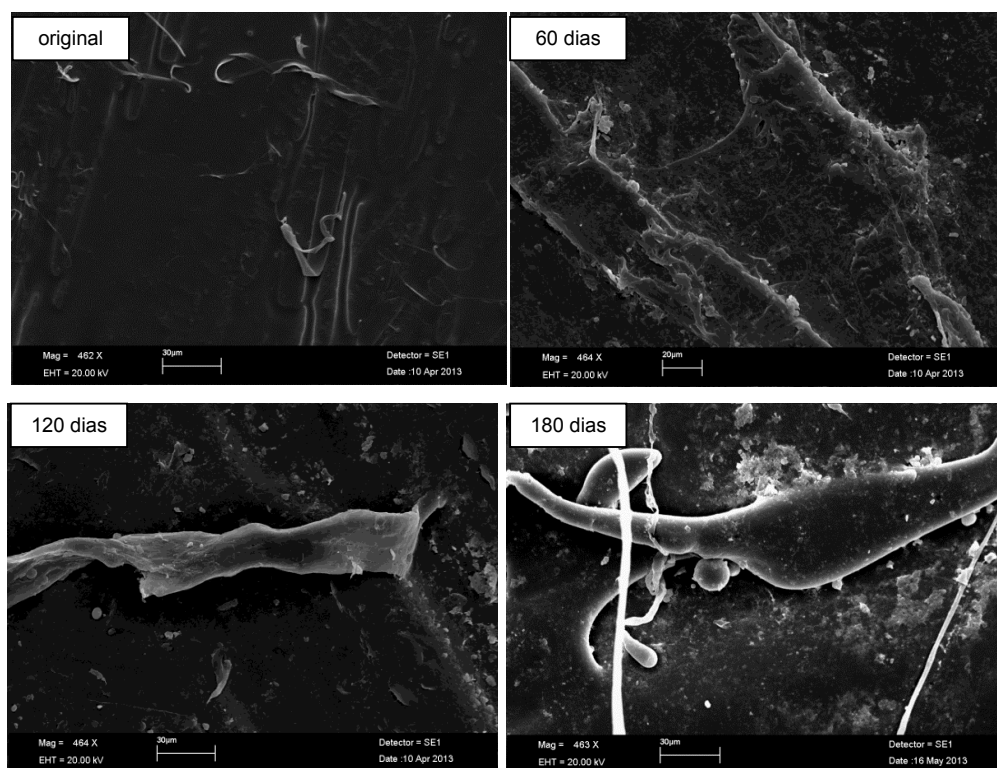


Fonte: Elaborado pelo autor.

As micrografias dos filmes de blenda de PEBD com PHBV original e biotratados por 60, 120 e 180 dias podem ser observados na figura 14. Nota-se que após o biotratamento houve modificações na superfície dos filmes, que podem ser entendidas como descamações, fraturas e erosões atribuídas à atividade microbiana.

As imagens sugerem que camadas do filme estão descamando do mesmo, o que poderia ter levado à variação de massa verificada na tabela 8.

Figura 14 - MEV de Filmes de blenda de PEBD/PHBV (70:30), original e biotratados



Fonte: Elaborado pelo autor.

4.2.4 Infravermelho com Transformada de Fourier

A espectroscopia de FTIR foi empregada para analisar os filmes originais e biotratados. Os espectros dos filmes de PHBV foram normalizados pela intensidade de absorvância de uma banda considerada como padrão interno em 1380 cm^{-1} , atribuída à deformação simétrica de grupos CH_3 (BLOEMBERGEN et al, 1986).

O padrão interno utilizado para normalizar os espectros de PEBD e da blenda, foi a intensidade da banda em 1469 cm^{-1} , correspondente ao estiramento de grupos CH_2 do PEBD (SUDHAKAR et al, 2008).

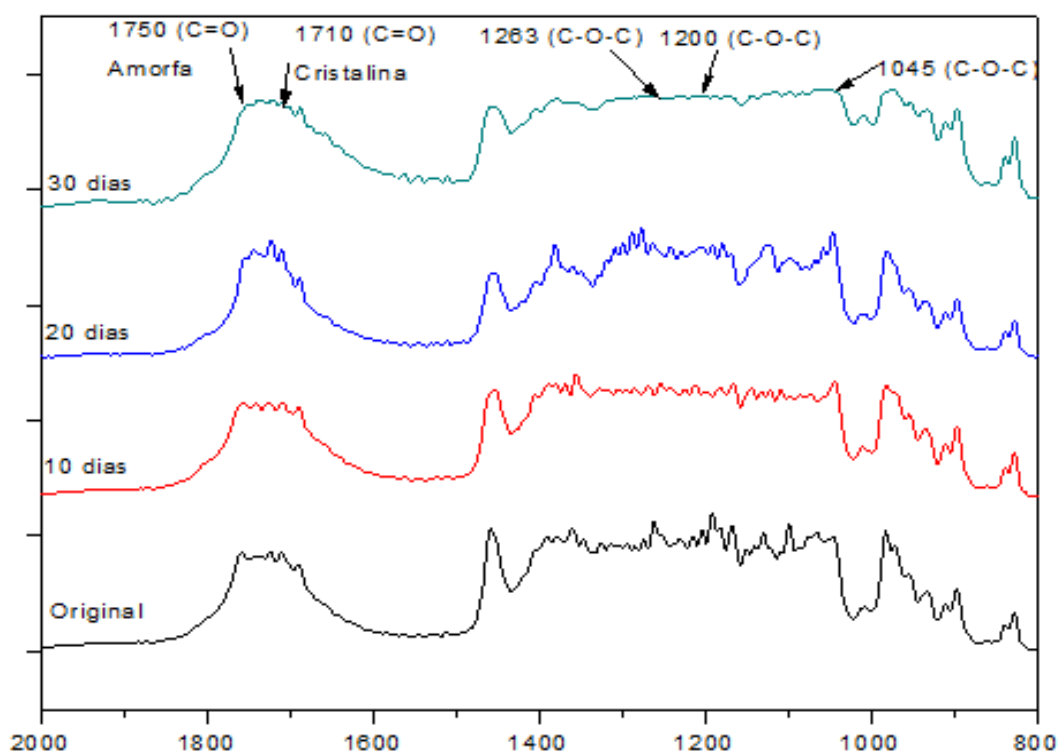
Como alterações espectrais, foram consideradas variações de intensidade, aumento e diminuição maiores que 10%, deslocamento, surgimento e desaparecimento de bandas.

4.2.4.1 PHBV

Os espectros dos filmes de PHBV original e biodegradados, das regiões avaliadas se encontram na figura 15, com as principais bandas em evidência.

Foram verificadas alterações na região de $1800 - 1600 \text{ cm}^{-1}$, atribuídas a grupos carbonílicos nas fases amorfas e cristalinas. Nas demais regiões espectrais não foram observadas alterações significativas.

Figura 15 - Espectros de FTIR de filmes de PHBV original e biodegradados, com as principais bandas em evidência.

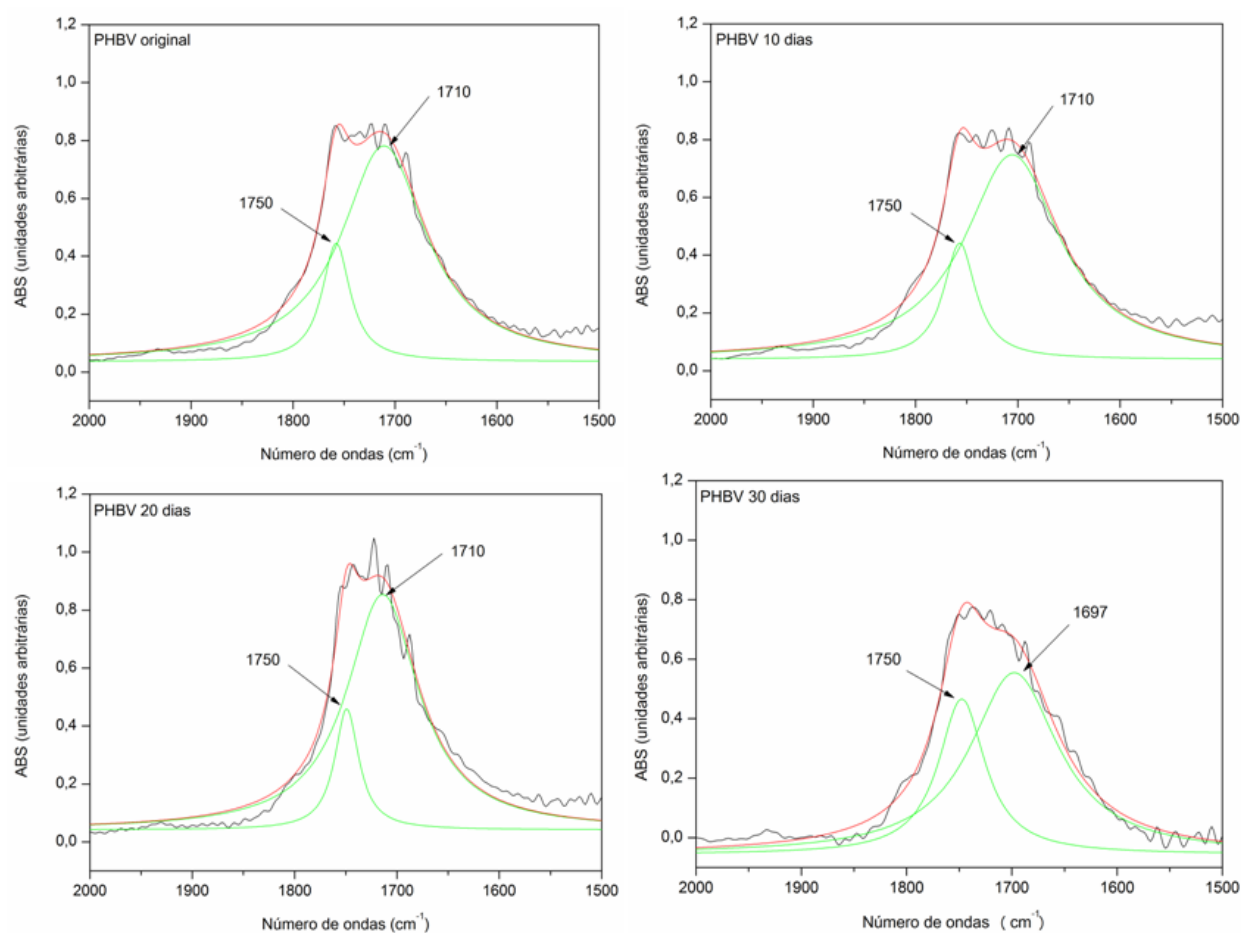


Fonte: Elaborado pelo autor.

A figura 16 compara os espectros de FTIR de filmes de PHBV, originais e biotratados, na região entre 1800 e 1600 cm^{-1} , obtidos por ajuste Lorentziano. Sendo a vibração em 1750 cm^{-1} atribuída a carbonilas de fase amorfa e em 1710 cm^{-1} atribuída a carbonilas de fase cristalina (XU et al, 2002; Li et al, 2003).

As relações entre os valores correspondentes às intensidades das absorvâncias das carbonilas pelo padrão interno em 1380 cm^{-1} fornecem os valores dos índices de carbonilas amorfa e cristalina, respectivamente.

Figura 16 - Espectros de FTIR de filmes de PHBV ajustados pela função Lorentziana, evidenciando as bandas correspondentes a vibrações $\nu_{C=O}$ em 1750 cm^{-1} (amorfa) e 1710 cm^{-1} (cristalina).



Padrão interno: 1380 cm^{-1}

Fonte: Elaborado pelo autor.

A tabela 9 compara os índices de carbonilas amorfa e cristalina obtidos para os filmes de PHBV.

Tabela 9 - Índices de Carbonilas de fase amorfa e cristalina dos filmes de PHBV, original e biotratados.

	Índices de Carbonilas			
	Original	Biotratados		
		10 dias	20 dias	30 dias
Amorfa ($A_{1750/1380}$)	0,41	0,40	0,42	0,52
Cristalina ($A_{1710/1380}$)	0,74	0,70	0,81	0,61*
± 0,05		* Deslocamento de banda (1697cm^{-1})		

Fonte: Elaborado pelo autor.

Observa-se que os filmes de PHBV biotratados por 10 dias não apresentam variação significativa nos índices carbonilas amorfa e cristalina. Entretanto, houve perda de massa após dez dias de biotratamento. Esses dados sugerem que mesmo ocorrendo biodegradação de parte do filme, a relação entre os índices de carbonilas se manteve constante, indicando que houve consumo de ambas as fases indistintamente. Luo e Netravali (2003) verificaram que a degradação do PHBV ocorre na superfície e de forma indiscriminada, tanto na fase cristalina, como na amorfa.

Os filmes biotratados por 20 dias apresentaram aumento de grupos carbonílicos, na fase cristalina (conforme observado na tabela 9), o que pode indicar aumento de cristalinidade (X_c). Polihidroxicanoatos submetidos à biodegradação podem ter a cristalinidade aumentada, seja pelo consumo da fase amorfa, e pela reorganização da mesma, resultando em maior quantidade de fração cristalina. Algumas enzimas agem, primeiramente, degradando a fase amorfa para depois atuar sobre a cristalina e, assim, o índice de cristalinidade tende a aumentar nessa etapa do processo de biodegradação (SPYROS et al, 1997; CHANDRA; RUSTIGI, 1998; LUO; NETRAVALI, 2003; SHAH et al, 2008). Para confirmar o aumento de cristalinidade é recomendado utilizar a técnica de difração de raios-x (DRX), pois pode ocorrer aumento de carbonila na fase cristalina e não necessariamente, aumento de cristalinidade (X_c) de toda a matriz polimérica.

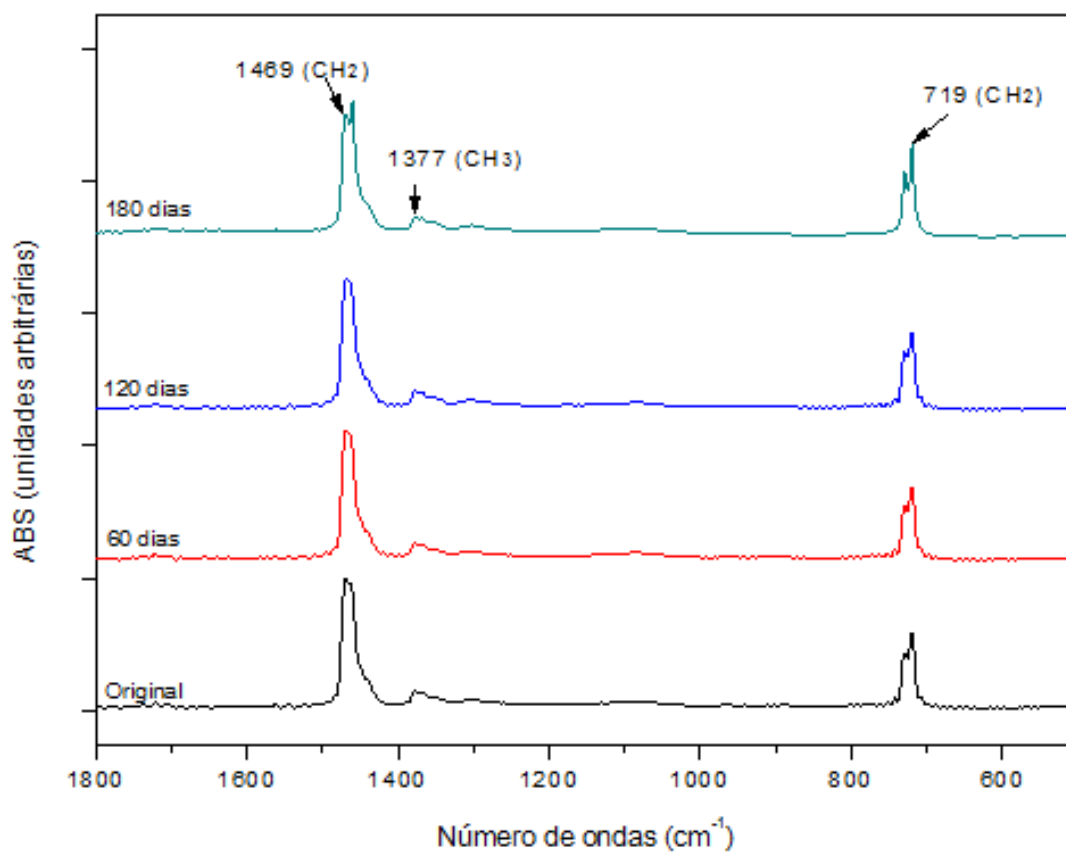
Após 30 dias de biotratamento, observou-se que o índice de carbonila da fase amorfa aumentou em relação ao filme original. O aumento da fração amorfa durante a biodegradação do PHBV pode estar relacionado com o aumento da quantidade de 3HV livre proveniente da hidrólise de ligações éster entre as unidades de 3HV.

Indicando uma exo-clivagem promovida pela enzima PHBV despolimerase (SHAH; HASAN; HAMEED, 2010). A banda correspondente à carbonila de fase cristalina foi deslocada de 1710 para 1697 cm^{-1} , sugerindo a formação de ácidos carboxílicos insaturados (SIVERSTEIN; BASSLER; MORRIL, 1974). Eldsater, Karlsson e Albertsson (1999) verificaram a formação de ânions carboxilatos durante a compostagem do PHBV.

4.2.4.2 PEBD

Os filmes de PEBD, devido à hidrofobicidade que apresentam, tornam-se mais resistentes ao ataque enzimático e, conseqüentemente, sua biodegradação é muito mais lenta quando comparado a um biopolímero como o PHBV (ALBERTSSON; KARLSSON, 1990; CHIPELLINI; CORTI; SWIFT, 2003; Gu, 2003). Na figura 17 pode-se observar que não houve mudanças significativas quanto aos espectros de FTIR na região apresentada.

Figura 17 - Espectros de FTIR de filmes de PEBD normalizados pelo padrão interno a 1469 cm^{-1} .

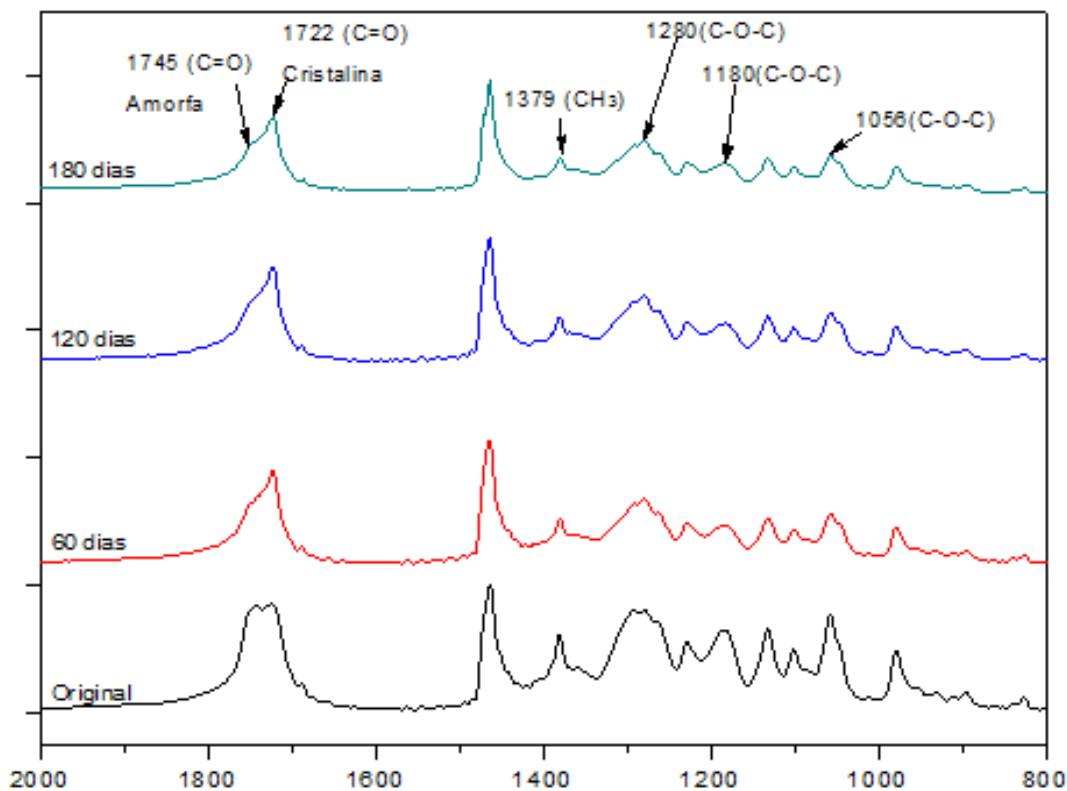


Fonte: Elaborado pelo autor.

4.2.4.3 Blenda

A figura 18 mostra os espectros dos filmes da blenda antes e após o processo biodegradativo, tendo em evidência as principais bandas.

Figura 18 - Espectros de FTIR de filmes de Blenda original e biodegradados, com as principais bandas em evidência.

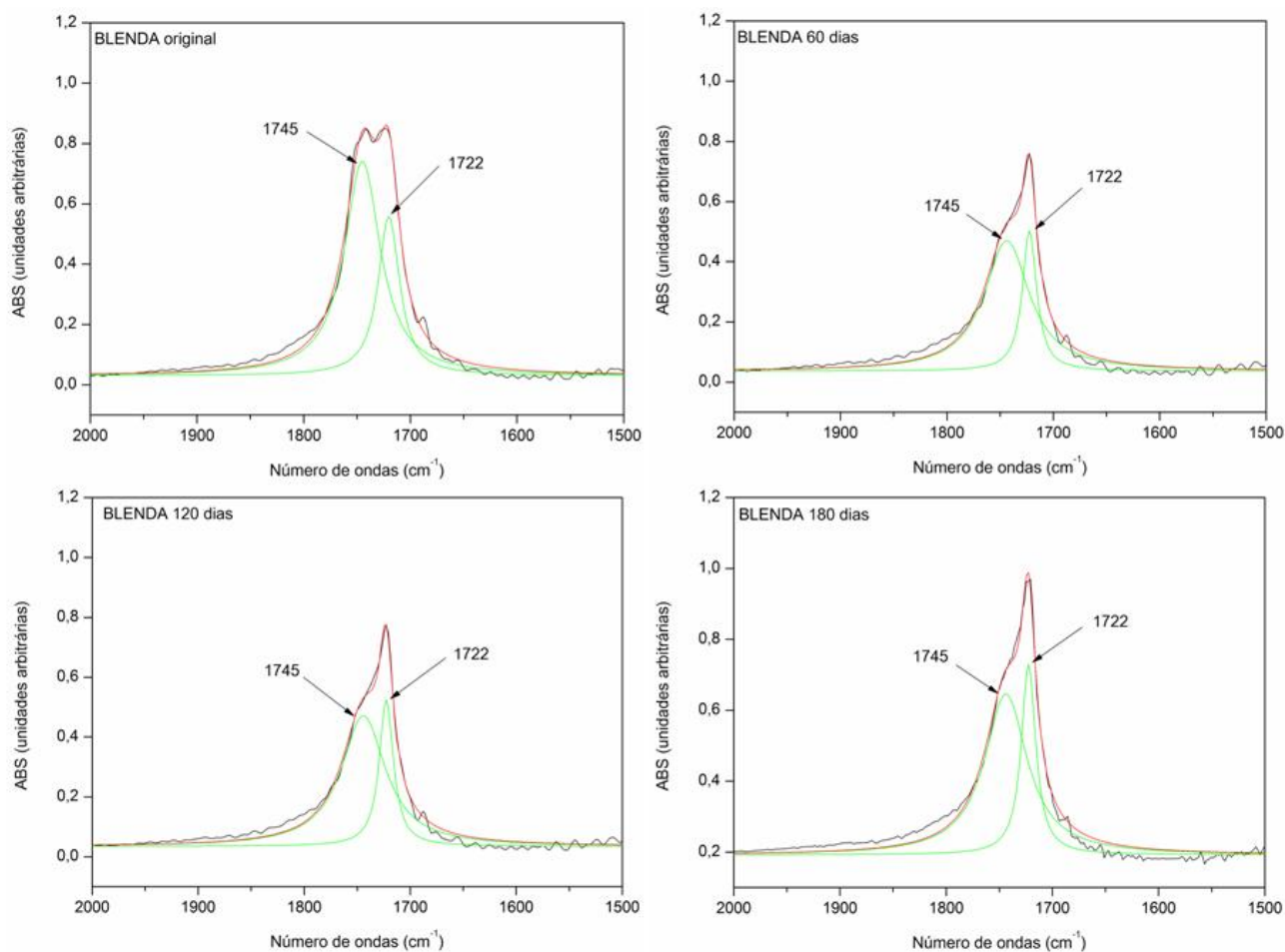


Fonte: Elaborado pelo autor.

O mesmo procedimento foi aplicado para calcular os índices de carbonilas para as blendas de PEBD/PHBV. Porém neste caso, o padrão interno utilizado foi a intensidade obtida em 1469 cm^{-1} .

A partir dos valores das intensidades das bandas obtidos nos gráficos da figura 19, foram calculados os índices de carbonilas de fase amorfa e cristalina, referente à fração PHBV constituinte das blendas (tabela 10).

Figura 19 - Espectros de FTIR de blendas de PEBD/PHBV ajustados pela função Lorentziana, evidenciando as bandas correspondentes a vibrações $\nu_{C=O}$ em 1745 cm^{-1} (amorfa) e 1722 cm^{-1} (cristalina).



Padrão interno: 1469 cm^{-1}

Fonte: Elaborado pelo autor.

Conforme apresentado na tabela 10, os valores dos índices de carbonila de fase amorfa (1745 cm^{-1}) dos filmes de blendas biotratados por 60, 120 e 180 dias diminuíram em relação ao original, porém se mantiveram relativamente constantes até os 180 dias de biotratamento. Os índices correspondentes às carbonilas de fase cristalina (1722 cm^{-1}) não alteraram significativamente. Este fato pode ser explicado pelo consumo da fase amorfa componente da fração PHBV da blenda, uma vez que a mesma é mais susceptível à ação das despolimerases (SHAH; HASAN; HAMEED, 2010; WENG; WANG; WANG, 2011). Esses dados quando comparados com a perda de massa (tabela 8), sugerem que o processo de biodegradação foi de certa

um aumento de 17%. Após a biodegradação da fase amorfa, a tendência é aumentar o índice de cristalinidade, o que é atribuído ao consumo da fração amorfa da matriz polimérica (CHANDRA; RUSTGI, 1998). Na blenda, houve uma maior biodegradação, talvez devida à presença da interfase (não organizada) entre os dois diferentes polímeros, o que favorece a ação microbiana. Isto está de acordo com o trabalho de Gonçalves e Martins-Franchetti (2013) que atribuíram as alterações observadas no PHBV e na Blenda após a ação microbiana às hidrólises de grupos ésteres de PHBV, principalmente na interface entre as fases cristalinas e amorfas (em PHBV) e na interfase das regiões intermédias entre PE e PHBV na blenda.

5 CONCLUSÃO

- O solo utilizado neste estudo constitui um ambiente favorável à biodegradação do PHBV.
- Os filmes de PHBV sofreram maior ação dos micro-organismos, quando comparado com a blenda e o PEBD.
- Durante o período de biotratamento, o PHBV constituinte da blenda teve sua biodegradação estabilizada pela presença do PEBD.
- O FTIR foi capaz de mostrar alterações estruturais relevantes após o processo de biodegradação, tal como a hidrólise de ésteres do PHBV na interfase entre PEBD e PHBV (índices de carbonilas).
- Na blenda ocorreu maior aumento de cristalinidade relativa (FTIR).

BIBLIOGRAFIA

- ABIQUIM – Associação Brasileira da Indústria Química, Disponível em: <<http://www.abiquim.org.br/resinastermoplasticas>>. Acesso em: 29 set 2013.
- AMMALA, A.; BATEMAN, S.; DEAN, K.; PETINAKIS, E.; SANGWAN, P.; WONG, S.; YUAN, Q.; YU, L.; PATRICK, C.; LEONG, K. H. An overview of degradable and biodegradable polyolefins. **Progress in polymer science**, Londres, v. 36, p. 1015-1049, 2011.
- 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. **Polymer degradation and stability**, v. 80, n. 3, p. 513-518, 2003.
- ALBERTSSON, A.; KARLSSON, S. The influence of biotic and abiotic environments on the degradation of polyethylene. **Progress in Polymer science**, v. 15, n. 2, p. 177-192, 1990.
- AVELLA, M.; LA ROTA, G.; MARTUSCELLI, E.; RAIMO, M.; SADOCCO, P.; ELEGIR, G.; RIVA R. Poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) and wheat straw fibre composites: thermal, mechanical properties and biodegradation behaviour. **Journal of materials science**, v. 35, n. 4, p. 829-836, 2000.
- ARKATKAR, A.; ARUTCHELVI, J.; SUDHAKAR, M. ; BHADURI, S.; UPPARA, P. V.; DOBLE, M. Approaches to enhance the biodegradation of polyolefins. **The open environmental engineering journal**, n. 2, p. 68-80, 2009.
- BAYARI, S.; SEVERCAN, F. FTIR study of biodegradable biopolymers: P (3HB), P (3HB-co-4HB) and P (3HB-co-3HV). **Journal of molecular structure**, v. 744, p. 529-534, 2005.
- BHARDWAJ, H.; GUPTA, R.; TIWARI, A. Communities of microbial enzymes associated with biodegradation of plastics. **Journal of Polymers and the Environment**, v. 21, n. 2, p. 575-579, 2012.
- BLOEMBERGEN, S.; HOLDEN, D. A.; HAMER, G. K.; BLUHM, T. L.; MARCHESSAULT, R. H. Studies of composition and crystallinity of bacterial poly (B-hydroxybutyrate-co-Bhydroxyvalerate). **Macromolecules**, Washington, v.19, p. 2865 - 2871, 1986.
- BONHOMME, S.; CUER, A.; DELORT, A. M.; LEMAIRE, J.; SANCELME, M.; SCOTT, G. Environmental biodegradation of polyethylene. **Polymer Degradation and Stability**, v. 81, n. 3, p. 441-452, 2003.
- BOSCARO, M. E.; MARTINS-FRANCHETTI, S. M. Filmes de PP/PHBV biotratados em coluna de solo. **Relatório FAPESP**, 2010.
- BRADING, M. G.; JASS, J.; LAPPIN-SCOTT, H. M. Dynamics of bacterial biofilm formation. **Microbial biofilms**. Cambridge University Press, p. 46-63, 2003.

BRITO, G. F.; AGRAWAL, P.; ARAÚJO, E. M.; MELO, T. J. A. Biopolímeros, Polímeros Biodegradáveis e Polímeros Verdes. **Revista Eletrônica de Materiais e Processos**, vol.6, nº2, p. 127 –139, 2011.

CANEVALORO JR, S. V. **Ciência dos Polímeros**: Um texto básico para tecnólogos e engenheiros. 1ª edição. São Paulo: Artliber editora, 2002. p. 183.

CAIRE, M. **Análise de enrijecedores a flexão**. 2005. Dissertação de Mestrado em Ciências em Engenharia Oceânica, COPPE - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2005.

CANGEMI, J. M.; DOS SANTOS, A. M.; NETO, S. C. Biodegradação: uma alternativa para minimizar os impactos decorrentes dos resíduos plásticos. **Revista Química Nova na Escola**, São Paulo, n. 22, p. 17-21, 2005.

CAMPOS, A.; MARCONATO, J. C.; MARTINS-FRANCHETTI, S. M. The influence of soil and landfill leachate microorganisms in the degradation of PVC/PCL films cast from DMF. **Polímeros**, v. 22, n. 3, p. 220-227, 2012.

CANTO, E. L. **Plástico**: Bem supérfluo ou mal necessário? 1ª edição. São Paulo: Editora Moderna Ltda, 2001. p. 88.

CHANDRA,R.; RUSTGI, R. Biodegradable polymers. **Progress in Polymer Science**, Londres, v. 23, p. 1273-1335, 1998.

CHIELLINI, E.; CORTI, A.; SWIFT, G. Biodegradation of thermally-oxidized, fragmented low-density polyethylenes. **Polymer degradation and stability**, v. 81, n. 2, p. 341-351, 2003.

CHOI, G. G.; KIM, HYUNG W.; RHEE, Y. H. Enzymatic and non-enzymatic degradation of poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) copolyesters produced by *Alcaligenes* sp. MT-16. **The Journal of Microbiology**, v. 42, p. 346-352, 2004.

COUTINHO, F. M. B.; MELLO, I. L.; MARIA, L. C. S. Polietileno: principais tipos, propriedades e aplicações. **Polímeros: Ciência e tecnologia**, São Carlos, v. 13, n. 1, p. 1-13, 2003.

DEDAVID, B. A.; GOMES, C. I.; MACHADO, G. **Microscopia eletrônica de varredura: aplicações e preparação de amostras: materiais poliméricos, metálicos e semicondutores**. Porto Alegre: EDIPUCRS, 2007. p. 60.

EL-HADI, A.; SCHNABEL, R.; STRAUBE, E.; MÜLLER, G.; HENNING, S. Correlation between degree of crystallinity, morphology, glass temperature, mechanical properties and biodegradation of poly (3-hydroxyalkanoate) PHAs and their blends. **Polymer testing**, v. 21, n. 6, p. 665-674, 2002.

ELDSÄTER, C.; KARLSSON, S.; ALBERTSSON, A. Effect of abiotic factors on the degradation of poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) in simulated and natural composting environments. **Polymer degradation and stability**, v. 64, n. 2, p. 177-183, 1999.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. - EMBRAPA Centro Nacional de Pesquisa de Solos Rio de Janeiro, RJ. **Manual de métodos de análise do solo**. Brasília, 1997.

EUBELER, J. P. I.; ZOK, S.; BERNHARD, M.; KNEPPER, T. P. Environmental biodegradation of synthetic polymers I. Test methodologies and procedures. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 28, n. 9, p. 1057-1072, 2009.

FARIA, A. U. **Biodegradação da blenda PP/PHB e homopolímeros por microrganismos de rio poluído e efluente bruto de refinaria de petróleo**. 2009. Dissertação de mestrado em microbiologia aplicada – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2009.

FARIA, A. U.; FRANCHETTI, S. M. M. – Biodegradação de filmes de polipropileno (PP), poli(3-hidroxi-butarato) (PHB) e blenda de PP/PHB por microrganismos das águas do Rio Atibaia. **Polímeros**, vol. 20, nº 2, p. 141-147, 2010.

FEI, B.; CHEN, C.; WU, H.; PENG, S.; WANG, X.; DONG, L. Quantitative FTIR study of PHBV/bisphenol A blends. **European polymer journal**, v. 39, n. 10, p. 1939-1946, 2003.

FERREIRA, J. C. C. de G. **Estudo da degradabilidade de poliestireno modificado quimicamente**. 2004. Dissertação de mestrado em química – Universidade do Minho, Portugal, 2004.

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

FORATO, L. A.; FILHO, R. B.; COLNAGO, L. A. Estudo de métodos de aumento de resolução de espectros de FTIR para análise de estruturas secundárias de proteínas. **Química Nova**, v. 20, n. 5, p. 146-150, 1997.

GOMEZ, J. G. C.; BUENO NETTO, C. L. Produção de poliésteres bacterianos. In.: LIMA, U. A. et al. **Biotecnologia Industrial**, v. 3. Editora Edgard Blücher, São Paulo, 2001. p. 626.

GONÇALVES, S. P. C. **Biodegradação de filmes de PHBV, PCL, PP E Blendas pela ação de microrganismo de solo**. 2009. Tese de Doutorado em microbiologia aplicada – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2009.

GONÇALVES, S. P. C.; MARTINS-FRANCHETTI, S. M. Respirometric evaluation of the biodegradability of films of PE/PHBV blends. **International Journal of Material Science**, v. 3, n. 2, 2013.

GU, J. D. Microbiological deterioration and degradation of synthetic polymeric materials: recent research advances. **International Biodeterioration and Biodegradation**, Londres, v. 52, p. 69-91, 2003.

GULMINE, J. V.; JANISSEK, P. R.; HEISE, H. M.; AKCELRUD, L. Degradation profile of polyethylene after artificial accelerated weathering. **Polymer degradation and stability**, v. 79, n. 3, p. 385-397, 2003.

GUMARGALIEVA, K. Z.; KALININA, I. G.; MIRONOYA, S. N.; ZAIKOV, G. E. Biodegradation of polymers and adhesion properties of microorganism cells. **Polymer degradation and stability**, v. 47, n. 3, p. 363-368, 1995.

HOURSTON, D. J.; BRYSDON, J. A. Degradation of Plastics and Polymers. **Shreir's Corrosion**, p. 2369-2386, 2010.

KACZMAREK, H.; OLDAK, D. The effect of UV-irradiation on composting of polyethylene modified by cellulose. **Polymer degradation and stability**, v. 91, n. 10, p. 2282-2291, 2006.

KANSIZ, M.; DOMÍNGUEZ-VIDAL, A.; MCNAUGHTON, D. LENDL, B. Fourier-transform infrared (FTIR) spectroscopy for monitoring and determining the degree of crystallization of polyhydroxyalkanoates (PHAs). **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, Heidelberg, v. 388, n. 5-6, p. 1207-1213, 2007.

LI, S-D; et al. Thermal degradation of Poly(3-hydroxybutyrate) and Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) as studied by TG, TG-FTIR, and Py-GC/MS. **Journal of Applied Polymer Science**, Wiley InterScience, v. 89, p. 1530-1536, 2003.

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

LUO, S.; NETRAVALI, A. N. A study of physical and mechanical properties of poly (hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate) during composting. **Polymer degradation and stability**, v. 80, n. 1, p. 59-66, 2003.

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; DUNLAP, P. V.; CLARK, D. P. **Microbiologia de Brock**. Artmed, 2004.

MANO, E. B. **Polímeros como materiais de engenharia**. 1ª edição. São Paulo: Editora Blücher, 1991. p. 197.

MANO, E. B.; MENDES, L. C. **Introdução a polímeros**. 2ª edição. São Paulo: Editora Blücher, 1999. p. 191.

MANO, E. B.; PACHECO, E. B. A. V.; BONELLI, C. M. C. **Meio ambiente, poluição e reciclagem**. 1ª edição. São Paulo: Editora Blücher, 2005. p. 182.

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

MONTORO, S. R.; SHIGUE, C. Y.; SORDI, M. L. T.; SANTOS, A. M.; RÉ, M. I. Estudo Cinético da Redução da Massa Molar do Poli (3-Hidroxibutirato-co-3-Hidroxivalerato)(PHBV). **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 20, n. 1, p. 19-24, 2010.

MUMTAZ, T.; KHAN, M. R.; HASSAN, M. A. Study of environmental biodegradation of LDPE films in soil using optical and scanning electron microscopy. **Micron**, v. 41, n. 5, p. 430-438, 2010.

NOWAK, B.; PAJAK, J.; LABUZEK, S.; RYMARZ, G.; TALIK, E. Microorganisms participating in the biodegradation of modified polyethylene films in diferente soils under laboratory conditions. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 65, p. 757-767, 2011.

OHTAKE, Y.; KOBAYASHI, T.; ASABEB, H.; MURAKAMI, N. Studies on biodegradation of LDPE—observation of LDPE films scattered in agricultural fields or in garden soil. **Polymer degradation and stability**, v. 60, n. 1, p. 79-84, 1998.

OLIVEIRA, M. C. B. R. **Gestão de resíduos plásticos pós-consumo: perspectivas para a reciclagem no Brasil**. 2012. Dissertação de Mestrado em Planejamento Energético, COPPE - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2012.

OSAKI, F. **Distribuição espacial de microrganismos e fertilidade em solos de dois ecossistemas florestais: Floresta Ombrófila mista e povoamento florestal com *Pinus taeda* L. em Tijucas do Sul-PR**. 2008. p. 281. Tese de Doutorado em Ciências Florestais – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2008

PACÁKOVÁ, V.; VIRT, J. Plastics. **Journal of Applied Polymer Science**, p. 180-187, 2005.

PASSOS, T. M. **Biodegradação de filmes de polihidroxibutirato-co-hidroxivalerato (PHBV), polietileno de baixa densidade (PEBD) e blenda de PEBD/PHBV (70/30), com fungos específicos**. 2013. Dissertação de mestrado em microbiologia aplicada – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2013.

PELCZAR, M. J.; REID, R. D.; CHAN, E. C. S. **Microbiologia: Conceitos e Aplicações**, vo. 1, 2ª edição. Editora: Makron Books, São Paulo, 1997.

PELLICANO, M.; PACHEKOSKI, W.; AGNELLI, J. A. M. Influência da Adição de Amido de Mandioca na Biodegradação da Blenda Polimérica PHBV/Ecoflex®. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, vol. 19, n. 3, p. 212-217, 2009.

PEREIRA M.G.; VALLADARES, G. S.; ANJOS, L. H. C. D.; BENITES, V. D. M.; ESPÍNDULA JR, A.; EBELING, A. G. Organic carbon determination in histosols and soil horizons with high organic matter content from Brazil. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 63, n. 2, p. 187-193, 2006.

PHILIP, S.; KESHAVARZ, T.; ROY, I. Polyhydroxyalkanoates: biodegradable polymers with a range of applications. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 82, n. 3, p. 233-247, 2007.

PREVIATI, R.; SILVA, J. R. R.; SOUZA, C. R.; JANKE, L. Isolamento e quantificação das populações de bactérias em geral e de actinomicetos presentes no solo. **Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia da UNIPAR**, v. 15, n. 2, 2013.

QUADROS, P. D. **Diversidade e composição de comunidades microbianas de solos construídos e de solos sob diferentes manejos agrícolas**. 2013. Tese de Doutorado em Ciência do Solo – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2013.

QUENTAL, A. C.; HANAMOTO, L. S.; FELISBERTI, M. I. Caracterização de polietilenos lineares de baixa densidade I. Determinação do teor de ramificação por métodos espectroscópicos. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 15, n. 4, p. 274-280, 2005.

RATAJSKA, M.; BORYNIEC, S. Physical and chemical aspects of biodegradation of natural polymers. **Reactive and Functional Polymers**, v. 38, n. 1, p. 35-49, 1998.

RAJANDAS, H.; PARIMANNAN, S.; SATHASIVAM, K.; RAVICHANDRAN, M.; YIN L. S. A novel FTIR-ATR spectroscopy based technique for the estimation of low-density polyethylene biodegradation. **Polymer Testing**, n. 31, p. 1094-1099, 2012.

REDDY, C. S. K.; GHAI, G.; KALIA, V. C. Polyhydroxyalkanoates: an overview. **Bioresource Technology**, v. 87, p. 137-146, 2003.

RIBEIRO, D. V.; MORELLI, M. R. **Resíduos sólidos: Problema ou oportunidade**. 1ª edição. Rio de Janeiro: Interciência, 2009. p. 135.

ROSA, D. S. Avaliação da biodegradação de Poli- β -(Hidroxitirato), Poli- β -(Hidroxitirato-co-valerato) e Poli- ϵ -(caprolactona) em Solo Compostado. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, vol. 12, nº 4, p. 311-317, 2002.

ROSA, D. S.; LOTTO, N. T.; LOPES, D. R.; GUEDES, C. G. F. The use of roughness for evaluating the biodegradation of poly- β -(hydroxybutyrate) and poly- β -(hydroxybutyrate-co- β -valerate). **Polymer Testing**, v. 23, n. 1, p. 3-8, 2004.

ROSTAMI, S. D. Advances in theory of equilibrium melting point depression in miscible polymer blends. **European polymer journal**, v. 36, n. 10, p. 2285-2290, 2000.

SADOCCO, P.; NOCERINO, S.; DUBINI-PAGLIA, Z. A. S.; ELEGIR, G. Characterization of a poly (3-hydroxybutyrate) depolymerase from aureobacterium saperdae: Active site and kinetics of hydrolysis studies. **Journal of environmental polymer degradation**, v. 5, n. 1, p. 57-65, 1997.

SARANTÓPOULOS, C. I. G. L.; OLIVEIRA, L.M.; PADULA, M.; COLTRO L.; ALVES, R. M. V. A; GARCIA, E. E. C. **Embalagens plásticas flexíveis: Principais polímeros e avaliação de propriedades**. 1ª edição. Campinas: CETEA/ ITAL, 2002. p. 267.

SCOTT, G. **Polymers and the environment**. Cambridge: The Royal society of Chemistry, 1999. p. 132.

SHAH, A.; HASAN, F.; HAMEED, A.; AHMED, S. Biological degradation of plastics: A comprehensive review. **Biotechnology Advances**, v. 26, n. 3, p. 246-265, 2008.

SHAH, A.; HASAN, F.; HAMEED, A. Degradation of poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) by a newly isolated *Actinomadura* sp. AF-555, from soil. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 64, n. 4, p. 281-285, 2010.

SILVA, L. F.; GOMEZ, J. G. C.; ROCHA, R. C. S; TACIRO, M. K.; PRADELLA, J. G. C. Produção biotecnológica de polihidroxialcanoatos para a geração de polímeros biodegradáveis no Brasil. **Química Nova**, v. 30, 2007.

SILVERSTEIN, R. M.; BASSLER, G. C.; MORRILL, T. C. **Spectrometric Identification of Organic Compounds**. (3rd) Wiley. New York, p. 31, 1974.

SINGH, B.; SHARMA, N. Mechanistic implications of plastic degradation. **Polymer Degradation and Stability**, v. 93, n. 3, p. 561-584, 2008.

SINGH, S.; MOHANTY, A. K.; SUGIE, T.; TAKAI, Y.; HAMADA, H. Renewable resource based biocomposites from natural fiber and polyhydroxybutyrate-co-valerate (PHBV) bioplastic. **Composites Part A: Applied Science and Manufacturing**, v. 39, n. 5, p. 875-886, 2008.

SIVAN, A. New perspectives in plastic biodegradation. **Current opinion in biotechnology**, v. 22, n. 3, p. 422-426, 2011.

SMEDBERG, A.; HJERTBERG, T.; GUSTAFSSON, B. Crosslinking reactions in an unsaturated low density polyethylene. **Polymer**, v. 38, n. 16, p. 4127-4138, 1997.

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

SPYROS, A.; KIMMICH, R.; BRIESE, B. H.; JENDROSSEK, D. 1 H 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*. **Macromolecules**, v. 30, n. 26, p. 8218-8225, 1997.

SUDHAKAR, M.; DOUBLE, M.; MURTHY, P. S.; VENKATESAN, R. Marine microbe-mediated biodegradation of low- and high-density polyethylenes. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 61, p. 203-213, 2008.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**, 6ª edição. Editora Artmed, Porto Alegre, 2003.

VIJAYA, C. H.; MALIKARJUNA, R. Impact of soil composting using municipal solid waste on biodegradation of plastics. **Indian Journal of Biotechnology**, v. 7, p. 235-239, 2008.

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

WENG, Y. X.; WANG, Y.; WANG, X. L.; WANG, Y. Z. Biodegradation behavior of PHBV films in a pilot-scale composting condition. **Polymer Testing**, v. 29, n. 5, p. 579-587, 2010.

WENG, Y.; WANG, X.; WANG, Y. Biodegradation behavior of PHAs with different chemical structures under controlled composting conditions. **Polymer Testing**, v. 30, n. 4, p. 372-380, 2011.

WENG, Y. X., WANG, L. ZHANG, M., WANG X. L., WANG, Y. Z. Biodegradation behavior of P (3HB, 4HB)/PLA blends in real soil environments. **Polymer testing**, v. 32, p. 60-70, 2013.