



INSTITUTO POLITÉCNICO DE BRAGANÇA Escola Superior de Tecnologia e de Gestão

Biodegradação de Poliuretanos Derivados de Fontes Renováveis

Manuel Martinho Vilas Boas Sepúlveda

Dissertação apresentada à Escola Superior de Tecnologia e de Gestão de Bragança para obtenção do Grau de Mestre em Engenharia Química

Orientado por

Professora Filomena Barreiro

Professora Joana Amaral

Bragança

2010

Agradecimentos

Os meus agradecimentos às Professoras Filomena Barreiro e Joana Amaral pela disponibilidade demonstrada e pelo apoio prestado na conclusão deste trabalho.

À Engenheira Isabel Fernandes pela assistência e orientação durante o desenvolvimento do trabalho.

Às Engenheiras Paula Plasencia e Maria João Afonso pela disponibilidade demonstrada durante a realização do trabalho.

Ao departamento de Tecnologia Química e Biológica da ESTIG, pelas instalações e todo o material dispensado para a elaboração do trabalho.

A todos os professores que de modo directo contribuíram para a minha formação académica.

Resumo

Os impactos ambientais decorrentes da utilização de materiais poliméricos são um sério problema, visto que esses materiais possuem um longo período de degradação, ficando acumulados no ambiente. Neste contexto, o interesse na produção e utilização de materiais poliméricos provenientes de fontes renováveis com carácter biodegradável tem-se intensificado como política de protecção ambiental e sustentabilidade.

As espumas rígidas de poliuretano são polímeros de grande importância em diversas áreas, nomeadamente na construção civil e na fabricação de equipamentos devido às suas propriedades únicas de isolamento. Uma das estratégias utilizadas na tentativa de melhorar a biodegradabilidade destes materiais consiste na utilização de componentes de origem natural, com capacidade intrínseca de biodegradação, na sua formulação.

O presente trabalho teve como objectivo a implementação de diferentes testes de forma a estudar a biodegradação de várias espumas rígidas de poliuretano. Foram avaliadas duas espumas de base lenhina, provenientes de fontes renováveis, e uma espuma comercial.

Numa primeira fase foram realizados testes em placas de petri para verificar o crescimento do microrganismo na presença das várias espumas. Pela análise visual das placas e por microscopia óptica verificou-se que o crescimento foi positivo.

Seguidamente, realizaram-se testes de respirometria em meio líquido e meio sólido (solo) onde a taxa de biodegradação foi medida em função do CO₂ produzido pelo microrganismo e pela análise das espumas por microscopia óptica. Verificou-se que todas as espumas sofreram fenómenos de biodegradação, sendo que a espuma que evidenciou maior biodegradação foi a espuma Indulin AT, seguindo-se a espuma Alcell e finalmente a espuma comercial.

Nos testes de biodegradação em meio sólido, fez-se ainda a comparação entre a biodegradação em solo sem inóculo e com inóculo, tendo-se observado que a adição do fungo *Aspergillus niger* aumenta a biodegradação das espumas.

Palavras-chave: Biodegradação; Poliuretanos; Espumas rígidas; Fungo *Aspergillus niger*

Abstract

The environmental impacts arising from the use of polymeric materials is a serious problem because these materials have a long period of degradation, being accumulated in the environment. In this context, the interest in the production and use of biodegradable polymeric materials from renewable sources is being promoted as a policy of environmental protection and sustainability.

The rigid polyurethane foams are polymers of great importance in several application areas, particularly in construction and equipment manufacturing, due to their unique properties of isolation. One strategy used in the attempt of improving these materials biodegradability, is the use of natural components, with intrinsic capacity of biodegradation, in the formulation process.

The main objective of this work was the implementation of different tests in order to evaluate the biodegradation of several rigid polyurethane foams. Two lignin based foams, obtained from renewable sources, and one commercial foam were evaluated.

As a first approach, tests in petri dishes were performed to check the growth of the microorganism in the presence of the various foams. A positive growth was observed both in the visual analysis of the plates and by optical microscopy.

Subsequently, respirometry tests in liquid and solid (soil) medium were performed. In these tests the rate of biodegradation was measured in terms of the CO₂ produced by the microorganism. The foams were also examined by optical microscopy. It was observed that all foams suffered biodegradation, with Indulin AT being the most affected one, followed by Alcell and finally the commercial foam.

In the biodegradation tests carried out on solid medium, a comparison between the biodegradation in soil with and without the addition of inoculum was also performed. The obtained results demonstrated that the addition of the fungus *Aspergillus niger* enhances the biodegradation of the foams.

Keywords: Biodegradation; Polyurethanes; Rigid foams; Fungus *Aspergillus niger*

Índice

1. Introdução	1
1.1. Importância, motivação e objectivos	1
1.2. Organização da tese.....	3
2. Biodegradação de materiais poliméricos	4
2.1. Polímeros biodegradáveis.....	4
2.1.1. Processo de degradação	5
2.1.2. Mecanismos de degradação	6
2.2. Microrganismos do solo	7
2.3. Fungos como agentes de biodegradação	9
2.3.1. Fungos do género Aspergillus	10
2.4. Normas e Certificações	14
3. Biodegradação de poliuretanos	16
3.1. Química dos poliuretanos.....	16
3.2. Espumas rígidas de poliuretanos.....	17
3.2.1. Matérias-primas.....	18
3.2.2. Aplicações das espumas rígidas	20
3.3. Mecanismos de biodegradação.....	21
4. Testes de biodegradação	23
4.1. Metodologias.....	23
4.2. Parâmetros de medida.....	25
5. Desenvolvimento experimental	29
5.1. Objectivos experimentais.....	29
5.2. Caracterização das espumas de poliuretano	29
5.3. Testes de biodegradação em placas	32
5.3.1. Procedimento experimental	32
5.3.2. Análise e discussão de resultados	33
5.4. Testes de respirometria	38
5.4.1. Testes de respirometria em meio líquido	39

5.4.1.1. Procedimento experimental	39
5.4.1.2. Análise e discussão de resultados.....	40
5.4.2. Testes de respirometria em meio sólido	47
5.4.2.1. Procedimento experimental	47
5.4.2.2. Análise e discussão de resultados.....	48
6. Conclusões e Perspectivas de Trabalho Futuro	60
7. Referências bibliográficas.....	63
8. Anexos	67
Anexo A: Inventário das normas	68
Anexo B: Estudos relatados na literatura sobre a degradação de poliuretanos	73
Anexo C: Amostras duplicadas dos testes de biodegradação em placas	76
Anexo D: Procedimento para a contagem do número de esporos	80
Anexo E: Determinação do teor de humidade do solo	81
Anexo F: Determinação do pH solo	82
Anexo G: Composição dos meios utilizados	83
Anexo H: Valores recolhidos nas titulações dos testes de respirometria	85

Índice de Figuras

Figura 2.1. Representação esquemática dos processos de degradação no ambiente.	5
Figura 2.2. Fungo <i>Aspergillus niger</i> , (a) microscópio óptico (200x), (b) microscópio óptico (400x) e (c) microscopia electrónica de varrimento.	12
Figura 3.1. Reacção de polimerização de um poliuretano.	16
Figura 5.1. Espumas rígidas de poliuretano, (a) espuma Indulin AT, (b) espuma Alcell e (c) espuma comercial.....	30
Figura 5.2. Microscopia óptica da espuma Indulin AT para as ampliações, (a) 20x, (b) 40x e (c) 100x.	31
Figura 5.3. Microscopia óptica da espuma Alcell para as ampliações, (a) 20x, (b) 40x e (c) 100x.	31
Figura 5.4. Microscopia óptica da espuma comercial para as ampliações, (a) 20x, (b) 40x e (c) 100x.	31
Figura 5.5. Testes de biodegradação em placas com <i>Aspergillus niger</i> para as espumas Indulin AT, Alcell e comercial, ao fim de 28 dias.	34
Figura 5.6. Análise da biodegradação em placa da espuma Indulin AT por microscopia óptica. Para cada ampliação as figuras mostram duas zonas distintas da espuma.	35
Figura 5.7. Análise da biodegradação em placa da espuma Alcell por microscopia óptica. Para cada ampliação as figuras mostram duas zonas distintas da espuma.	36
Figura 5.8. Análise da biodegradação em placa da espuma comercial por microscopia óptica. Para cada ampliação as figuras mostram duas zonas distintas da espuma.	37
Figura 5.9. Montagem dos testes de biodegradação em meio líquido.	40
Figura 5.10. Representação gráfica do teste de respirometria em meio líquido.	42
Figura 5.11. Representação gráfica do teste de respirometria em meio líquido com diluição 1:1000.	43
Figura 5.12. Análise da biodegradação em meio líquido da espuma Indulin AT por microscopia óptica. Para cada ampliação as figuras mostram duas zonas distintas da espuma.....	44
Figura 5.13. Análise da biodegradação em meio líquido da espuma Alcell por microscopia óptica. Para cada ampliação as figuras mostram duas zonas distintas da espuma.....	45

Figura 5.14. Análise da biodegradação em meio líquido da espuma comercial por microscopia óptica. Para cada ampliação as figuras mostram duas zonas distintas da espuma.....	46
Figura 5.15. Montagem dos testes de biodegradação em meio sólido sem inóculo.....	47
Figura 5.16. Representação gráfica do teste de respirometria em meio sólido sem inóculo.....	49
Figura 5.17. Análise da biodegradação em meio sólido sem inóculo da espuma Indulin AT por microscopia óptica. Para cada ampliação as figuras mostram duas zonas distintas da espuma.	50
Figura 5.18. Análise da biodegradação em meio sólido sem inóculo da espuma Alcell por microscopia óptica. Para cada ampliação as figuras mostram duas zonas distintas da espuma.....	51
Figura 5.19. Análise da biodegradação em meio sólido sem inóculo da espuma comercial por microscopia óptica. Para cada ampliação as figuras mostram duas zonas distintas da espuma.	52
Figura 5.20. Representação gráfica do teste de respirometria em meio sólido com inóculo.....	54
Figura 5.21. Análise da biodegradação em meio sólido com inóculo da espuma Indulin AT por microscopia óptica. Para cada ampliação as figuras mostram duas zonas distintas da espuma.	55
Figura 5.22. Análise da biodegradação em meio sólido com inóculo da espuma Alcell por microscopia óptica. Para cada ampliação as figuras mostram duas zonas distintas da espuma.....	56
Figura 5.23. Análise da biodegradação em meio sólido com inóculo da espuma Comercial por microscopia óptica. Para cada ampliação as figuras mostram duas zonas distintas da espuma.....	57
Figura 5.24. Representação gráfica da produção de CO ₂ comparada, para a espuma Indulin AT nos testes de biodegradação em meio sólido com inóculo e sem inóculo.....	58
Figura 5.25. Representação gráfica da produção de CO ₂ comparada, para a espuma Alcell nos testes de biodegradação em meio sólido com inóculo e sem inóculo.....	58
Figura 5.26. Representação gráfica da produção de CO ₂ comparada, para a espuma comercial nos testes de biodegradação em meio sólido com inóculo e sem inóculo.....	59
Figura C.1. Testes duplicados da biodegradação em placas com <i>Aspergillus niger</i> para as espumas Indulin AT, Alcell e comercial, ao fim de 28 dias.....	76

Figura C.2. Análise da biodegradação em placa do duplicado da espuma Indulin AT por microscopia óptica. Para cada ampliação as figuras mostram duas zonas distintas da espuma.....	77
Figura C.3. Análise da biodegradação em placa do duplicado da espuma Alcell por microscopia óptica. Para cada ampliação as figuras mostram duas zonas distintas da espuma.....	78
Figura C.4. Análise da biodegradação em placa do duplicado da espuma comercial por microscopia óptica. Para cada ampliação as figuras mostram duas zonas distintas da espuma.....	79

Índice de Tabelas

Tabela 2.1. Esquemas de certificação e rotulagem dos polímeros ambientalmente degradáveis.....	15
Tabela A.1. Lista de normas publicadas pelo Comité ASTM D20.96.....	68
Tabela A.2. Lista de normas publicadas pelo Comité ISO TC61/SC5.....	69
Tabela A.3. Lista de normas publicadas pelo Comité CEN TC261.	71
Tabela A.4. Lista de normas publicadas pelo Comité DIN FNK 103.3.	72
Tabela B.1. Estudos relatados na literatura sobre a degradação de poliuretanos.	74
Tabela H.1. Registo dos valores das titulações dos testes em meio líquido.	87
Tabela H.2. Número de moles de CO ₂ produzido nos testes em meio líquido.....	88
Tabela H.3. Média do número de moles de CO ₂ produzido nos testes em meio líquido..	89
Tabela H.4. Média do número de moles acumulado de CO ₂ produzido nos testes em meio líquido.....	90
Tabela H.5. Registo dos valores das titulações dos testes em meio líquido com diluição 1:1000.....	91
Tabela H.6. Número de moles de CO ₂ produzido nos testes em meio líquido com diluição 1:1000.....	91
Tabela H.7. Média do número de moles de CO ₂ produzido nos testes em meio líquido com diluição 1:1000.	92
Tabela H.8. Média do número de moles acumulado de CO ₂ produzido nos testes em meio líquido com diluição 1:1000.	92
Tabela H.9. Registo dos valores das titulações dos testes em meio sólido sem inóculo.	93
Tabela H.10. Número de moles de CO ₂ produzido nos testes em meio sólido sem inóculo.....	94
Tabela H.11. Média do número de moles de CO ₂ produzido nos testes em meio sólido sem inóculo.	95
Tabela H.12. Média do número de moles acumulado de CO ₂ produzido nos testes em meio sólido sem inóculo.	96
Tabela H.13. Registo dos valores das titulações dos testes em meio sólido com inóculo.....	97

Tabela H.14. Número de moles de CO ₂ produzido nos testes em meio sólido com inóculo.....	98
Tabela H.15. Média do número de moles de CO ₂ produzido nos testes em meio sólido com inóculo.	99
Tabela H.16. Média do número de moles acumulado de CO ₂ produzido nos testes em meio sólido com inóculo.	100

Lista de Abreviaturas

PU	Poliuretano
ATSM	Sociedade Americana de Normas
CEN	Comité Europeu de Normas
ISO	Organização Internacional de Normas
DIN	Instituto Alemão de Normas
ONORM	Instituto Austríaco de Normas
BSI	Instituto Britânico de Normas
BSP	Sociedade de Plásticos Biodegradáveis do Japão
CBO	Carência Biológica de Oxigénio
CQO	Carência Química de Oxigénio
COD	Carbono Orgânico Dissolvido
COT	Carência de Oxigénio Teórico
TDI	Diisocianato de tolueno
MDI	Diisocianato de 4,4-difenilmetano
PMDI	Diisocianato de 4,4-difenilmetano polimérico
CFC	Triclorofluormetano
HCFC	Clorofluorcarbonos hidrogenados
HFC	Hidrocarbonetos perfluorados
FTIR	Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier
AFM	Microscopia de Força Atómica
SEM	Microscopia Electrónica de Varrimento

1. Introdução

1.1. Importância, motivação e objectivos

O desenvolvimento industrial na segunda metade do século XX foi caracterizado pelo surgimento de materiais poliméricos, os quais constituem actualmente grande parte dos materiais utilizados pelo homem. Os materiais poliméricos apresentam uma vasta gama de propriedades que os distinguem dos restantes materiais, nomeadamente ao nível de: propriedades mecânicas, baixa densidade, durabilidade e baixo custo. Para além disso, são amplamente utilizados nas diferentes actividades da sociedade contemporânea e desempenham um papel importante na melhoria da sua qualidade de vida. No entanto, devido à sua persistência no ambiente, os materiais poliméricos representam um perigo para os ecossistemas.

O crescimento económico das últimas décadas resultou num forte incremento da quantidade de resíduos gerados, e naturalmente os resíduos plásticos tornaram-se um problema ambiental a nível mundial. Inevitavelmente, o aumento do uso dos polímeros é acompanhado pela rápida acumulação de resíduos sólidos, que devido à sua resistência à biodegradação, tem um efeito devastador sobre o ambiente.

O crescimento dos resíduos plásticos a nível mundial envolve, dentro de uma visão global de protecção ambiental e sustentabilidade, um grande esforço de acção e estratégias concertadas que visam minimizar o impacto negativo do aumento da sua produção e consumo.

Os factos anteriormente apresentados têm contribuído para o crescimento do interesse da comunidade científica pela investigação e desenvolvimento de polímeros biodegradáveis como uma das formas de minimizar o impacto dos resíduos no meio ambiente.

As espumas rígidas de poliuretano são polímeros que têm vindo a assumir uma importância crescente em diversas áreas de aplicação, tais como na construção civil e na fabricação de equipamentos, devido às suas propriedades únicas de isolamento, registando um crescimento sustentado ao longo do tempo.

A principal motivação deste trabalho consistiu no estudo da biodegradação de espumas rígidas de poliuretanos derivados de fontes renováveis, nomeadamente com base em polióis obtidos por oxipropilação da lenhina. A lenhina é um composto que pode ser extraído da madeira, o que permite aproveitar resíduos sem valor económico provenientes de outras indústrias para a criação de espumas rígidas, as quais mantêm as principais propriedades e características das espumas rígidas comerciais. Desta forma, alcança-se um importante ganho económico e ambiental na medida em que há uma menor produção de resíduos derivados de outras indústrias e simultaneamente os novos materiais, pela incorporação de componentes de origem natural, deverão apresentar uma maior susceptibilidade à biodegradação de modo a que a disposição final dos resíduos seja efectuada de forma a minimizar o impacto ambiental.

Os principais objectivos deste trabalho são, numa primeira fase, analisar os fundamentos da biodegradação de materiais poliméricos, nomeadamente no que se refere a mecanismos de biodegradação e tipos de microrganismos envolvidos, dando especial enfoque à biodegradação de poliuretanos. Serão ainda apresentados os tipos de testes e parâmetros de medida mais vulgarmente utilizados em ensaios de biodegradação. Numa segunda fase serão implementados alguns testes de biodegradação aplicados as espumas rígidas de poliuretanos e posterior avaliação dos resultados obtidos.

1.2. Organização da tese

No capítulo 2, **Biodegradação de materiais poliméricos**, é apresentada uma revisão bibliográfica sobre polímeros biodegradáveis, nomeadamente sobre o processo de degradação e os mecanismos de degradação de polímeros. Neste capítulo faz-se também a abordagem ao tipo de microrganismos do solo e aos fungos como agentes de biodegradação, mais particularmente aos fungos do género *Aspergillus*. Por fim faz-se referência às organizações que produzem normas e certificações utilizadas para avaliar a biodegradação de materiais poliméricos.

No capítulo 3, **Biodegradação de poliuretanos**, descreve-se a química dos poliuretanos, focando a análise nas espumas rígidas de poliuretanos, referindo em particular as matérias-primas utilizadas para a sua fabricação e principais aplicações. Finaliza-se este capítulo com o estudo dos mecanismos de biodegradação dos poliuretanos.

No capítulo 4, **Testes de biodegradação**, apresentam-se os tipos de testes que podem ser utilizados para avaliar a capacidade de biodegradação, salientando-se os mais relevantes para o caso de amostras de polímeros biodegradáveis, nomeadamente poliuretanos. São apresentados igualmente os parâmetros utilizados na monitorização dos resultados (parâmetros de medida).

No capítulo 5, **Desenvolvimento experimental**, descrevem-se os diferentes tipos de espumas rígidas de poliuretanos utilizadas e a implementação dos testes de biodegradação, bem como dos parâmetros de medida utilizados. Para cada tipo de teste de biodegradação é feita a análise e discussão dos resultados obtidos.

No capítulo 6, **Conclusões e Perspectivas de Trabalho Futuro**, serão discutidas as principais conclusões deste trabalho e propostos desenvolvimentos para futuros trabalhos sobre biodegradação de espumas rígidas de poliuretanos.

2. Biodegradação de materiais poliméricos

2.1. Polímeros biodegradáveis

Os polímeros biodegradáveis são materiais relativamente novos que começaram a surgir na década de 80 do século passado, e são considerados como uma das alternativas para minimizar o impacto ambiental produzido pelos resíduos plásticos. Estes novos polímeros são projectados para exibir uma degradação significativa, da qual resultem produtos finais ambientalmente compatíveis, nomeadamente dióxido de carbono (CO₂), água e outras substâncias (biomassa) dentro de um período de tempo aceitável (Innocentni-Mei et al., 2005).

A degradação deste tipo de polímeros é alcançada por vários mecanismos e pela combinação dos mesmos (fotolítica, térmica, mecânica, hidrolítica, oxidativa e biológica), sendo a degradação exclusivamente realizada por processos biológicos, conhecida como "mineralização". É esperado que o processo de degradação dos polímeros biodegradáveis seja completo sem qualquer acumulação de material constituinte que traga risco ao ambiente (Krzan et al., 2006).

O futuro dos polímeros biodegradáveis é promissor tanto para o mercado de produtos com aplicação médica ou farmacêutica, como para o mercado de produtos descartáveis como os produtos de higiene não reutilizáveis, filmes agrícolas e embalagem, com especial importância para este último devido ao seu grande volume e curto período de vida útil. O uso de polímeros biodegradáveis promete um alívio significativo deste passivo ambiental imposto pelos plásticos tradicionais.

Até ao momento, o sucesso dos polímeros biodegradáveis tem sido limitado a algumas áreas. Actualmente, os produtos comercializados com base nestes materiais incluem filmes ou coberturas para utilização na agricultura, recipientes de alimentos de espuma expandida e sacos para as compras. Um espectro muito mais largo de utilização encontra-se actualmente em investigação. Os principais obstáculos para a difusão dos polímeros biodegradáveis são (i) elevado custo de produção e necessidade de investimento em I&D; isto é particularmente válido para as aplicações biomédicas, (ii) ausência de mercado e incentivos legais para os materiais ambientalmente sustentáveis, e (iii) limitada sensibilidade e aceitação pelo público (Krzan et al., 2006).

2.1.1. Processo de degradação

Várias definições têm sido utilizadas para a degradação, mas de forma geral, pode ser descrita como um processo irreversível que leva a uma mudança significativa no material, sendo caracterizada tipicamente pela mudança das suas características (integridade, massa molecular, estrutura química e resistência mecânica) e/ou pela sua fragmentação (Kloss, 2007).

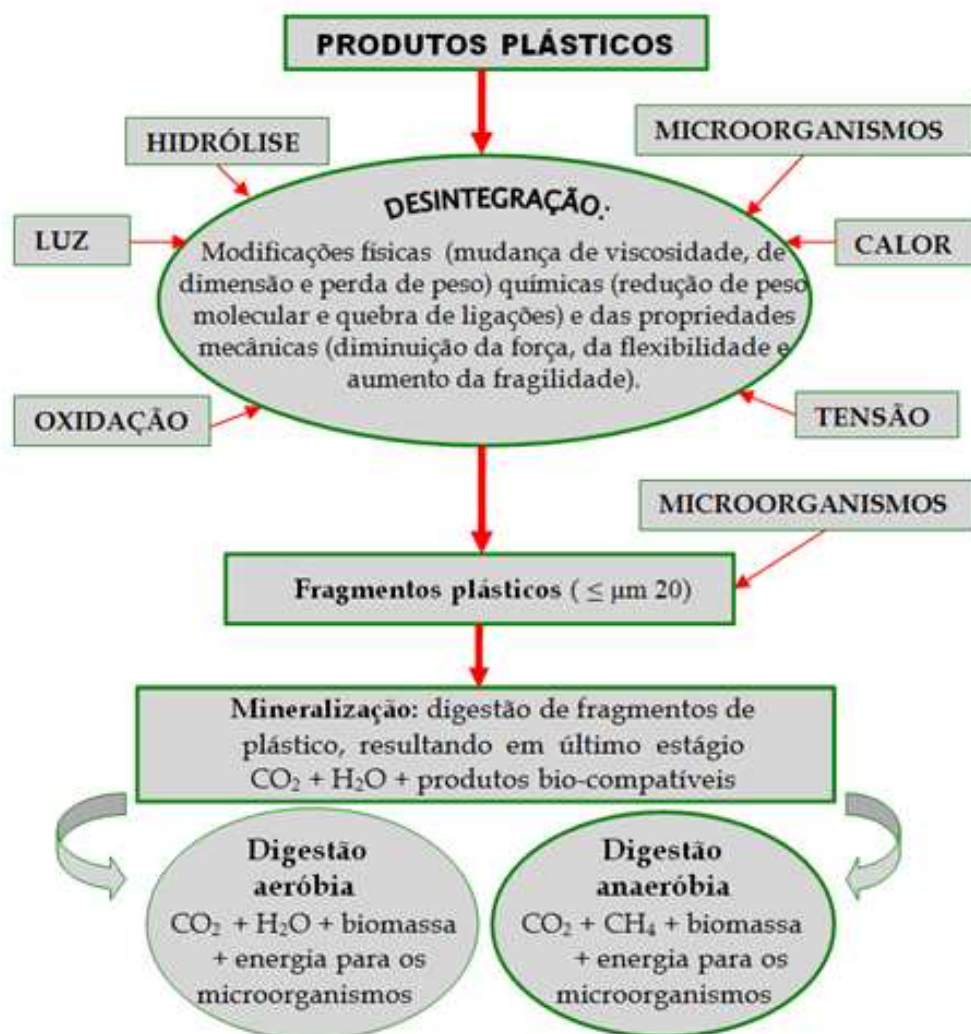


Figura 2.1. Representação esquemática dos processos de degradação no ambiente.
(adaptado de Krzan et al., 2006)

Quando expostos ao meio ambiente, os polímeros ficam sujeitos a uma combinação de vários agentes, tais como calor (degradação térmica), radiação solar (fotodegradação), oxigénio (degradação oxidativa), água (degradação hidrolítica), tensão (degradação mecânica) e biológicos (degradação por microrganismos), o que provoca a sua degradação (Krzan et al., 2006).

O processo pode ser descrito como tendo duas fases, isto é, desintegração e mineralização (ver Figura 2.1). A fase inicial do processo de desintegração está associada com a deterioração das propriedades físicas, tais como descoloração e fragmentação. A segunda fase consiste na conversão dos fragmentos plásticos até ao nível molecular, gerando CO₂, água, biomassa e CH₄ no caso de condições anaeróbias (Krzan et al., 2006).

2.1.2. Mecanismos de degradação

Os principais mecanismos de degradação requerem condições físicas e/ou químicas específicas, podendo ser aplicados de forma individual ou em simultâneo. Seguidamente descrevem-se as suas principais características.

Fotodegradação: é tipicamente induzida pela adição de aditivos foto-sensíveis. Estes aditivos, quando expostos à radiação UV geram radicais livres que atacam aleatoriamente a cadeia molecular e fragmentam as ligações covalentes susceptíveis à oxidação sob condições aeróbias.

Degradação mecânica: este processo envolve a aplicação de uma força (p. ex. moagem) para reduzir o tamanho das partículas de polímero.

Degradação térmica: ocorre quando é fornecida energia suficiente para promover a oxidação do carbono presente na cadeia molecular do polímero.

Degradação oxidativa: este processo é usado sequencialmente após degradação térmica e fotofísica e envolve a reacção do oxigénio com o polímero.

Degradação hidrolítica: este processo requer a presença de grupos hidrolisáveis tais como ésteres ou amidas presentes no amido, nos poliésteres, polianidridos, policarbonatos, poliamidas ou poliuretanos, por exemplo. Compostos desta natureza absorvem humidade do ambiente, levando à clivagem hidrolítica das cadeias poliméricas por agentes químicos ou enzimáticos.

Biodegradação: envolve a ruptura de ligações covalentes pela acção de enzimas, organismos vivos e/ou a secreção de seus produtos. O processo é afectado pela quantidade e tipo de microrganismos disponíveis e pela sua actividade microbiana a qual pode ser condicionada por factores tais como temperatura, humidade, pH, razão C/N e quantidade de oxigénio disponível. O processo pode ocorrer fora das células (exobiodegradação) ou dentro delas (endobiodegradação) ou eventualmente através de uma combinação destes dois mecanismos (Krzan et al., 2006).

2.2. Microrganismos do solo

O solo é um habitat extremamente peculiar com relação aos outros habitats terrestres, no que respeita a sua natureza heterogénea complexa e dinâmica. Tais características permitem que organismos com diferentes metabolismos possam conviver lado a lado, interagindo em estado de equilíbrio dinâmico, muitas vezes, com relações de dependência essenciais para a sua sobrevivência, proporcionando assim, condições para uma biodiversidade elevada (Moreira, 2006).

Quando se fala em biodiversidade e extinção de espécies, na maioria das vezes, refere-se as espécies vegetais e animais que vivem em cima do solo. As comunidades de microrganismos que habitam o solo, por não estarem visíveis aos olhos do homem, raramente são mencionadas e, por isso, geralmente são negligenciados. No entanto, estas comunidades "invisíveis" de microrganismos, realizam actividades imprescindíveis para a manutenção e a sobrevivência das comunidades vegetais e animais (Moreira, 2006).

O solo é um sistema heterogéneo que apresenta três fases, a fase líquida (água com substâncias dissolvidas), a fase gasosa (os mesmos gases da atmosfera, porém em diferentes proporções) e a fase sólida, que é composta por partículas minerais, raízes de plantas, populações de microrganismos e matéria orgânica em várias fases de decomposição. A característica estrutural dominante consiste em partículas de diferentes tamanhos, formas e arranjos (fragmentos de rocha, areia, argila). De modo geral, essa parte sólida representa em torno de 45% do volume total, correspondendo os restantes 50% a espaço poroso (fase líquida e gasosa) e 5% a matéria orgânica (restos de plantas e os microrganismos). A proporção entre as três fases varia em função do tipo de solo e das condições ambientais (Costa, 1995).

Quando os solos contêm mais de 20-30% de matéria orgânica, em espessura superior a 30cm, são considerados como solos orgânicos, todos os outros solos são vulgarmente chamados de solos minerais (Costa, 1995).

Os microrganismos ocupam cerca de 0.5% do espaço poroso do solo, eles estão presentes em todo perfil do solo, porém a sua densidade e diversidade diminuem à medida que aumenta a profundidade e as condições ambientais, pois é na camada superficial (0-30cm) que estão concentrados os maiores teores de matéria orgânica, de nutrientes e de oxigênio, além do efeito das raízes. Estes são de importância fundamental no processo de decomposição, especialmente de resíduos orgânicos, actividade fundamental à manutenção de vida no planeta. Com relação ao clima, quanto mais baixa for a temperatura menor será a actividade microbiana (Moreia, 2006). Todos os microrganismos do solo necessitam de água para a absorção dos nutrientes e integridade da superfície celular e em alguns casos para se movimentarem. A secagem do solo resulta na morte ou inactivação das células vegetativas. A água do solo também afecta outros factores como a actividade microbiana, a aeração do solo, o pH, além da natureza, quantidade e difusão das substâncias dissolvidas (Kloss, 2007).

Uma estimativa dos números de microrganismos presentes em um grama de solo fértil, será (Kloss, 2007):

- Bactérias verdadeiras – 10^8 a 10^9
- Actinomicetas – 10^7 a 10^8
- Fungos – 10^5 a 10^6
- Algas – 10^3 a 10^6

Note-se que, os fungos podem atingir no solo uma massa total superior à das bactérias e em certas condições, parecem ser os organismos do solo mais aptos para decompor determinadas moléculas complexas como a lenhina. Estes são, em geral, menos exigentes quanto à nutrição e mais tolerantes a variações de pH e temperatura (Costa, 1995).

Uma análise rápida sobre a participação dos microrganismos na formação do solo permite concluir que os microrganismos autotróficos são formadores iniciais de matéria orgânica através dos seus metabolitos e das suas células. Porém, as células que morrem servem de alimento para outros microrganismos que ali se instalam e com isso dão início à colonização do solo ou à sucessão ecológica. Assim, na sequência, surgem os microrganismos heterotróficos, representados pelas bactérias, fungos, actinomicetas e algas. Mas este processo de formação do solo é extremamente lento e para formar uma camada de 2,5cm de solo, são necessários de 200 a 1000 anos.

2.3. Fungos como agentes de biodegradação

Como referido, pensa-se que os fungos existentes no solo desempenham um papel importante nos fenómenos de biodegradação, sendo menos exigentes quanto aos nutrientes necessários e mais tolerantes a variações de pH e temperatura.

Os fungos são seres eucarióticos podendo ser unicelulares ou filamentosos. Os unicelulares designam-se de leveduras, apresentando geralmente um diâmetro celular entre 1 e 5µm. São conhecidas cerca de 680 espécies as quais se encontram distribuídas em dois filões do reino Fungi. Os fungos filamentosos, ou bolores, são constituídos por hifas que se ramificam em várias direcções, sendo o conjunto de hifas denominado micélio. São seres heterotróficos e nutrem-se tanto da matéria orgânica morta (fungos saprófitos), como da viva (fungos parasitários). As suas células possuem vida independente e não se reúnem para formar tecidos verdadeiros (Carlile, 2001).

Os fungos são seres ubíquos e o vento age como importante veículo de dispersão dos seus propágulos e de fragmentos de hifas. Desta forma, podem ser encontrados no solo, na água, nos vegetais, em animais, no homem e em detritos, em geral.

Vários são os factores físicos que podem influenciar o seu crescimento, podendo-se destacar a luz e outras radiações, temperatura, gravidade e requisitos nutricionais, estes últimos sendo classificados em macronutrientes (carbono, hidrogénio, oxigénio, fósforo, potássio, azoto e enxofre) e micronutrientes (ferro, manganês e zinco) (Deacon, 2006).

Os fungos são organismos extremamente importantes para o equilíbrio da natureza, desempenhando o papel de agentes decompositores das substâncias orgânicas, degradando restos de plantas e animais. Podem ser encontrados nos mais diversos ambientes e sobre praticamente todos os substratos desde que haja disponibilidade de nutrientes. É inquestionável que os fungos são extremamente importantes na Terra como agentes de degradação. Eles são os principais microrganismos responsáveis pela decomposição da matéria orgânica, interferindo no ciclo do carbono, do azoto, do enxofre, do fósforo e de outros nutrientes. Isto significa que o equilíbrio ambiental está dependente da sua presença e será essencial não esquecer o papel dos fungos no ecossistema global. Em ecossistemas florestais, por exemplo, são os principais agentes decompositores da celulose e da lenhina, libertando nutrientes para o solo. A produção de biomassa no ecossistema florestal é fortemente controlada por fungos, pois estes organismos determinam a taxa a que os nutrientes voltam a estar disponíveis.

Como agentes de biodegradação natural, os fungos encontram no solo, nas árvores, nas plantas, nas frutas, as substâncias necessárias para o seu desenvolvimento, principalmente macromoléculas insolúveis, as quais precisam de ser degradadas em unidades monoméricas solúveis antes de serem absorvidas. Os polissacarídeos, as proteínas, as lenhinas e outros compostos de elevada massa molar ou insolúveis, não podem ser incorporados directamente, tendo de ser transformados em moléculas com reduzida massa molar. Os fungos absorvem nutrientes através da membrana plasmática, como compostos de baixa massa molar dissolvidos em água. Para conseguirem realizar tal feito, esses organismos segregam enzimas especiais para o meio exterior, conseguindo reduzir o tamanho e aumentar a solubilidade das moléculas. Os dissacarídeos, por exemplo, podem ser incorporados pelo fungo na forma intacta, ou podem ser inicialmente hidrolisados. A maltose ou a sacarose são alguns dos principais dissacarídeos que podem servir de substratos aos fungos (Deacon, 2006).

A quantidade de aplicações para os fungos é muito grande, sendo utilizados em numerosos processos industriais (alimentos fermentados), na produção industrial de ácidos orgânicos (ácido cítrico), enzimas (proteases) e na indústria farmacêutica, por exemplo na produção de ergometrina, de cortisona, de antibióticos (penicilina, griseofulvina) e de substâncias imunossupressoras (ciclosporinas).

No entanto, é de referir que os fungos podem igualmente ser agentes causadores de malefícios, podendo-se destacar os problemas na saúde humana (micoses, reacções alérgicas, problemas no sistema respiratório), nos alimentos (deterioração e produção de toxinas carcinogénicas), podendo ainda causar o apodrecimento de roupas, objectos de couro e de madeira (Carlile, 2001).

2.3.1. Fungos do género *Aspergillus*

Aspergillus é o nome usado para designar um género de fungos que se reproduzem apenas por via assexuada. A morfologia dos conidióforos, a estrutura que suporta os esporos assexuados, é a estrutura mais importante utilizada pelos taxonómicos na taxonomia do *Aspergillus*. Espécies de *Aspergillus* são comuns e generalizadas. Elas estão entre os grupos de fungos de maior sucesso, desempenhando um papel importante nos ecossistemas naturais e relevante para economia humana (Machida, 2010).

Existem cerca de 200 espécies de *Aspergillus*, comumente isoladas do solo, de plantas em decomposição e do ar. As espécies de *Aspergillus* produzem um grande número de enzimas extracelulares muitas das quais são aplicadas na biotecnologia (Wainwright, 1992).

Desde a publicação dos primeiros estudos em 1926 até a actualidade, o género *Aspergillus* tornou-se um dos grupos mais conhecidos e mais estudados dentro dos fungos. A sua prevalência no ambiente natural, a sua facilidade de cultivo em meios laboratoriais e a importância económica de várias das suas espécies assegurou que muitos micologistas e microbiologistas industriais se dedicassem ao seu estudo. Os *Aspergillus* crescem abundantemente como saprófitos na decomposição de vegetação, onde foram encontrados em grande número. A maioria das espécies encontra-se adaptada para a degradação de polímeros vegetais complexos, podendo igualmente degradar substratos tão diversos como tecidos humanos ou pergaminhos antigos. A bibliografia refere ainda uma espécie não identificada *Aspergillus* capaz da solubilização de carvão de baixa patente (Machida, 2010).

De entre as espécies mais conhecidas encontram-se o *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus fulmigatus*, *Aspergillus clavatus*, *Aspergillus glaucus*, *Aspergillus ustus* e o *Aspergillus versicolor*. Os *Aspergillus* pertencem ao reino Fungi, filo Ascomycota, ordem dos Eutrotiales, família Trichocomaceae e género *Aspergillus* (Carlile, 2001). Estes fungos reproduzem-se por meio de esporos (conídios), formando micélios compostos por hifas septadas e ramificadas. As suas colónias podem apresentar coloração branca, amarela, amarelo esverdeado ou verde. A taxa de crescimento destes fungos é rápida a moderadamente rápida, excepto no caso de *Aspergillus nidulans* e *Aspergillus glaucus*, que crescem devagar e formam colónias de 0.5 a 1cm quando incubadas a 25°C e por um período de 7 dias em meio de agar Czapek, enquanto o resto dos *Aspergillus* formam colónias de 1 a 9cm de diâmetro.

Por ser relevante no âmbito do trabalho desenvolvido, seguidamente descreve-se com algum detalhe as principais características do *Aspergillus niger*. Este fungo, como o seu nome sugere, é um fungo filamentoso negro, comumente denominado de "mofo negro". O *Aspergillus niger* apresenta como característica particular a formação de colónias brancas a amarelo pálido, que rapidamente formam milhares de esporos o que lhe confere a cor negra característica. Os conídios (esporos) são esféricos, medem de 3 a 5µm e tornam-se rugosos ao atingir a maturação. O *Aspergillus niger* apresenta hifas finas, septadas e conidióforos com vesículas recobertas por conídios negros (Wainwright, 1992).

As condições ótimas de crescimento do *Aspergillus niger* são, temperatura de 25 a 30°C, humidade de cerca de 55-65% e pH de 5-7. O *Aspergillus niger* é um microrganismo aeróbio facultativo, podendo crescer na ausência de oxigénio através da fermentação dos açúcares, o que o torna bastante tolerante ao CO₂ (Deacon, 2006).

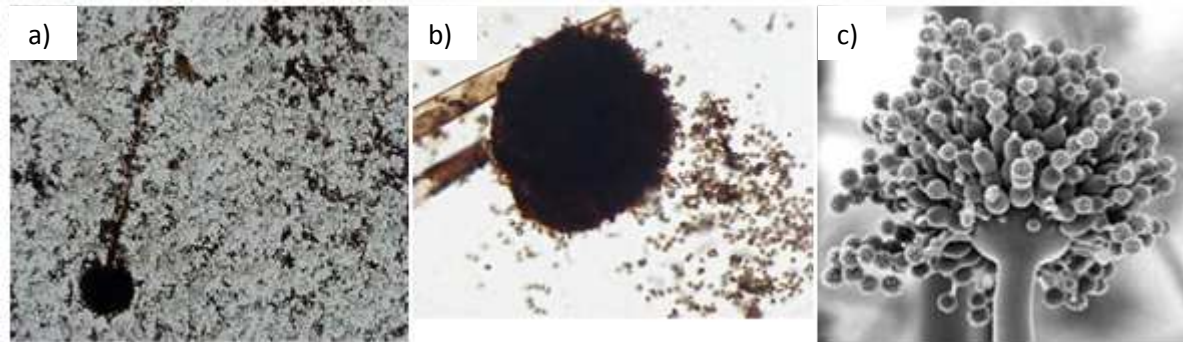


Figura 2.2. Fungo *Aspergillus niger*, (a) microscópio óptico (200x), (b) microscópio óptico (400x) e (c) microscopia electrónica de varrimento. (adaptado de Slivinski, 2007)

Os esporos de *Aspergillus* são componentes comuns de aerossóis, onde derivam pelas correntes de ar, dispersando-se a curtas e longas distâncias, dependendo das condições ambientais. Quando os esporos entram em contacto com uma superfície sólida ou líquida ocorre a sua deposição e, se as condições de humidade forem as correctas, eles germinam. A capacidade de se dispersar globalmente nas correntes de ar e de crescer em qualquer lugar, quando o alimento é adequado e a água está disponível, é uma das características mais comuns para descrever estes fungos (Machida, 2010).

Uma das características que define o reino dos fungos é a sua estratégia nutricional diferenciada. Estes organismos segregam ácidos e enzimas para o meio ambiente circundante, quebrando as moléculas poliméricas mais simples que são então absorvidas para dentro da célula fúngica. Os fungos, como os animais, são heterotróficos. Contudo, enquanto os animais comem o alimento e em seguida digerem-no, no caso dos fungos ocorre algo semelhante ao oposto. Para além da segregação de diversos elementos extracelulares, as forças mecânicas exercidas pelo crescimento das pontas das hifas através dos substratos contribuem para facilitar o acesso aos nutrientes. O processo de decomposição realizada por estes fungos é importante na condução do ciclo natural dos elementos químicos, em especial no ciclo do carbono em que contribuem para a reposição do fornecimento de dióxido de carbono e outros compostos inorgânicos.

No ecossistema, diferentes substratos são atacados a ritmos diversos por consórcios de organismos de diferentes reinos. Os *Aspergillus*, assim como outros fungos, desempenham um papel importante nesses consórcios uma vez que permitem a reciclagem de amidos, hemiceluloses, celulose, pectinas e outros polissacarídeos. Alguns *Aspergillus* são igualmente capazes de degradar compostos mais refractários, tais como gorduras, óleos, quitina e queratina. A decomposição máxima ocorre quando existe azoto suficiente, fósforo e outros nutrientes inorgânicos essenciais.

Espécies dentro do género *Aspergillus* têm um grande repertório químico, bens de consumo produzidos através de fungos *Aspergillus* incluem, o ácido cítrico, o ácido glucónico, o ácido kójico e o ácido itacónico. Vários metabolitos secundários do *Aspergillus* também têm grande importância económica, no qual as estatinas e seus derivados são os mais rentáveis. Estes fármacos de redução do colesterol são agora dos medicamentos mais utilizados (Machida, 2010).

Novas e mais extensas utilizações de enzimas de fungos são vistas como revolucionárias na biotecnologia contemporânea, pois os peritos sobre a política energética estão a concentrar-se em métodos "verdes" de transformação de biomassa. A biomassa teoricamente pode substituir matérias-primas petroquímicas para certos processos químicos. Os fungos têm numerosas enzimas que podem transformar polímeros complexos em açúcares e outras moléculas mais simples que podem ser usados para combustíveis e na síntese química. O género *Aspergillus* representa um enorme potencial para encontrar novas enzimas que poderiam ser usadas para converter a biomassa de plantas em combustíveis e outros produtos industrialmente úteis.

Como referido, os esporos de *Aspergillus* podem ser encontrados em quase toda parte, o que origina uma constante exposição do ser humano a este tipo de fungos. Esta exposição é uma parte normal da condição humana e geralmente, não apresenta nenhum efeito adverso à saúde. No entanto, o *Aspergillus* pode causar doenças em animais de três principais formas: através da produção de micotoxinas, infecções através da indução de respostas alérgicas e através de infecções localizadas ou sistémicas. Nestas duas últimas categorias, o estado imunológico do hospedeiro é fundamental. As alergias e asma são comumente causadas por uma resposta do sistema imunológico contra a presença de esporos de fungos ou hifas. Em contraste, na aspergilose invasiva, o sistema imunitário entra em colapso e pouca ou nenhuma defesa pode ser montada. (Machida, 2010).

2.4. Normas e Certificações

As organizações de normalização têm desempenhado um papel cada vez mais significativo na definição de normas e padrões para os polímeros e plásticos ambientalmente degradáveis.

Krzan et al. (2006) fizeram uma extensa pesquisa onde avaliaram os aspectos mais importantes no que concerne à degradação e ao aumento da quantidade de normas da Sociedade Americana de Normas (ASTM), do Comité Europeu de Normas (CEN), da Organização Internacional de Normas (ISO) e do Instituto Alemão de Normas (DIN), relacionadas com o assunto. Um inventário das normas produzidas por estas organizações é dado no Anexo A.

O organismo internacionalmente reconhecido para a normalização é representado pela ISO, sendo a ASTM, a CEN e a DIN consideradas ramificações regionais. Além disso existe também um número de grupos nacionais de normalização, tais como o Instituto Austríaco de Normas (ONORM), o Instituto de Normas Britânico (BSI) e a Sociedade dos Plásticos Biodegradáveis (BSP) do Japão.





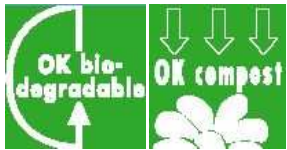
Analisando as normas relacionadas com os de testes de biodegradabilidade, verifica-se que elas representam a maior parte das normas: 42 das 66 normas emitidas pela ASTM, ISO, CEN, e DIN demonstra o reconhecimento por parte destas organizações do significado da biodegradação como o único mecanismo que permite a degradação final do produto (Krzan et al., 2006).

Estas normas são variadas em requisitos, complexidade e capacidade. No entanto, em todos os casos, a determinação do processo de degradação é avaliada medindo um dos três parâmetros: evolução de dióxido de carbono (CO_2), carência biológica e química de oxigénio (CBO e CQO) ou redução do carbono orgânico dissolvido (COD).

As normas são consideradas as bases para o desenvolvimento dos programas de certificação, através dos quais os produtores de polímeros biodegradáveis garantem ao público a degradabilidade dos seus produtos (Innocentni-Mei et al., 2005). Constituem a base através da qual um produto ou grupo de produtos é testado e confirmado com bases científicas, as quais trazem consistência, responsabilidade e confiança aos produtos. A normalização constitui um passo no estabelecimento de um esquema de teste incluindo requerimentos básicos e etapas distintas para a subsequente certificação e rotulação (Krzan et al., 2006).

A Tabela 2.1 mostra alguns rótulos actualmente disponíveis, os seus órgãos certificadores e as normas requeridas.

Tabela 2.1. Esquemas de certificação e rotulagem dos polímeros ambientalmente degradáveis.
(Krzan et al., 2006)

País	Organização	Norma	Símbolo
EUA	Biodegradable Products	ASTM D6400	
Alemanha	International Biodegradable Polymers Association and Working Groups	DIN V 54900 ou EN 13432 ou ASTM D6400	
Japão	Biodegradable Plastics Society	ISO 14851ff. e OECD 301C e JIS K 6950 ff.	
Finlândia	Jätelaito Syhdistys	EN 13432 e ISO 14851 ff.	
Bélgica	AIB Vinçotte	EN 13432 e ISO 14851 ff.	

É muito importante distinguir entre produtos “compostáveis” e “biodegradáveis”. Um produto que é “compostável” deve ser biodegradável. O inverso não é necessariamente verdadeiro. Por outras palavras, se um produto mostra ser “biodegradável” em ambiente de compostagem (por exemplo, estações de compostagem municipais), então ele pode ser reconhecido como “compostável”. Materiais biodegradáveis que degradam em períodos maiores que o ciclo típico de compostagem (4 a 6 meses) devem ser denominados “biodegradáveis” mas não “compostáveis”. Os produtos compostáveis estão também sujeitos a regras e regulamentações adicionais às aplicadas aos compostos de fontes convencionais (Krzan et al., 2006).

3. Biodegradação de poliuretanos

3.1. Química dos poliuretanos

Os poliuretanos (PU) estão presentes em muitos aspectos da vida moderna. Constituem actualmente uma das classes mais importantes de polímeros comerciais. Devido à sua versatilidade e à possibilidade de modificar a sua estrutura, estes materiais possuem uma ampla aplicação em diversas áreas, tais como, na indústria têxtil, indústria automóvel, tintas e revestimentos, medicina, construção civil, calçado, etc. Dependendo do tipo de aplicação pretendido, consegue-se encontrar uma ampla gama de produtos incluindo formas rígidas e flexíveis, elastómeros, revestimentos e adesivos.

As características únicas dos PU são controladas pela sua estrutura molecular, nomeadamente o grau de flexibilidade, rigidez, densidade, estrutura celular (caso das espumas), hidrofiliidade ou hidrofobicidade, características de processamento e propriedades de uso final (Szycher, 1999).

Os PU podem ter diferentes estruturas moleculares: lineares ou ramificados. Os PU lineares são sintetizados por uma reacção química a partir de monómeros difuncionais (diisocianatos e diois (poli-diois)). Os diisocianatos podem ser aromáticos ou alifáticos e os polióis são, maioritariamente, de base poliéster ou poliéter. Os isocianatos reagem com compostos que na sua constituição possuem átomos de hidrogénio activos. Quando estes compostos contêm pelo menos três hidrogénios activos por mole, o produto da reacção é um polímero ramificado (Szycher, 1999). A Figura 3.1 mostra a reacção entre um diisocianato e um polioliol para formar um poliuretano genérico.

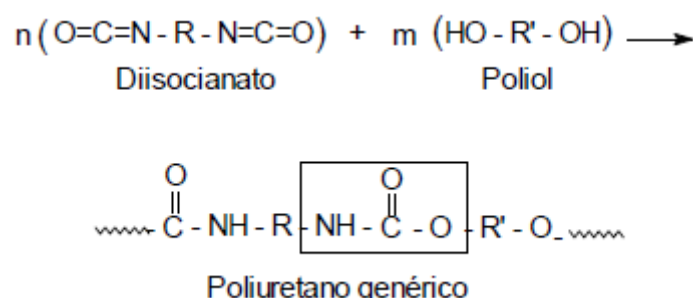


Figura 3.1. Reacção de polimerização de um poliuretano. (adaptado de Kloss, 2007)

3.2. Espumas rígidas de poliuretanos

O termo "poliuretano" abrange uma vasta gama de materiais produzidos pela reacção de isocianatos polifuncionais com substâncias que contenham pelo menos dois grupos hidroxilo. A fracção principal da substância resultante desta reacção é o grupo uretano (Eaves, 2004).

Outros grupos podem ser formados como, a ureia, a amida, biureto, alofanato, ligações éter e ligações éster, dependendo das condições de reacção e dos catalisadores utilizados em particular. Assim, o termo "poliuretano" é muito geral, e abrange produtos com propriedades muito diferentes, incluindo expandidos e não expandidos. O poliuretano rígido expandido tem pouca flexibilidade e uma capacidade de carga de alta tensão em relação à sua densidade. As curvas de compressão/deflexão desses materiais revelam um ponto de rendimento acentuado e portanto, as espumas ficam num estado permanente após a compressão. Em contraste com a estrutura celular aberta de espumas de poliuretano flexível, as espumas rígidas têm uma estrutura celular principalmente fechada. Elas são expandidas usando agentes de expansão física, que são retidos nas células fechadas e que têm uma influência significativa sobre algumas das propriedades de espuma, conferindo um isolamento térmico especial (Eaves, 2004).

Algumas das propriedades importantes das espumas rígidas nas suas aplicações são:

- Alta capacidade de isolamento com espessura reduzida;
- Leve, com alta resistência mecânica;
- Química e biologicamente resistentes;
- Durável;
- Satisfazer os regulamentos contra incêndios em certas aplicações específicas;
- Rápida e facilmente transformado no local. Pode ser pulverizado no lugar.

Os isocianatos base para aplicações de espumas rígidas de isolamento foram introduzidos no início dos anos 50 do século passado. Estas podem ser produzidas tanto por um processo de uma etapa ou pelo processo de pré-polímero usando diisocianato de tolileno (TDI) ou diisocianato de 4,4-difenilmetano (MDI). No primeiro caso, o isocianato e o polioliol reagem e fornecem a espuma final numa única etapa. No processo de pré-polímero, o isocianato em excesso e algum polioliol reagem para fornecer um pré-polímero que então reage com outro polioliol numa etapa posterior, dando-se a formação do polímero final. O processo de pré-polímero tem a vantagem de decorrer com baixos níveis de isocianato livre (e, conseqüentemente, baixa toxicidade), juntamente com uma melhor regulamentação e controle da reacção e menor exotermia. A principal

desvantagem é o processo de produção de pré-polímero em excesso que aumenta o custo (Eaves, 2004).

A reacção isocianato/poliol é exotérmica gerando altas temperaturas dentro da mistura de reacção. A expansão das espumas rígidas de poliuretano resulta em grande medida da evaporação de um agente de expansão adicionado à solução juntamente com um dos componentes. Alternativamente, é possível a utilização de um gás com ponto de ebulição muito inferior à temperatura ambiente. O gás é dissolvido sob pressão num dos componentes e em seguida sai da solução quando os componentes misturados são despressurizados (Eaves, 2004).

As reacções são influenciadas por factores adicionais, incluindo a presença de catalisadores, surfactantes e retardadores de fogo. Esses aditivos regulam a taxa de reacção, o tipo de estrutura química formada, a morfologia da espuma e as propriedades físicas da espuma (Eaves, 2004).

3.2.1. Matérias-primas

Como referido, para a produção de espumas rígidas são necessárias determinadas matérias-primas, sendo frequente a utilização de aditivos. Seguidamente descrevem-se as principais características das matérias-primas e aditivos utilizados com este fim.

Isocianatos: Os diisocianatos mais comuns usados na produção de espumas rígidas de poliuretanos são o TDI e o MDI. A selecção do isocianato é baseada nos seguintes factores, funcionalidade, estrutura química, massa molar, reactividade e disponibilidade do material no mercado. O isocianato serve três propósitos cruciais, (1) reage com a água para formar CO₂, um gás apropriado para a formação de espuma, (2) serve como reagente di ou poli funcional, juntando as moléculas do polioliol pela reacção entre o isocianato e os grupos hidroxilo, então o sistema constrói-se num polímero altamente reticulado, esta reacção é extremamente exotérmica e conseqüentemente proporciona o calor requerido para vaporizar o agente de expansão inerte, bem como para conseguir uma boa cura da espuma, (3) as ligações produzidas de poliurea tornam-se parte da estrutura do polímero e proporcionam rigidez e resistência térmica à espuma (Szycher, 1999).

Polióis: Apesar de os isocianatos serem os grupos funcionais chave na formação de polímeros uretânicos, os componentes que fornecem os grupos hidroxilo para a reacção influenciam crucialmente as propriedades do polímero uretânico final. As fontes dos

grupos hidroxilo para quase todos os polímeros uretânicos comerciais são, o poliéter, o poliéster e os óleos que produzem naturalmente hidroxilo como o óleo de castor.

- Poliéter: São usados como trióis ou polióis de alta funcionalidade e são baseados em moléculas iniciais como a, glicerina, trimetilpropano, sobotinol, sucrose e certos derivados aromáticos:
- Poliésteres: São baseados em ácidos di básicos, como o ácido adipico, e em polióis, como o dietileno glicol. Estes foram largamente substituídos pelos poliéteres, particularmente em aplicações de espumas devido ao seu alto custo associado a uma funcionalidade geralmente baixa, alta viscosidade e baixa estabilidade dimensional da espuma resultante. Mais recentemente porém, o poliéster é cada vez mais utilizado na produção de espumas rígidas de PU para a indústria da construção devido ao efeito retardante de fogo que pode ser alcançado.

A escolha do polioliol tem uma grande influência nas propriedades físicas da espuma resultante. O polioliol determina, (1) se a espuma vai ser rígida ou flexível, (2) se vai ser brilhante ou opaca e (3) a extensão da sua permeabilidade ao gás e à humidade. O polioliol combinado com o isocianato forma a rede polimérica e proporciona à espuma rígida a sua estrutura e propriedades características. A característica mais importante do polioliol é a sua massa equivalente, funcionalidade e a rigidez ou flexibilidade das unidades de corrente (Szycher, 1999).

Catalisadores: Em sistemas de produção de espumas de poliuretano usando o CO₂ formado pela reacção entre a água e o isocianato, é necessário um balanço das taxas relativas das reacções uretânicas. Se a reacção do uretano não é suficientemente rápida, o gás não é retido não se formando a espuma. Por outro lado, se a reacção uretânica é demasiado rápida, o polímero formado é estabilizado antes de o gás ser formado e forma-se uma espuma de alta densidade. A utilização de catalisadores ajuda a regular estas reacções. Aminas terciárias podem ser usadas sozinhas como catalisadores, mas para certas aplicações é necessária mais rapidez e sais de metais, particularmente sais de estanho os quais aceleram as reacções de formação da espuma e podem ser usados sozinhos ou em combinação com outros tipos de catalisadores de aminas terciárias. (Szycher, 1999)

Surfactantes: Ao reduzir a tensão superficial do polioliol os surfactantes podem executar várias funções úteis na fabricação das espumas de poliuretano. Os surfactantes são utilizados principalmente para controlar o tamanho das células e permitir a miscibilidade de misturas de reagentes incompatíveis. Espumas à base de poliéter e poliéster geralmente requerem um surfactante, tanto com expansão do CO₂ da reacção

isocianato/água ou com um agente de expansão inerte como fluorcarbono. Sem surfactante, a espuma pode colapsar ou ter uma estrutura celular grosseira. Sistemas à base de óleo de castor geralmente não requerem surfactante, mas obtêm-se melhores resultados se este for utilizado. Os surfactantes utilizados nas espumas rígidas variam desde do tipo orgânicos, iônicos e não iônicos até aos silicones. Os surfactantes mais utilizados são os copolímeros baseados no dimetil polisiloxano e polisiloxano (Szycher, 1999).

Agentes de expansão: As espumas rígidas de poliuretanos produzidas na década de 60 do século passado usavam triclofluorometano (CFCs) como o princípio de agente de expansão. Após a proibição dos CFCs devido aos problemas ambientais, as alternativas mais estudadas na fabricação de espumas rígidas de poliuretano são, a utilização da água como único agente de expansão o que resulta na perda das propriedades isolantes e o uso de agentes de expansão auxiliares como cloro fluorcarbonos hidrogenados (HCFCs), os pentanos, os hidrocarbonetos perfluorados (HFCs) e o formiato de metilo. Os HCFCs são apenas menos graves quanto à destruição da camada de ozono terrestre do que os CFCs. As opções mais ambientalmente compatíveis recaem na utilização dos pentanos e HFCs. As espumas rígidas para isolamento térmico necessitam do uso de agentes de expansão auxiliares para minimizar a sua condutividade térmica como material isolante. Os gases que ficam retidos nas células fechadas das espumas rígidas de poliuretano são responsáveis pelas excelentes propriedades isolantes do material (Eaves, 2004).

3.2.2. Aplicações das espumas rígidas

As duas principais aplicações para as espumas de poliuretano rígidas encontram-se na área da construção civil e na fabricação de equipamentos, tais como forros para isolamentos de frigoríficos.

Aplicações na construção civil: Na indústria da construção civil a espuma rígida de PU é usada como placas e painéis isolantes, como um material de aplicação no lugar para a pulverização da espuma no local de isolamento e como espuma de ligação de um componente. Na construção de casas, as placas são usadas nos telhados, nos tectos falsos, nas lajes pelo chão, nas paredes para isolamento externo, interno ou em cavidades. Os painéis de PU são utilizados em instalações de frio, de armazenamento e transporte refrigerado. Nos tanques ou em tubos eles podem ser isolados utilizando a pulverização de poliuretano para produzir uma espuma no local.

O crescimento das espumas de poliuretano no sector da construção civil tem aumentado e esse crescimento deverá continuar a um ritmo superior ao crescimento da própria indústria da construção em si, em consonância com as crescentes reivindicações das pessoas para a melhoria do seu conforto e poupança de energia fornecida pelo isolamento (Eaves, 2004).

Aplicações na fabricação de equipamentos: O uso de espumas rígidas de poliuretanos para isolamento em frigoríficos é o outro aplicativo principal para o material. O consumo de espumas rígidas PU em todo o mundo nos frigoríficos foi cerca de 40% do montante utilizado na construção.

Os maiores mercados são a Europa, América do Norte e Japão, embora haja uma tendência de modelos de aparelhos maiores e mais sofisticados para atender a procura dos clientes, o crescimento do mercado nesses países é pequeno ou nulo. A nível mundial, estes países representam 60% do total. O mercado em países menos desenvolvidos, no entanto, ainda não está saturado e mostra um crescimento significativo (Eaves, 2004).

3.3. Mecanismos de biodegradação

Durante muito tempo, os poliuretanos foram considerados não biodegradáveis. No entanto, estes são susceptíveis a ataques microbianos, principalmente por fungos. A biodegradação de poliuretanos por microrganismos é normalmente incompleta e o crescimento destes não é suportado pelo poliuretano sozinho sendo necessárias fontes de carbono adicionais, assim como nutrientes e minerais. A biodegradação dos PU pode ser realizada recorrendo a agentes biológicos (fungos, bactérias) ou enzimas específicas produzidas por estes (Eubeler et al., 2009).

A maioria dos produtos de poliuretano comerciais tem uma estrutura composta por segmentos moles (poliol) e por segmentos rígidos (segmentos que incluem o isocianato) (Tokiwa et al., 2009). De acordo com a literatura, a biodegradação do PU ocorre maioritariamente ao nível dos segmentos moles. Por este motivo o grau de biodegradabilidade está directamente relacionado com o tipo de poliol utilizado na síntese do PU, além de outros factores tais como a cristalinidade do polímero e o grau de reticulação (Howard, 2002). Neste contexto, os poliuretanos de base éster são mais susceptíveis à biodegradação por bactérias, fungos e enzimas. No que respeita aos poliuretanos de base éter, são referidos como mais resistentes à biodegradação (Gautam et al., 2006).

A maior parte dos estudos publicados foca a degradação do PU através da acção de fungos e bactérias. Como exemplo de fungos utilizados podemos citar a *Curvularia senegalensis*, *Fusarium solani*, *Aureobasidium pullulans* e *Cladosporium sp*, que podem ser obtidos a partir do solo. Estes são capazes de degradar o poliuretano de base éster utilizando-o como única fonte de carbono e energia (Howard, 2002). Como exemplo de bactérias, Kay et al. (1991) isolou e investigou 16 bactérias diferentes com capacidade de degradar o poliuretano. Shah et al. (2007) isolou de um filme de poliuretano enterrado no solo durante seis meses, as seguintes bactérias: *Bacillus sp.*, *Pseudomonas sp.*, *Micrococcus sp.*, *Arthrobacter sp.* e *Corynebacterium sp.*

A utilização de enzimas pode ser realizada de duas formas: (1) promover directamente o contacto da enzima com o material ou (2) promover o desenvolvimento de um microrganismo específico no meio de cultura e aguardar que este produza a enzima que vai degradar o PU (Grima et al., 2000). No trabalho de Howard et al. (1999) foram isoladas e caracterizadas dois tipos de poliuretanases as quais desempenham papéis diferentes na biodegradação do poliuretano: uma esteriase ligada covalentemente à membrana celular e uma esteriase extra celular. Inicialmente, a esteriase com ligação membrana celular permite o acesso celular à superfície hidrofóbica do poliuretano. Seguidamente, a esteriase extra celular adere à superfície do poliuretano resultando na sua hidrólise e posterior metabolização.

No Anexo B apresenta-se uma tabela com os aspectos mais importantes de estudos disponíveis na literatura relativos a estudos de biodegradação de poliuretanos, consultados no âmbito da realização deste trabalho.

4. Testes de biodegradação

Dos vários testes que podem ser utilizados para avaliar a capacidade de biodegradação vão-se salientar os mais relevantes para o teste de amostras de polímeros biodegradáveis, nomeadamente poliuretanos. Serão apresentados igualmente os parâmetros utilizados na monitorização dos resultados (parâmetros de medida).

4.1. Metodologias

Ensaio com enzimas: nos ensaios com enzimas o substrato do polímero é adicionado a uma solução tampão ou a um sistema em que o pH é controlado, contendo um ou vários tipos de enzimas purificadas. Estes ensaios são muito úteis na avaliação da cinética da despolimerização ou na libertação do monómero da cadeia do polímero sob diferentes condições de ensaio. Este método é muito rápido, necessitando de alguns minutos a horas, podendo fornecer informação quantitativa. No entanto, as taxas de mineralização não podem ser determinadas nestes ensaios.

Testes de placas: os testes de placas foram primeiramente desenvolvidos para determinar a resistência dos polímeros à degradação por microrganismos. Existem vários métodos normalizados por organizações tais como a ASTM ou a ISO. Os testes de placas também são utilizados para ver se o material polimérico suporta o crescimento dos microrganismos. O princípio deste método consiste em colocar o material de teste na superfície de uma placa de petri com agar, não contendo nenhuma fonte adicional de carbono. O material de teste e a superfície do agar são pulverizadas com um inóculo normalizado de bactérias e/ou fungos conhecidos. O material de teste é examinado após um determinado período de incubação a temperatura constante, para que a quantidade e ritmo de crescimento na sua superfície seja determinada.

Testes de respiração: a actividade microbiana aeróbia é tipicamente caracterizada pela utilização do oxigénio. A biodegradação aeróbia requer oxigénio para a oxidação dos seus componentes nos seus constituintes minerais, tais como o CO_2 , H_2O , SO_2 , P_2O_5 , etc. A quantidade de oxigénio utilizada durante a incubação, também chamada de carência biológica de oxigénio (CBO) é uma medida do grau de biodegradação dos polímeros. Os vários métodos de teste baseados na medição da CBO são expressos frequentemente como a percentagem da carência de oxigénio teórico (COT) do componente. O COT, que é a quantidade teórica de oxigénio necessária para uma completa oxidação do substrato

nos seus constituintes minerais, pode ser calculado considerando a composição elementar e a estequiométrica da oxidação ou baseado na determinação experimental da carência química de oxigénio (CQO).

Testes de evolução de gás (CO₂ ou CH₄): a evolução do dióxido de carbono ou do metano num substrato representa um parâmetro directo da mineralização. Portanto, testes de evolução de gás podem ser uma ferramenta importante na determinação da biodegradabilidade de materiais poliméricos. Existem várias metodologias de teste que foram normalizadas para a avaliação da biodegradação aeróbia, como por exemplo, o teste de Sturm e os testes laboratoriais de compostagem controlada. Para os testes de biodegradação anaeróbia foram desenvolvidos outros métodos tais como o teste de lamas e o teste de digestão anaeróbia. Embora o princípio destes métodos de teste sejam os mesmos, estes podem-se diferenciar na composição do meio, na substância inoculada, na maneira como os substratos são introduzidos e na técnica de medição da evolução do gás.

Polímeros marcados radioactivamente: alguns materiais apresentam tendência para se degradar muito lentamente sob condições de teste rigorosas e na ausência de fontes adicionais de carbono. De referir que se adicionarmos fontes de carbono torna-se impossível determinar qual a quantidade de dióxido de carbono envolvido na decomposição do polímero. A incorporação de carbono radioactivo (¹⁴C) nos polímeros sintéticos permite distinguir entre o CO₂ ou CH₄ produzido pelo metabolismo do polímero e aquele que foi produzido por outras fontes de carbono utilizadas nos testes. Pela comparação da quantidade de dióxido de carbono radioactivo (¹⁴CO₂) ou metano radioactivo (¹⁴CH₄) com a radioactividade original do polímero marcado, é possível determinar a percentagem em massa de carbono no polímero que foi mineralizada durante a duração da exposição. Uma gama de gases marcados radioactivamente ou produtos de baixo peso molecular também podem providenciar métodos de extrema sensibilidade e reprodutibilidade para determinar a degradação de polímeros com baixa susceptibilidade a enzimas.

Testes de degradação acelerada à escala laboratorial: a biodegradação de um material polimérico está usualmente associado a mudanças nas propriedades físicas, químicas e mecânicas do material. São essas mudanças nas propriedades, que tornam o processo de biodegradação interessante do ponto de vista de aplicação. Estas propriedades podem ser medidas em função da duração da exposição a um meio abiótico permitindo seguir as consequências do processo de biodegradação nas propriedades desses materiais. O meio abiótico pode ser desenhado especificamente a uma escala laboratorial a fim de imitar os sistemas naturais mas com o máximo controlo das variáveis em jogo como, a temperatura, pH, comunidades de microrganismos, agitação

mecânica e o abastecimento de oxigénio. Regulando estas variáveis melhora-se a reprodutibilidade e pode-se acelerar o processo de degradação. Estas simulações laboratoriais podem também ser usadas para avaliar os efeitos a longo prazo da degradação do polímero no ambiente e no sistema de deposição.

Ambientes naturais - Testes no terreno: a exposição a ambientes naturais proporciona uma medida mais realista do destino ambiental de um polímero, porque estes testes incluem uma diversidade de organismos reproduzindo a relação entre substrato, o agente microbiano e o ambiente. No entanto, os resultados dessa exposição só são relevantes no ambiente específico estudado, que difere substancialmente de muitos outros ambientes. Um problema adicional é a escala do tempo destes testes, porque o processo de degradação, dependendo do ambiente, pode ser muito lento podendo durar meses e anos. Para além disso, pouca informação pode ser obtida sobre o processo de degradação (Bastioli, 2005).

4.2. Parâmetros de medida

Observações visuais: as avaliações das mudanças visíveis dos plásticos podem ser executadas em quase todos os testes. Os efeitos usados para descrever a degradação incluem, a rugosidade da superfície, formação de buracos ou fissuras, desfragmentação, mudanças na cor ou a formação de biofilmes na superfície. Estas mudanças não provam a presença do processo de biodegradação em termos de metabolismo, mas o parâmetro de alterações visuais pode ser usado como uma primeira indicação da existência de qualquer ataque efectuado por microrganismos. Para obter informações sobre o mecanismo de degradação pode-se utilizar aparelhos mais sofisticados, como por exemplo, a microscopia electrónica de varrimento (SEM), a microscopia de força atómica (AFM), a espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR), etc.

Medições da perda de massa – determinação do polímero residual: a perda de massa de polímero é amplamente utilizada nos testes de degradação, especialmente nos testes no terreno ou em testes de simulação, embora nenhuma prova directa de biodegradação possa ser obtida. Podem surgir problemas com a correcta limpeza ou desintegração do material. Neste último caso, as amostras podem ser colocadas em pequenas redes para facilitar a sua recuperação. Uma análise da matriz que rodeia a amostra do plástico permite uma melhor determinação quantitativa das características da desintegração. Ao combinar uma análise estrutural do material residual e dos

intermediários de baixa massa molecular, pode-se obter informações detalhadas sobre o processo de degradação.

Mudanças nas propriedades mecânicas e na massa molecular: tal como acontece com as observações visuais, alterações nas propriedades do material não podem ser demonstradas directamente. No entanto, mudanças nas propriedades mecânicas são muitas vezes utilizadas quando surgem pequenas alterações na massa da amostra de teste. Propriedades como a resistência à tensão são muito sensíveis a mudanças da massa molecular dos polímeros, o que é muitas vezes um indicador de degradação. Embora, para uma despolimerização induzida por enzimas as propriedades do material só variem se a perda de massa observada for significativa (a amostra começa a ficar mais fina devido ao processo de erosão superficial e a parte interna do material não é afectado pelo processo de degradação), para processos de degradação abióticos, as propriedades mecânicas podem alterar-se significativamente, apesar de não ocorrer perda de massa devido à solubilização dos intermediários da degradação. Como consequência, este tipo de medida é muitas vezes utilizado para materiais onde os processos abióticos são responsáveis pela primeira etapa de degradação.

Evolução CO₂/Consumo de O₂: em condições aeróbias, os microrganismos usam o oxigénio para oxidar o carbono e forma-se dióxido de carbono como um dos principais produtos dos efeitos metabólicos. Consequentemente, o consumo de oxigénio (teste de respirometria) ou a formação de dióxido de carbono (teste Sturm) são bons indicadores para a degradação do polímero e são os métodos mais frequentemente utilizados para medir a biodegradação em testes de laboratório. Devido à quantidade normalmente baixa de outras fontes de carbono presentes além do polímero, quando se utilizam meios minerais sintéticos, apenas uma respiração de fundo relativamente baixa é identificada e a precisão dos testes é geralmente boa. Em particular, vários métodos analíticos foram adaptados para a determinação de CO₂. Além dos meios convencionais para reter o CO₂ numa solução de Ba(OH)₂ seguido por uma titulação manual, detectores de infravermelhos e magnéticos de O₂ podem também ser utilizados para monitorizar as concentrações de O₂ e CO₂. Embora, as medições automáticas e contínuas tenham vantagens, apresentam também desvantagens. Por exemplo, o fluxo de ar deve ser medido de forma precisa, os sinais dos detectores devem ser estáveis por longos períodos de tempo se queremos determinar processos de degradação lentos, se a concentração de CO₂ ou a queda na concentração de O₂ a ser detectada é muito pequena aumentamos a probabilidade de termos erros sistemáticos. Dentro destas circunstâncias, outros conceitos como, por exemplo, a retenção de CO₂ numa solução básica (pH±11.5) com uma titulação contínua ou a detecção do carbono inorgânico dissolvido, podem ser alternativas úteis. Outras tentativas para superar os problemas com a detecção do CO₂

são baseadas em sistemas fechados de arejamento não contínuo. Aqui temos uma técnica que combina um analisador de gás infravermelho com sistema de titulação. Um sistema fechado com um sistema de titulação descontínuo consiste na realização de testes utilizando pequenos frascos fechados como reactores de degradação e analisando a evolução do CO₂ ou a diminuição do oxigénio dissolvido (testes em frasco fechado). Estes testes são simples e relativamente insensíveis a fugas, mas pode causar problemas devido à baixa quantidade de material e substâncias inoculadas utilizadas.

Embora utilizada inicialmente em sistemas de teste aquoso para a degradação de polímeros, a análise de CO₂ também foi adaptada para a realização de testes em matrizes sólidas como composto, resultando posteriormente num método normalizado designado por, teste de compostagem controlada. Para a avaliação da degradação do polímero no solo, a detecção de CO₂ mostra-se mais complicada do que quando utilizado composto, não só por causa da taxa de degradação mais lenta, resultando em testes de longa duração (até 2 anos), mas também porque a evolução do CO₂ é baixa quando comparada com a do carbono presente no solo. Uma forma de superar estes problemas consiste na utilização de uma matriz inerte, sem carbono e porosa, humedecida com um meio sintético e inoculada com uma população microbiana mista. Este método mostrou-se praticável para simular as condições de compostagem (degradação ≈60°C), mas ainda não foi otimizado para as condições do solo (Grima et al., 2000).

Radiomarcação: em contraste com a análise de resíduos, a medição da evolução de CO₂ e as medições com ¹⁴CO₂ são simples, não destrutivas e medem a biodegradabilidade final. Materiais marcados com ¹⁴C podem ser expostos a determinados ambientes microbianos e a quantidade libertada de dióxido de carbono contendo ¹⁴C é estimada, utilizando um contador de cintilação. Este método não está sujeito à interferência de impurezas ou aditivos biodegradáveis no polímero. Por este motivo, a avaliação da biodegradabilidade utilizando esta técnica apresenta um elevado grau de precisão e consistência. No entanto, esta técnica é dispendiosa e os materiais radioactivos nem sempre estão disponíveis. A licença e os problemas com eliminação de resíduos radioactivos também podem ser um inconveniente.

Formação de uma zona livre: um método simples e semi-quantitativo é o chamado teste de zona livre. Este é um teste baseado na utilização de placas de petri em que o polímero está disperso em partículas muito finas incorporadas no agar, resultando num meio de aparência opaca. Após a inoculação com microrganismos, a formação de um halo livre ao redor da colónia indica que estes são menos capazes de despolimerizar o polímero, que é o primeiro passo de biodegradação. Este método é geralmente aplicado certas gamas de microrganismos que podem degradar um determinado polímero, mas

também pode ser usado para obter resultados semi-quantitativos, analisando o crescimento das zonas livres (halo).

Degradação enzimática: a degradação enzimática de polímeros por hidrólise é um processo com duas fases, primeiro a enzima liga-se ao substrato do polímero e em seguida catalisa a clivagem hidrolítica. Os materiais poliméricos podem ser degradados, quer pela acção de despolimerizadores intracelulares e extracelulares produzidos por bactérias e/ou fungos. A degradação intracelular consiste na hidrólise de um reservatório de carbono endógeno pela acumulação de bactérias, enquanto a degradação extracelular consiste na utilização de uma fonte de carbono exógena, não necessariamente pela acumulação de microrganismos. Durante a degradação, enzimas extracelulares produzidas pelos microrganismos quebram os polímeros em cadeias curtas ou moléculas menores, por exemplo, oligómeros, dímeros e monómeros, que são pequenos o suficiente para passar a membrana exterior semi-permeável das bactérias. Este processo é chamado de despolimerização. Estas moléculas de cadeia curta são, então, mineralizadas em produtos finais como por exemplo, em CO_2 , H_2O ou CH_4 .

Teste de compostagem controlada: a compostagem de plásticos biodegradáveis é uma forma de valorização dos resíduos que pode reduzir a necessidade crescente de novos locais de deposição em aterro. As condições ambientais dos testes de compostagem são as seguintes: temperaturas altas ($58\text{ }^\circ\text{C}$), condições aeróbias e teor de humidade adequada (cerca de 50%). O composto maduro é usado como uma matriz sólida, como uma fonte de microrganismos termofílicos e como fonte de nutrientes. O método de teste é baseado na determinação da evolução do CO_2 , isto é, o CO_2 envolvido da mistura de polímero com composto, menos o CO_2 envolvido de um composto sem alterações testado em separado num reactor diferente. Um importante requisito é que o material em estudo não deve libertar, durante a degradação, compostos tóxicos no composto pois pode prejudicar as plantas, animais e seres humanos (Shah et al., 2008).

5. Desenvolvimento experimental

5.1. Objectivos experimentais

O objectivo deste trabalho consistiu no estudo da biodegradação de espumas de poliuretano provenientes de fontes renováveis, como são as espumas de base lenhina, por um microrganismo específico, neste caso, o fungo *Aspergillus niger*. O desenvolvimento experimental encontra-se dividido em três partes:

- **Testes de biodegradação em placas**, este é um teste preliminar cujo objectivo consiste em verificar se a espuma de poliuretano suporta o crescimento do fungo *Aspergillus niger*;
- **Testes de respirometria em meio líquido**, no qual se pretende analisar a biodegradação das espumas de poliuretano pelo fungo *Aspergillus niger*, em meio líquido (caldo nutritivo);
- **Testes de respirometria em meio sólido**, em que o estudo incide sobre a biodegradação das espumas de poliuretano pelo fungo *Aspergillus niger*, em meio sólido (solo).

Os fungos são os principais microrganismos responsáveis pela decomposição da matéria orgânica, por exemplo, em ambientes florestais são os principais agentes decompositores da celulose e da lenhina. O fungo *Aspergillus niger* foi o microrganismo escolhido devido à sua capacidade natural para promover a biodegradação. Grazali et al. (2005) utilizou o fungo *Aspergillus niger* para avaliar a biodegradação de espumas de PU em placas de petri verificando e avaliando a assimilação das espumas pelos microrganismos. Llanos et al. (2009) usou o fungo *Aspergillus niger* para quantificar a degradação de amostras de PU provenientes de paredes de frigoríficos.

5.2. Caracterização das espumas de poliuretano

Neste trabalho os estudos de biodegradação incidiram sobre 2 amostras de espuma de poliuretano sintetizadas com um polioliol de base lenhina obtido por oxipropilação. Essas amostras são designadas por "espuma Indulin AT" e "espuma Alcell" reflectindo a lenhina base utilizada na preparação do polioliol. Como controlo utilizou-se uma espuma preparada com um polioliol comercial de base poliéter (Lupranol 3323) que se designou por "espuma

comercial". A síntese das espumas foi realizada num trabalho prévio (Cateto, 2009) utilizando o seguinte sistema químico: polioli (de base lenhina ou comercial), MDI polimérico (PMDI), um surfactante de base silicone (SR-321 NIAX), uma mistura de catalisadores (NIAX:DMCHA, 50:50), um agente de reticulação (glicerol) e um agente de expansão (*n*-pentano). De forma sucinta, utilizou-se o seguinte procedimento experimental: (1) O polioli combinado com o glicerol (10%, m/m) foi misturado com o surfactante (2%, m/m) e a combinação de catalisadores (2%, m/m) durante 60 segundos; (2) Adicionou-se o *n*-pentano (20%, m/m) e a mistura foi agitada durante mais 30 segundos; (3) Adicionou-se o isocianato num único passo e a mistura reaccional foi agitada durante mais 15 segundos, tempo após o qual foi deixada crescer livremente e curar à temperatura ambiente durante 24 horas. Utilizou-se uma razão NCO/OH de 1:1. As percentagens apresentadas são baseadas na massa de polioli utilizado.

Para os ensaios de biodegradação utilizaram-se amostras quadradas (6X6 mm) com uma espessura de 2 mm. A Figura 5.1 mostra o aspecto das amostras originais (antes de serem submetidas aos ensaios de biodegradação) e as Figuras 5.2 a 5.4, a morfologia das espumas observada a diferentes ampliações, respectivamente para as espumas Indulin AT, Alcell e comercial.



Figura 5.1. Espumas rígidas de poliuretano, (a) espuma Indulin AT, (b) espuma Alcell e (c) espuma comercial.

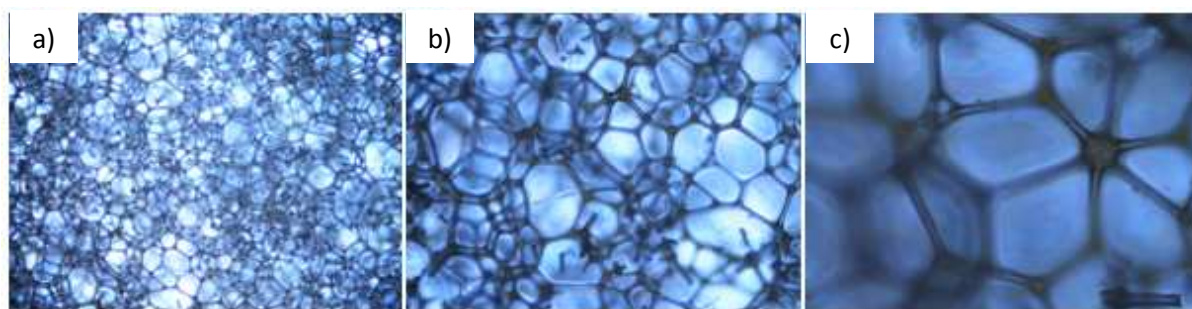


Figura 5.2. Microscopia óptica da espuma Indulin AT para as ampliações, (a) 20x, (b) 40x e (c) 100x.

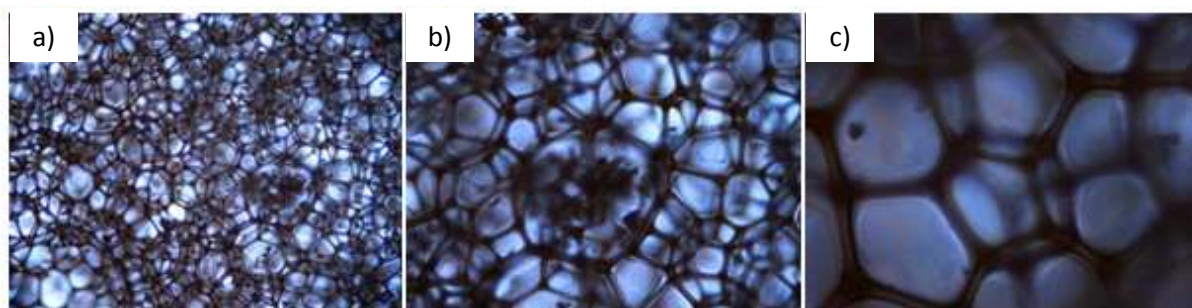


Figura 5.3. Microscopia óptica da espuma Alcell para as ampliações, (a) 20x, (b) 40x e (c) 100x.

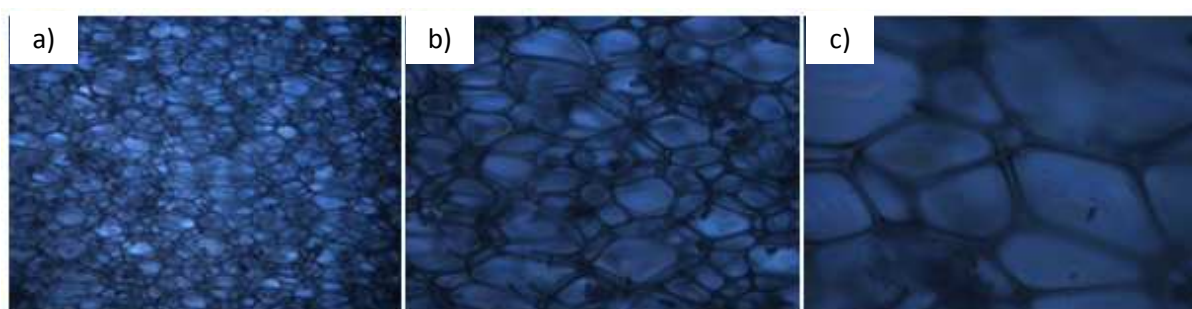


Figura 5.4. Microscopia óptica da espuma comercial para as ampliações, (a) 20x, (b) 40x e (c) 100x.

5.3. Testes de biodegradação em placas

Estes testes são realizados como uma análise preliminar para verificar a adequação do microrganismo escolhido. Se este indicar crescimento do microrganismo, então procede-se à realização dos testes de respirometria.

5.3.1. Procedimento experimental

- **Meio utilizado:** Agar nutritivo
- **Microrganismo:** *Aspergillus niger*

Preparação do inóculo: Num tubo de ensaio com caldo nutritivo estéril, colocou-se uma pastilha de fungo *Aspergillus niger* (ATCC 16404), seguidamente, introduziu-se numa estufa a 30°C durante algumas semanas, para promover o seu crescimento. Com o inóculo em meio líquido assim obtido, procedeu-se à inoculação de vários tubos de ensaio com agar nutritivo em rampa, os quais foram a incubar a 30°C durante duas semanas. A estes últimos adicionou-se água destilada estéril e procedeu-se à raspagem do micélio com uma ansa estéril de forma a preparar uma suspensão de esporos, a qual foi utilizada na inoculação das placas de petri. Como o principal objectivo dos testes de placas consiste em verificar se as espumas suportam o crescimento do microrganismo não foi necessário efectuar a contagem do número de microrganismos.

Preparação das placas: Em placas previamente esterilizadas colocou-se 35ml de meio agar nutritivo e com a ajuda de uma zaragatoa efectuou-se o espalhamento do inóculo (suspensão de esporos). Seguidamente, utilizando condições de assepsia, colocou-se a amostra de poliuretano em cima do meio de agar nutritivo no centro da placa. Com a ajuda uma micropipeta verteram-se 100µl de inóculo por cima da amostra e as placas foram incubadas numa estufa a 30°C durante 28 dias. Os testes em placa foram feitos em duplicado.

Monitorização: Realizada por inspecção visual com periodicidade semanal. Adicionalmente, as amostras finais (28 dias) foram observadas por microscopia óptica. Para tal, numa câmara de fluxo laminar, as amostras foram retiradas das placas de petri e mergulhadas em álcool. Seguidamente, foram lavadas várias vezes com água destilada e secas durante 48 horas à temperatura ambiente.

5.3.2. Análise e discussão de resultados

Na Figura 5.5 (a análise do duplicado está documentada no Anexo C) mostram-se os resultados da análise visual ao fim dos 28 dias. Como se verifica pela observação das placas de petri, o microrganismo consegue crescer na presença das várias espumas. Este indício é positivo mas deve ser analisado com alguma reserva pois o crescimento pode ocorrer, por exemplo, em contaminantes ou em fracções de oligómero ainda presentes nas espumas (Bastioli, 2005). Para conferir a ocorrência de biodegradação é necessária uma análise mais detalhada das espumas pelo que se procedeu à sua observação por microscopia óptica.

Nas observações visuais directas verifica-se que ao longo dos 28 dias o microrganismo cresceu na presença das várias amostras, constatando-se ainda a existência de contacto do micélio fúngico com as amostras. Como referido anteriormente, este fungo, como o seu nome indica, é um fungo filamentoso que apresenta caracteristicamente uma coloração negra conferida pelos esporos. Visualmente verifica-se a existência de pontos negros no interior das espumas de poliuretano, o que indica a existência de esporos e indicia o crescimento do fungo no interior das espumas. Para confirmar a ocorrência deste crescimento, as amostras foram posteriormente analisadas ao microscópio óptico em diferentes ampliações.

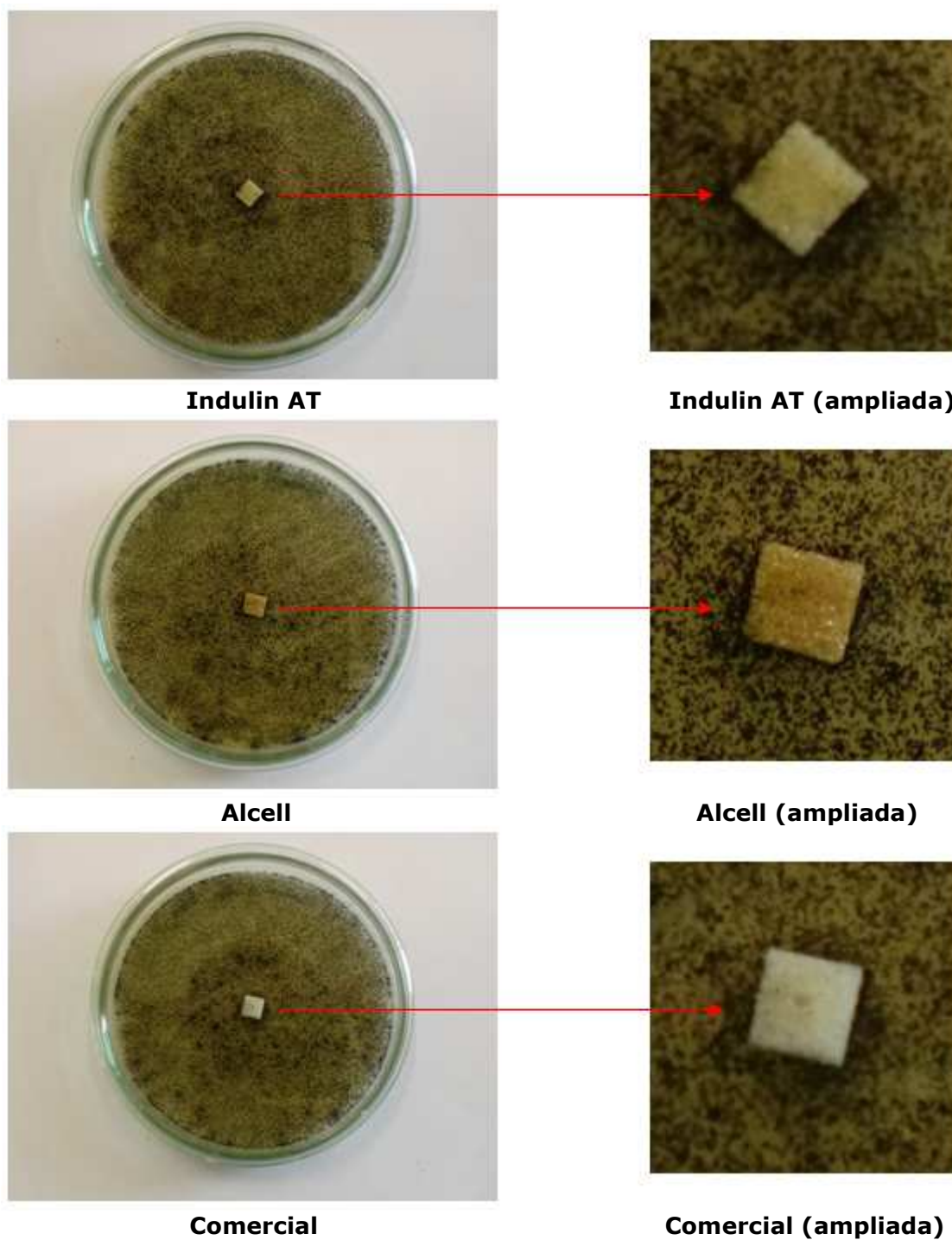
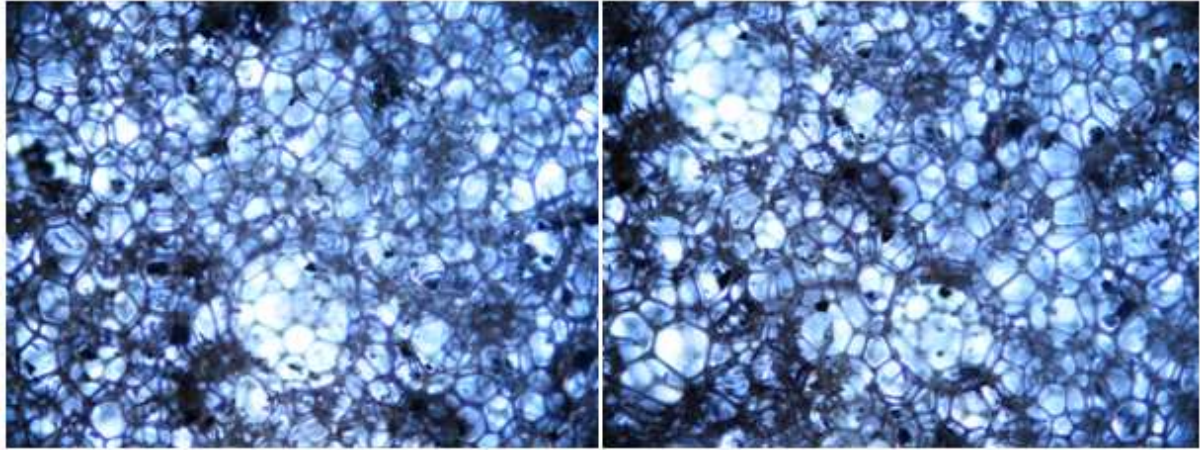


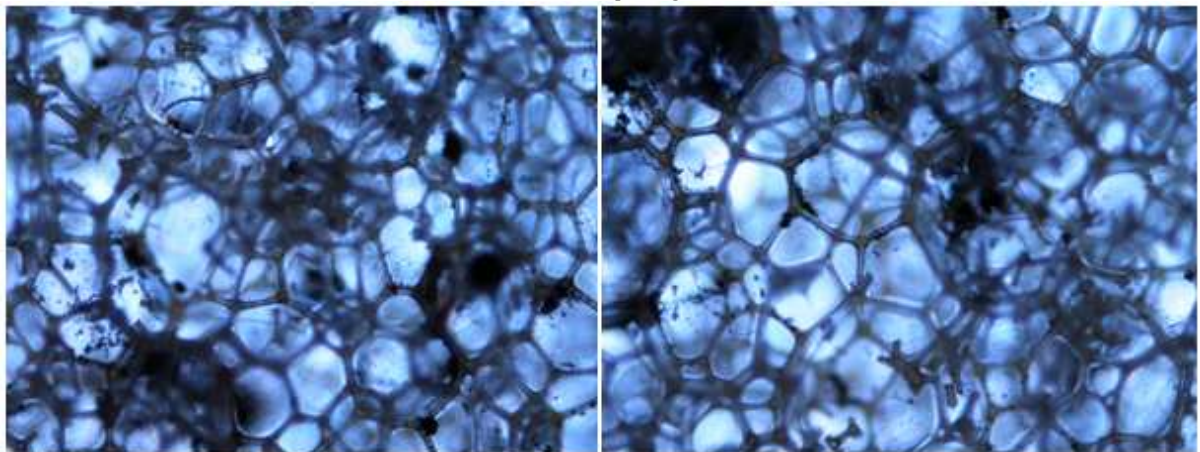
Figura 5.5. Testes de biodegradação em placas com *Aspergillus niger* para as espumas Indulin AT, Alcell e comercial, ao fim de 28 dias.

Por microscopia óptica o crescimento do microrganismo nas amostras de poliuretano é evidente, particularmente nas ampliações de 40x e 100x onde é possível observar o microrganismo e as suas hifas nas paredes das células das espumas, bem como a presença de inúmeros esporos (Figuras 5.6 a 5.8, a presença de esporos e hifas

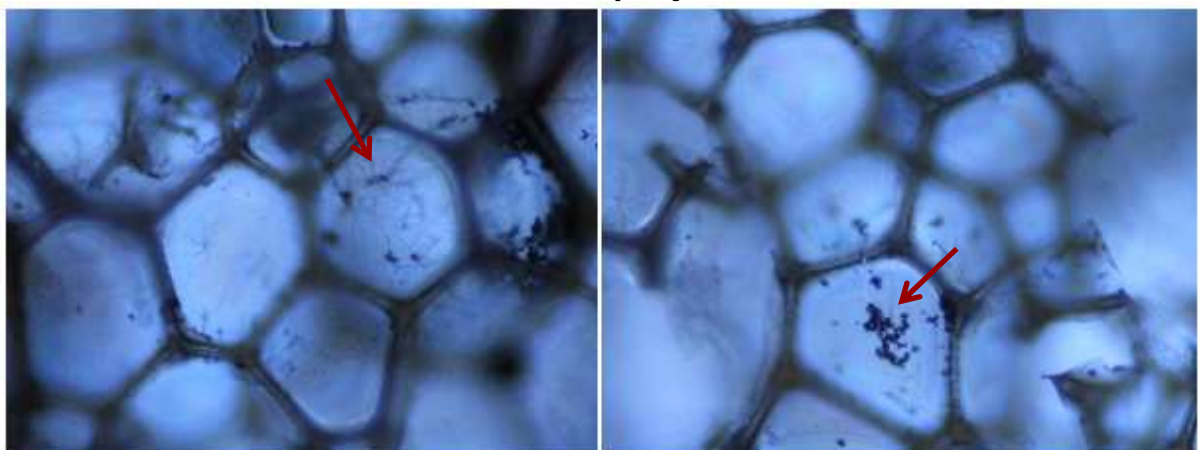
encontra-se salientada através de setas presentes nas figuras; a análise do duplicado está documentado no Anexo C). Pode-se visualizar nas diversas ampliações que as células das espumas, no que respeita a sua integridade estrutural, estão comprometidas pois apresentam fissuras, rachas e colapso da sua estrutura.



Indulin AT ampliação 20x

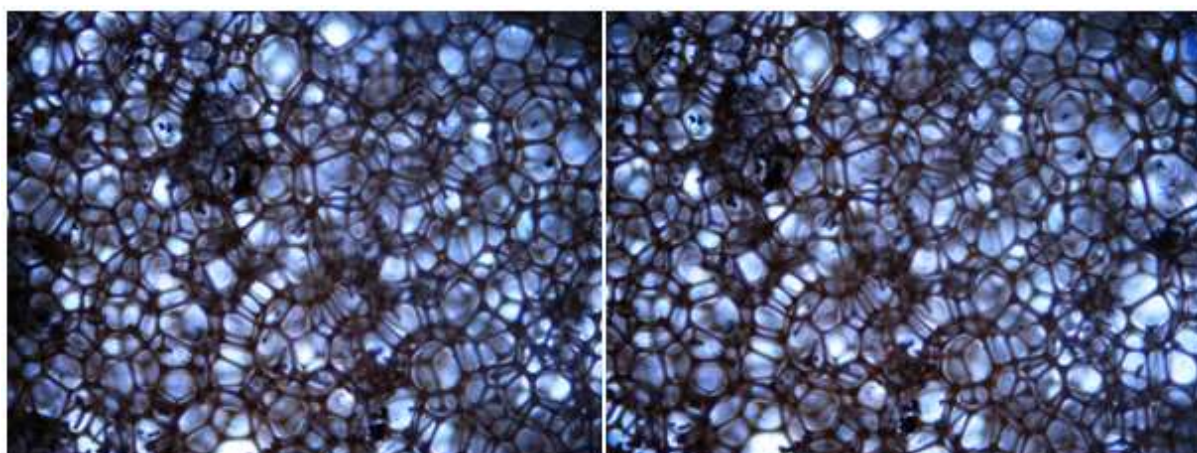


Indulin AT ampliação 40x

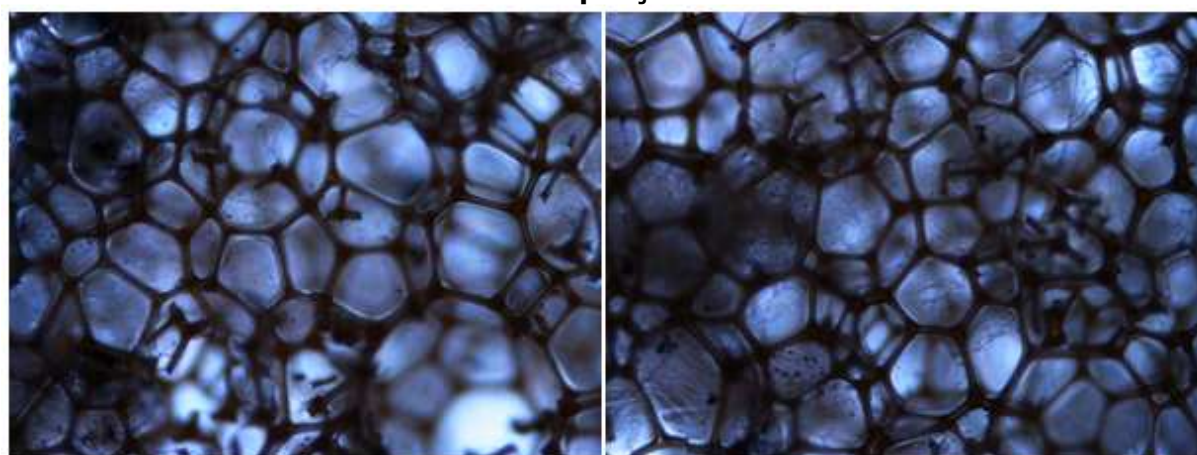


Indulin AT ampliação 100x

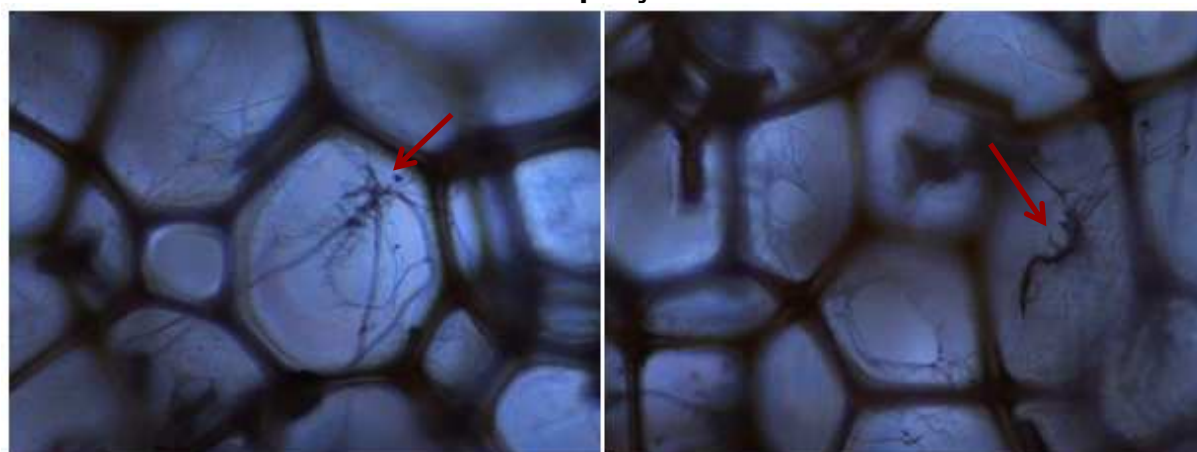
Figura 5.6. Análise da biodegradação em placa da espuma Indulin AT por microscopia óptica. Para cada ampliação as figuras mostram duas zonas distintas da espuma.



Alcell ampliação 20x

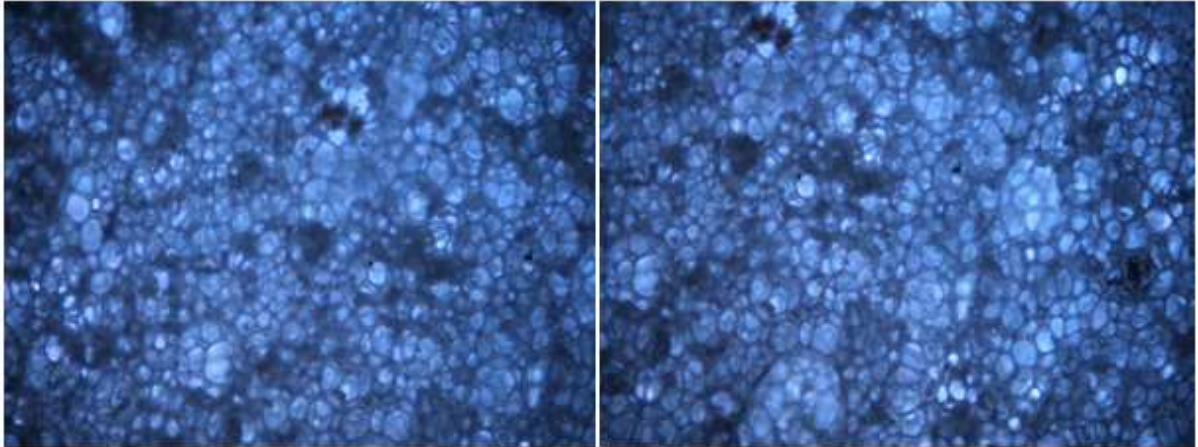


Alcell ampliação 40x

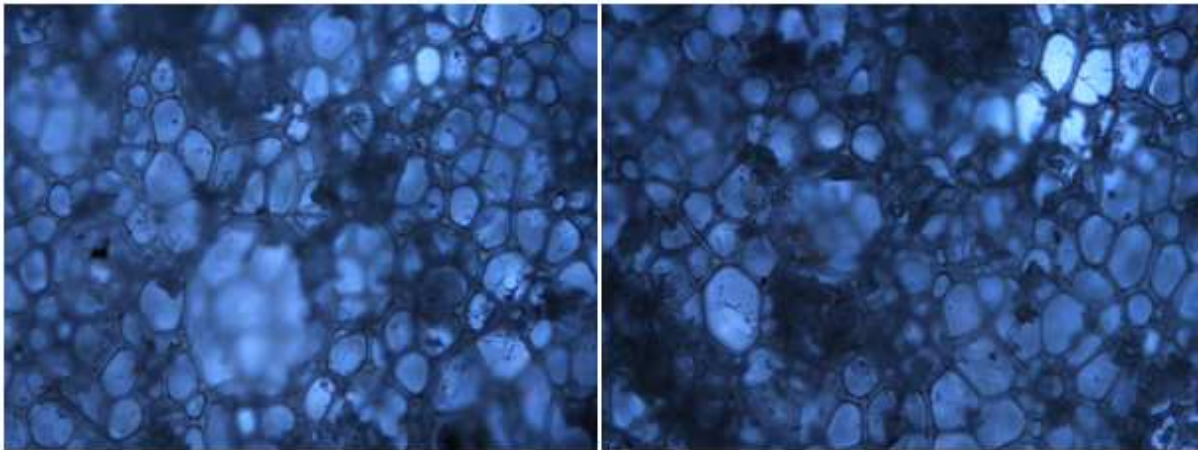


Alcell ampliação 100x

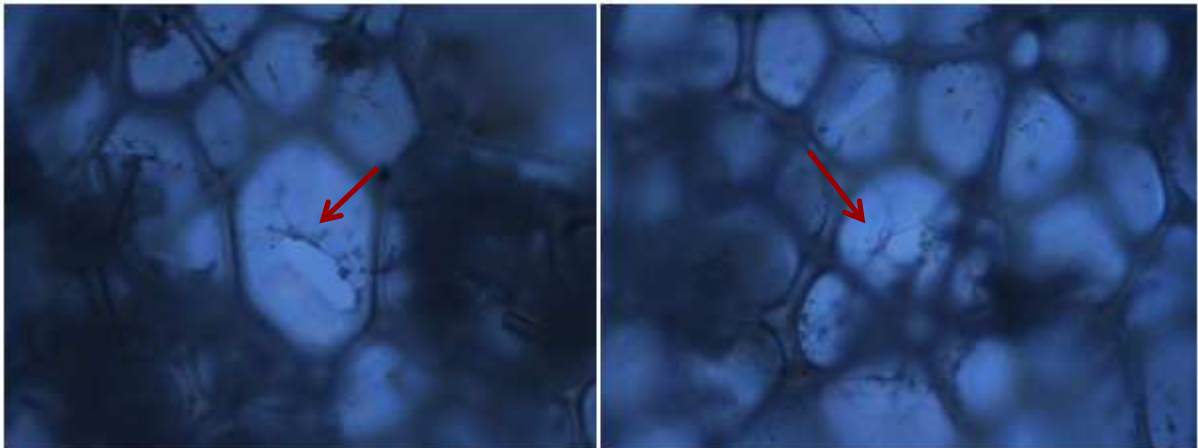
Figura 5.7. Análise da biodegradação em placa da espuma Alcell por microscopia óptica. Para cada ampliação as figuras mostram duas zonas distintas da espuma.



Comercial ampliação 20x



Comercial ampliação 40x



Comercial ampliação 100x

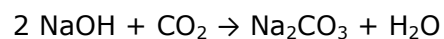
Figura 5.8. Análise da biodegradação em placa da espuma comercial por microscopia óptica. Para cada ampliação as figuras mostram duas zonas distintas da espuma.

Uma vez que os resultados obtidos com este teste preliminar foram positivos e se verificou o crescimento do fungo nas amostras de espumas, o que pode potencialmente indiciar a existência de mecanismos de biodegradação, procedeu-se à realização de testes de respirometria.

5.4. Testes de respirometria

Todos os testes de respirometria realizados neste trabalho foram efectuados em condições aeróbias. Nestas condições os microrganismos usam o oxigénio para oxidar o carbono formando-se dióxido de carbono como um dos principais produtos metabólicos. Desta forma, a determinação do CO₂ formado é um bom indicador para avaliar a degradação dos polímeros (Shah et al., 2008).

Neste trabalho foram realizados testes de respirometria em meio líquido (caldo nutritivo) e meio sólido (solo) avaliando-se a taxa de biodegradação em função do CO₂ produzido. O esquema de montagem utilizado consistiu num frasco contendo o meio (líquido ou sólido) e a amostra a degradar (espuma). No caso do sistema contendo meio líquido, procedeu-se à adição de um microrganismo ao meio e no caso do meio sólido, procedeu-se à realização do ensaio com e sem adição do microrganismo. O frasco que contém o meio é ligado através de um tubo flexível a outro frasco contendo uma solução de NaOH de título conhecido. O CO₂ produzido na biodegradação é transferido para a solução de NaOH ocorrendo a seguinte reacção de carbonatação:



A quantidade de CO₂ produzida é determinada por aferição do título da solução de NaOH com uma solução de HCl de título conhecido (padronizada com bórax). Pela estequiometria da reacção determina-se a quantidade de CO₂ necessária para alterar o título da solução. Esta determinação foi realizada periodicamente, inicialmente três vezes por semana, tendo sido esta amostragem reduzida primeiro para duas vezes por semana e no final para apenas uma vez por semana. A solução de NaOH é substituída por uma solução nova após cada determinação. Estes dados servem para representar graficamente o perfil de libertação de CO₂ em função do tempo de ensaio.

Os testes de respirometria em meio líquido foram baseados na Norma ISO 14852:1999 - Determinação da biodegradação aeróbia definitiva de materiais plásticos em meio aquoso – método da análise do dióxido de carbono gerado.

Os testes de respirometria em meio sólido foram baseados na Norma ISO 17556:2003 - Plásticos – determinação da biodegradação aeróbia final em solo, medindo a carência de oxigénio num respirómetro ou a quantidade de dióxido de carbono gerado.

Preparação do inóculo: O procedimento adoptado foi idêntico ao descrito no ponto 5.3.1. Contudo, neste caso recolheu-se o inóculo e procedeu-se à contagem do número de esporos em câmara de Neubauer de forma a avaliar a necessidade de diluição para preparar uma solução final com $\pm 1 \times 10^6$ esporos. O procedimento adoptado para a contagem está descrito no Anexo D.

Os esporos do fungo *Aspergillus niger* recolhidos nesta etapa foram utilizados em todos os testes de respirometria, para que o número de esporos adicionado fosse idêntico nas diferentes experiências.

5.4.1. Testes de respirometria em meio líquido

5.4.1.1. Procedimento experimental

- **Meio utilizado:** Caldo nutritivo (13 g/l) e caldo nutritivo com diluição 1:1000
- **Microrganismo:** *Aspergillus niger*

Preparação dos frascos: Em frascos previamente esterilizados colocou-se 50ml de caldo nutritivo. Introduziu-se 1ml de inóculo contendo $\pm 1 \times 10^6$ esporos de *Aspergillus niger*, determinou-se a massa das amostras (espumas e controlo positivo) e introduziram-se nos frascos. Os frascos foram selados e ligados através de um tubo flexível a um frasco contendo uma solução de NaOH. Prepararam-se frascos com as espumas Indulin AT, Alcell, comercial, amostra de celulose (controlo positivo) e sem amostra (controlo negativo). Colocaram-se os frascos a incubar na estufa a 30°C e procedeu-se periodicamente à quantificação do CO₂. Os testes de respirometria em meio líquido foram feitos em duplicado. A Figura 5.9 mostra as montagens efectuadas.

Efectuaram-se ainda testes de respirometria em meio líquido com o caldo nutritivo original diluído na proporção de 1:1000 e sem controlo negativo.



Figura 5.9. Montagem dos testes de biodegradação em meio líquido.

Monitorização: Foi realizada determinando o CO_2 produzido durante 90 dias para os testes em meio líquido e 47 dias para os testes em meio líquido com diluição 1:1000. Durante os primeiros 60 dias os testes foram efectuados em duplicado e nos últimos 30 dias, para cada experiência, interrompeu-se um dos testes para analisar a amostra por microscopia óptica, com o objectivo de avaliar a existência de biodegradação. Para a recolha das espumas foi utilizado o procedimento descrito no ponto 5.3.1. A análise foi realizada periodicamente conforme descrito nos documentos de registo mostrados no Anexo H.

5.4.1.2. Análise e discussão de resultados

A Figura 5.10 mostra a evolução do CO_2 acumulado em função do tempo para as amostras em estudo. Verifica-se que a produção de CO_2 foi mais acentuada para a espuma Indulin AT, o que indicia uma maior taxa de biodegradação para esta amostra. Seguiram-se por ordem decrescente de taxa de biodegradação as amostras Alcell e comercial.

Apesar de na literatura serem comuns as referências da biodegradação da celulose por parte do fungo *Aspergillus niger*, pelo que esta é adoptada normalmente como controlo

positivo, isso não se verificou nos ensaios de respirometria em meio líquido realizados neste trabalho. Uma das possíveis causas pode ter sido o contacto pouco eficiente da celulose com o fungo. Mais concretamente, a celulose depositou-se no fundo do frasco onde a concentração de oxigénio é menor. Visualmente, pode constatar-se que o crescimento do fungo ocorre sobretudo à superfície do meio líquido, pelo que este facto pode justificar a ocorrência de uma menor degradação da celulose do que o esperado.

Da análise da Figura 5.10 pode também verificar-se que os perfis de CO₂ não atingem um patamar de estabilização querendo isto dizer que o material pode sofrer biodegradação além do tempo de teste utilizado neste trabalho. Por outro lado, verifica-se que o comportamento observado nas diferentes experiências é muito similar durante, aproximadamente, os primeiros 20 dias de teste, verificando-se um acentuar de diferenças entre as amostras no período final de recolha de dados. Por exemplo, as amostras Alcell e comercial mantêm um perfil idêntico durante aproximadamente 50 dias de teste, verificando-se um acentuar de diferenças após os 70 dias de teste. Tal pode dever-se ao facto de o meio de teste ser muito rico em nutrientes. Um ponto crucial na aplicação de testes em meio líquido é a inclusão, ou não, de fontes adicionais de carbono e azoto. Se por um lado a realização de testes utilizando um meio mineral mínimo na presença de amostra como a única fonte de carbono e azoto permite inferir directamente a existência ou não de biodegradação através da observação de crescimento do microrganismo, o microrganismo poderá não se adaptar e não ocorrer crescimento. Tipicamente, e de uma forma geral, a curva de crescimento de um microrganismo apresenta 4 fases características, fase "lag", "log", "estacionária" e de "morte celular". A primeira fase, fase lag ou de latência e adaptação, consiste num período inicial de adaptação em que o crescimento em termos do número de células do microrganismo é muito baixo ou mesmo nulo, ocorrendo sobretudo a síntese de enzimas e outros componentes importantes para a multiplicação celular que ocorre sobretudo na fase seguinte (fase log ou de crescimento exponencial). No caso de o meio ser pobre em nutrientes, como o caso do meio mínimo apenas adicionado de amostra, o microrganismo pode não se adaptar não ocorrendo o seu crescimento. Por este motivo alguns autores aconselham a adição de uma fonte de carbono e azoto adicional que permita ao microrganismo adaptar-se e posteriormente ocorrer o seu crescimento. Este ponto crucial é reportado no trabalho de Grazali et al. (2005) no qual os autores avaliaram a capacidade de biodegradação de espumas flexíveis de poliuretano (comercial e à base de óleo de palma) pelo fungo *Aspergillus niger*. Os autores observaram crescimento do fungo em ambas as espumas quando utilizaram um meio mineral mínimo adicionado de peptona e extracto de malte, não ocorrendo crescimento algum quando o fungo foi inoculado em placas contendo apenas o mesmo meio mineral mínimo. Desta forma torna-se evidente a importância da existência de um ponto de equilíbrio entre o

desenvolvimento do microrganismo à custa dos nutrientes do meio e à custa da biodegradação do material de teste. Esta questão foi equacionada no trabalho pelo que se procedeu à realização de um teste com um meio nutritivo mais diluído (1:1000). Os resultados deste teste são mostrados na Figura 5.11.

O principal objectivo da elaboração dos testes de biodegradação em meio líquido com diluição de 1:1000 era criar um meio pobre em nutrientes, permitindo desta forma que a espuma se evidenciasse como fonte de carbono e azoto. Desta forma, o meio apresenta nutrientes suficientes para que os esporos do fungo adicionados possam germinar, permitindo a adaptação e posterior crescimento do fungo. Contudo, como o meio é mais pobre, à medida que ocorre crescimento do microrganismo, mais rapidamente ocorre depleção dos nutrientes adicionados, propiciando-se desta forma a utilização da espuma pelo fungo. Ao longo da duração do teste, e como era de esperar, registou-se um fraco desenvolvimento do microrganismo que levou a uma produção de CO_2 muito inferior aos testes sem diluição. Contudo, como se pode observar pela observação do gráfico da Figura 5.11, as diferenças observadas entre as amostras são agora muito mais evidentes comparativamente ao ensaio anterior (caldo nutritivo sem diluição). Como nos testes sem diluição, a espuma que teve uma maior produção de CO_2 foi a Indulin AT, seguindo-se a Alcell e por fim a comercial. A celulose como controlo positivo teve um consumo de CO_2 ligeiramente superior ao da espuma comercial, contudo inferior ao das espumas Indulin AT e Alcell. Refira-se que nesta experiência, observou-se visualmente o crescimento do fungo junto à amostra de celulose, o que poderá justificar a diferença de comportamento desta amostra face ao ensaio sem diluição do caldo nutritivo.

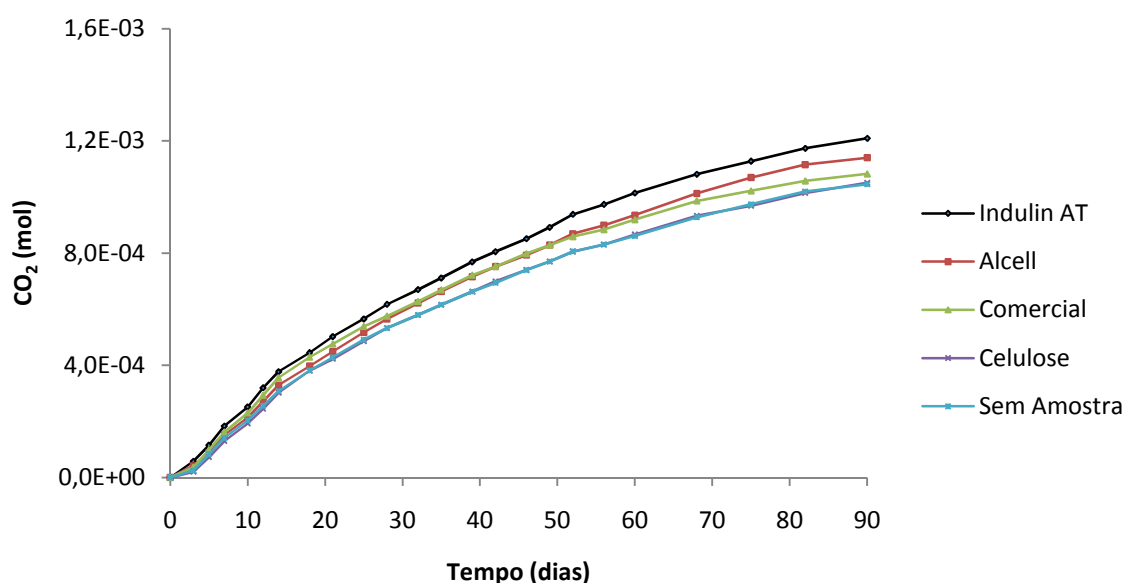


Figura 5.10. Representação gráfica do teste de respirometria em meio líquido.

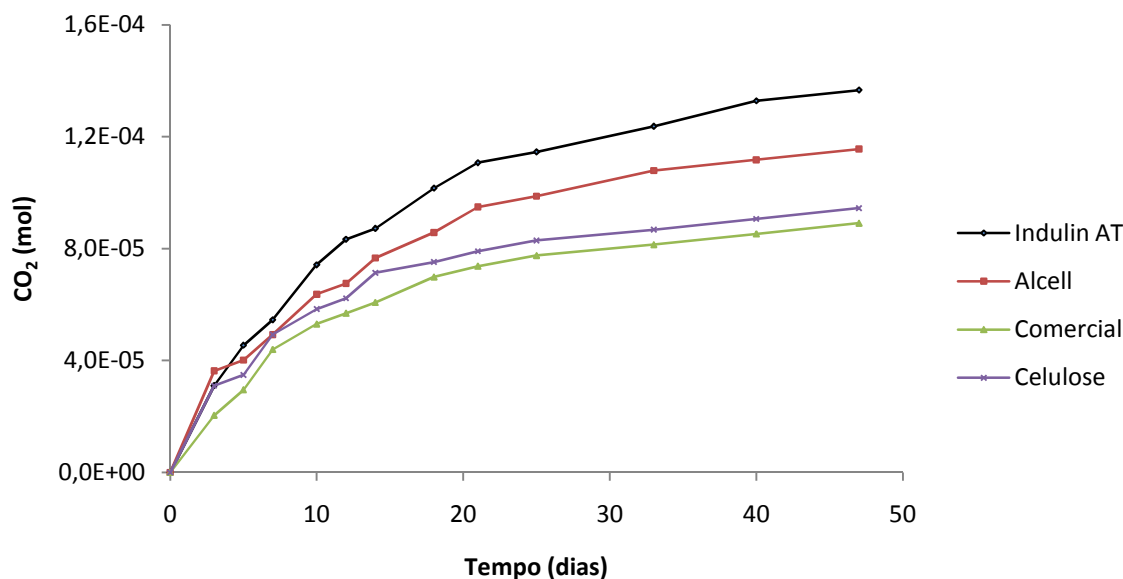
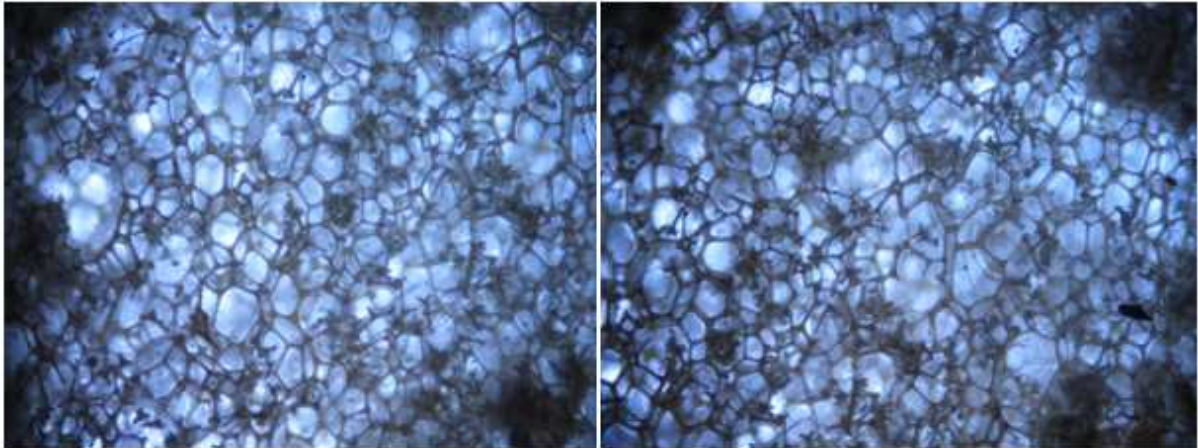
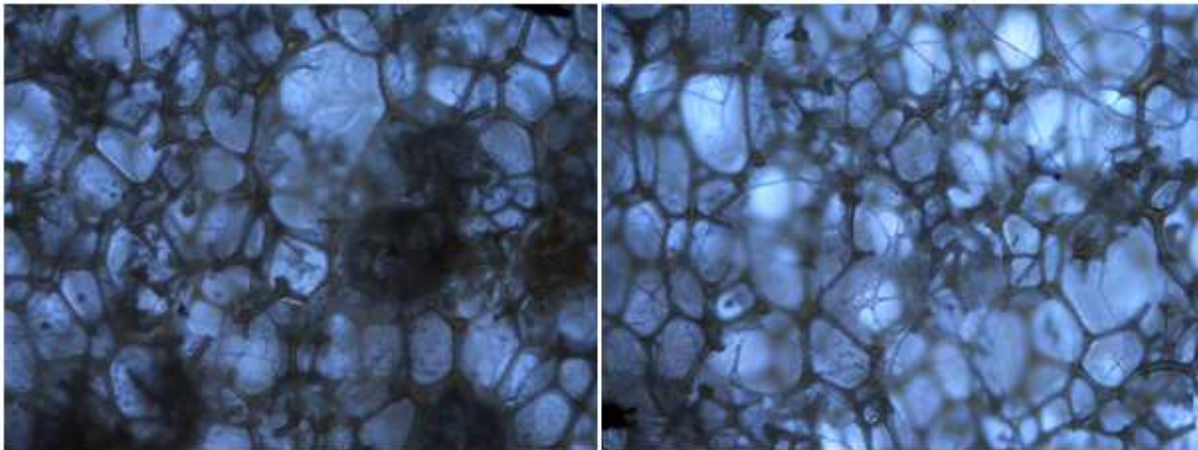


Figura 5.11. Representação gráfica do teste de respirometria em meio líquido com diluição 1:1000.

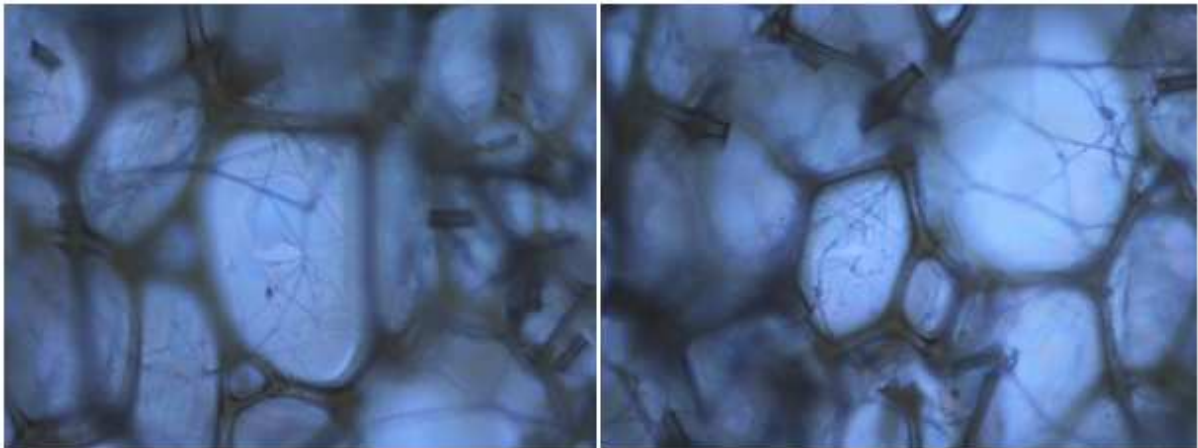
Como referido, ao dia 60 do ensaio em meio líquido um dos duplicados de cada experiência foi retirado e visualizado ao microscópio óptico. Uma vez que o ensaio conduzido em meio líquido diluído 1:1000 se iniciou mais tarde, não tendo atingido os 60 dias, estas amostras não foram observadas ao microscópio. As Figuras 5.12 a 5.14 mostram a análise microscópica das diferentes espumas, para ampliações totais de 20x, 40x e 100x. Refira-se que, devido à espessura das espumas, não se conseguiu focar as amostras com a objectiva de 40x (ampliação total de 400x). De uma maneira geral, para além da presença de hifas, pode-se observar que a estrutura da parede das células, inicialmente com aspecto liso e brilhante, apresenta agora um aspecto algo rugoso tendo-se mesmo dissolvido e rompido em alguns pontos, formando uma espécie de teia em torno das células destruídas, assim como quebras e pequenos buracos em toda a estrutura das espumas. Este efeito parece ser mais pronunciado na espuma Indulin AT, o que está de acordo com os dados obtidos referentes ao consumo de CO_2 . Apesar de se tratar de microscopia óptica utilizando uma baixa ampliação, este efeito parece ser similar ao descrito por Cangemi et al. (2006) ao visualizar amostras de espumas de poliuretano à base de óleo de castor em meio líquido por microscopia electrónica de varrimento.



Indulin AT ampliação 20x

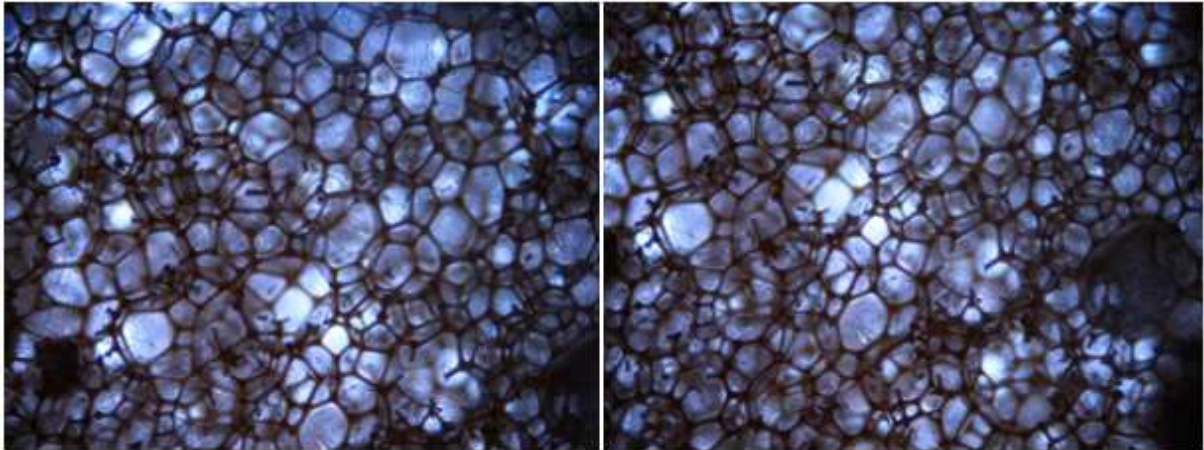


Indulin AT ampliação 40x

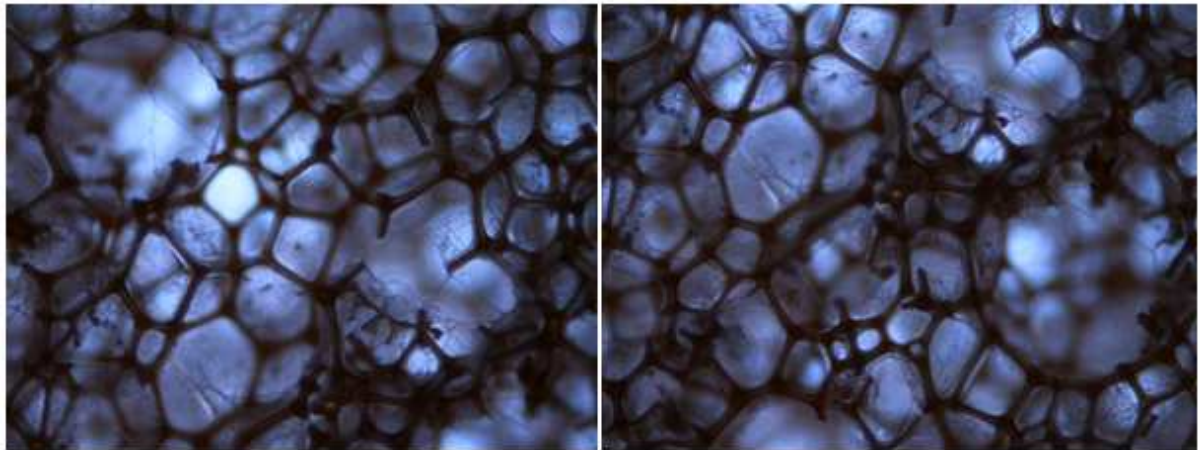


Indulin AT ampliação 100x

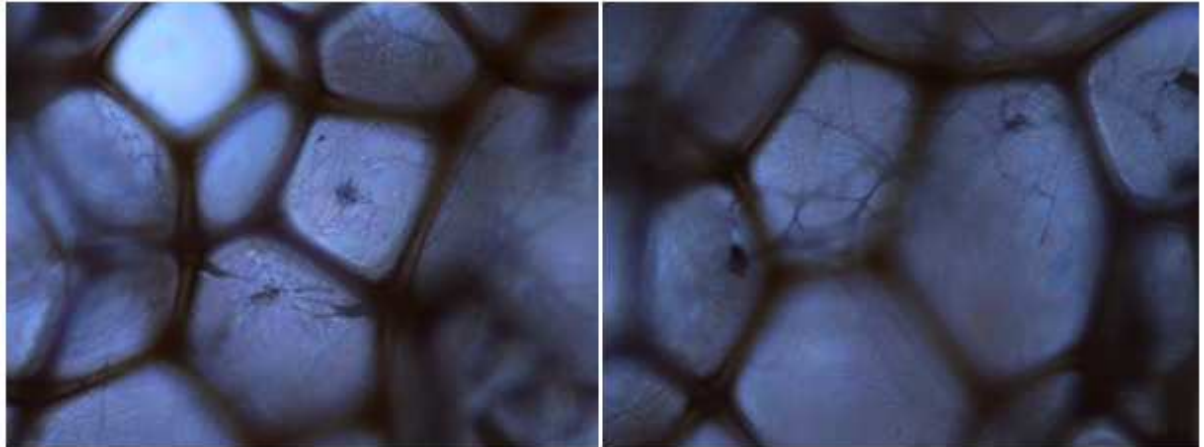
Figura 5.12. Análise da biodegradação em meio líquido da espuma Indulin AT por microscopia óptica. Para cada ampliação as figuras mostram duas zonas distintas da espuma.



Alcell ampliação 20x

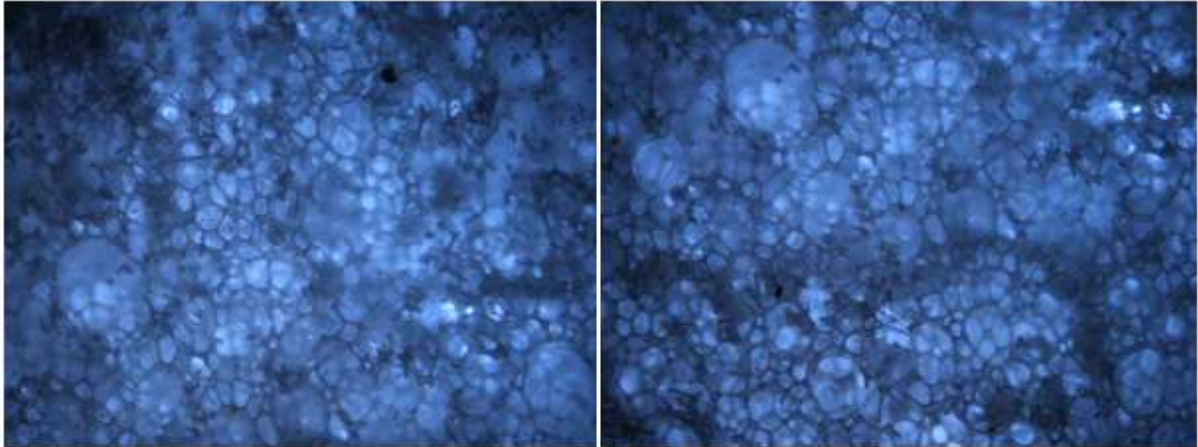


Alcell ampliação 40x

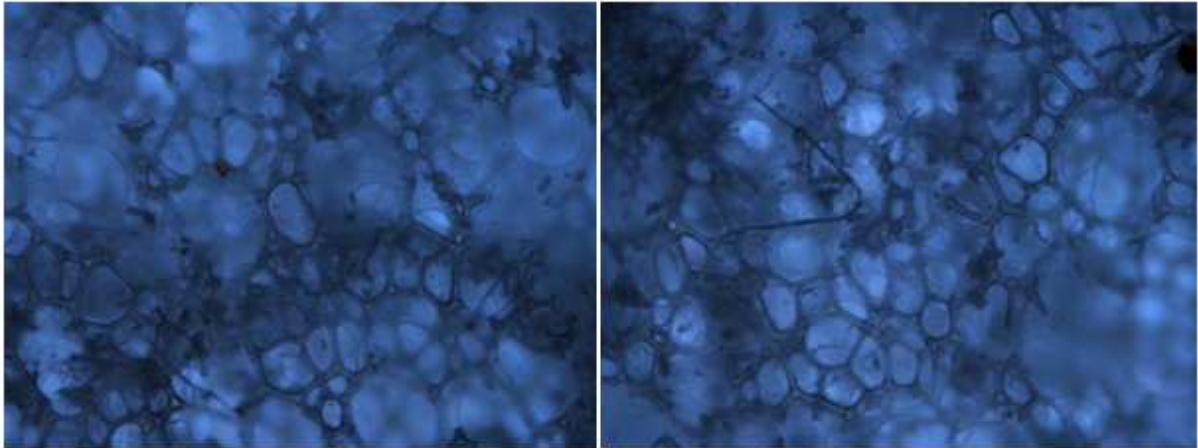


Alcell ampliação 100x

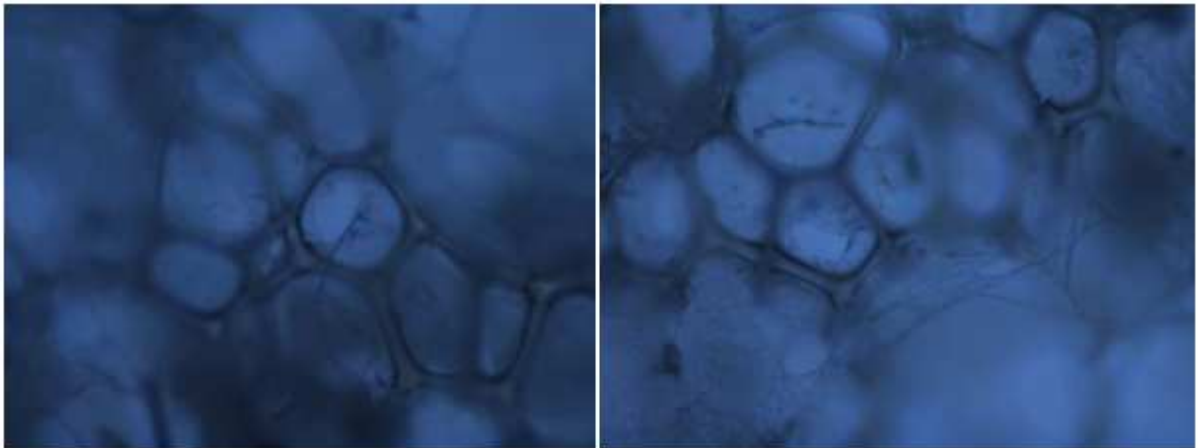
Figura 5.13. Análise da biodegradação em meio líquido da espuma Alcell por microscopia óptica. Para cada ampliação as figuras mostram duas zonas distintas da espuma.



Comercial ampliação 20x



Comercial ampliação 40x



Comercial ampliação 100x

Figura 5.14. Análise da biodegradação em meio líquido da espuma comercial por microscopia óptica. Para cada ampliação as figuras mostram duas zonas distintas da espuma.

5.4.2. Testes de respirometria em meio sólido

5.4.2.1. Procedimento experimental

- **Meio utilizado:** Solo
- **Microrganismo:** Microrganismos naturalmente existentes no solo, com e sem adição de *Aspergillus niger*

Preparação dos frascos: Efectuou-se uma preparação física do solo, que consistiu em retirar o material mais grosseiro (pedras e cascas de madeira). Determinou-se a massa dos frascos, pois podia ser necessário corrigir a humidade ao longo do período total do ensaio. Em frascos previamente esterilizados colocou-se 5g de solo, determinou-se a massa das amostras e introduziram-se nos frascos. Seguidamente, colocou-se mais 5g de solo, com o cuidado de verificar que cobria totalmente a amostra. Adicionou-se água para corrigir a humidade para valores de 60% (Anexo E). Os frascos foram selados e ligados através de um tubo flexível a um frasco contendo uma solução de NaOH de título conhecido. Prepararam-se frascos com as espumas Indulin AT, Alcell, comercial, amostra de celulose (controlo positivo) e sem amostra (controlo negativo). Colocaram-se os frascos na estufa a 30°C e procedeu-se periodicamente à quantificação do CO₂. Os testes de respirometria em meio sólido foram feitos em duplicado. A Figura 5.15 mostra as montagens efectuadas.

Foram também efectuados testes de respirometria em meio sólido com o inóculo. A cada frasco foi adicionado 1ml de inóculo (solução contendo $\pm 1 \times 10^6$ esporos de *Aspergillus niger*).



Figura 5.15. Montagem dos testes de biodegradação em meio sólido sem inóculo.

Nos testes de biodegradação em meio sólido não foi necessário corrigir o pH do solo uma vez que a sua determinação (procedimento descrito no Anexo F) deu o valor de 6.85, o que se encontra dentro dos valores óptimos de crescimento do microrganismo.

Monitorização: Foi realizada determinando o CO₂ produzido durante 90 dias para os testes em meio sólido. Durante os primeiros 60 dias os testes foram efectuados em duplicado e nos últimos 30 dias interrompeu-se um dos testes por amostra para proceder à sua análise por microscopia óptica com o objectivo de avaliar a existência de biodegradação. Para a recolha das espumas foi utilizado o procedimento descrito no ponto 5.3.1. A análise foi realizada periodicamente conforme descrito nos documentos de registo mostrados no Anexo H.

5.4.2.2. Análise e discussão de resultados

A Figura 5.16 mostra a evolução do CO₂ acumulado em função do tempo para as amostras em estudo. Verifica-se que a produção de CO₂ foi mais acentuada para a espuma Indulin AT, o que indicia uma maior taxa de biodegradação para esta amostra. Seguiram-se por ordem decrescente de taxa de biodegradação as amostras Alcell e comercial. Pode-se verificar que os níveis de CO₂ são similares para todas as amostras, começando-se a visualizar algumas diferenças mais evidentes apenas nas últimas semanas de teste. Contudo, durante o período de tempo em que foram conduzidas as experiências, as espumas Indulin AT e Alcell apresentaram níveis de produção de CO₂ muito semelhantes o que poderá indicar que os microrganismos presentes no solo poderão ter apetência idêntica para degradar as duas espumas de base lenhina independentemente das suas características; já a espuma comercial apresentou um comportamento idêntico às restantes amostras nos primeiros 50 dias de ensaio, sendo que posteriormente apresentou claramente uma produção de CO₂ inferior o que poderá estar relacionado com uma capacidade de biodegradação inferior às restantes.

Ainda no mesmo gráfico (Figura 5.16) pode-se constatar que o ensaio em branco, que serviu de controlo negativo, foi o que teve maior produção de CO₂ dos testes realizados. Tal não é coerente e não era esperado que acontecesse, podendo ser explicado pela heterogeneidade do solo, como referido por Bastioli, (2005). Segundo este autor, este é uma das limitações associada à realização deste tipo de ensaios. Apesar de os testes serem feitos tanto quanto possível nas mesmas condições, a distribuição dos diferentes

constituintes do solo, como a matéria orgânica, a concentração de microrganismos ou o material grosseiro (pequenos gravetos, pedras), pode não ser totalmente uniforme, não o que pode conduzir a diferentes libertações de CO₂ pelo próprio solo. Outra explicação diz respeito à determinação do CO₂ produzido, que é feita por aferição do título da solução de NaOH com um padrão primário por meio de uma titulação manual, à qual podem estar associada erros humanos. Como se fazem titulações sucessivas esses erros podem tornar-se em erros sistemáticos e cumulativos.

Tal como nas experiências realizadas em meio líquido, ao final de 60 dias de teste retirou-se uma amostra de cada duplicado, para visualização ao microscópio óptico. Refira-se que, no que respeita à celulose, verificou-se claramente a existência de biodegradação pois não se encontraram vestígios da amostra ao final deste tempo, tendo sido totalmente degradada pelos microrganismos existentes no solo.

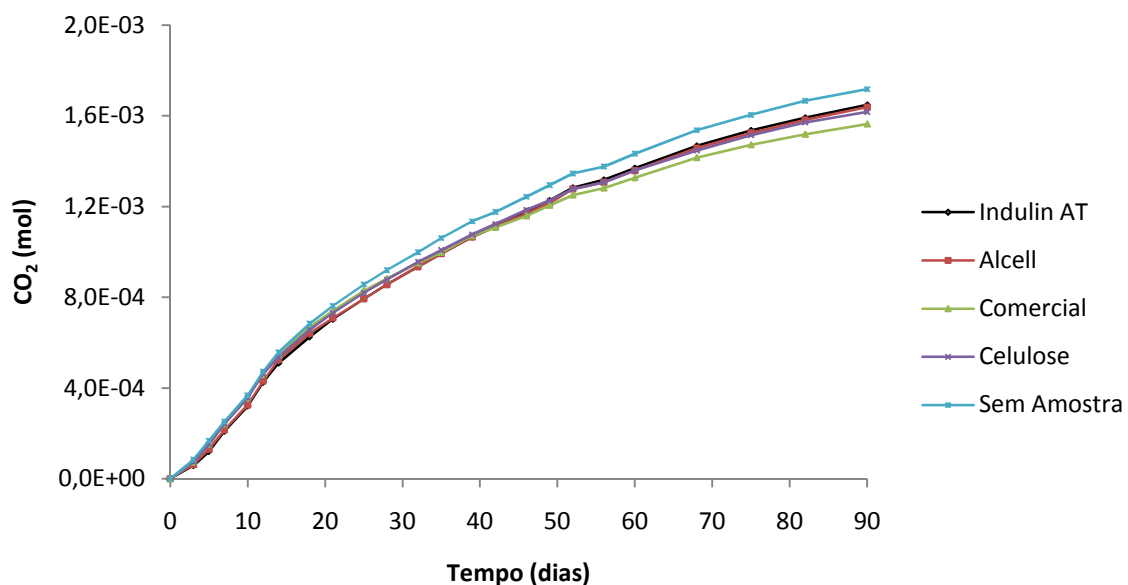
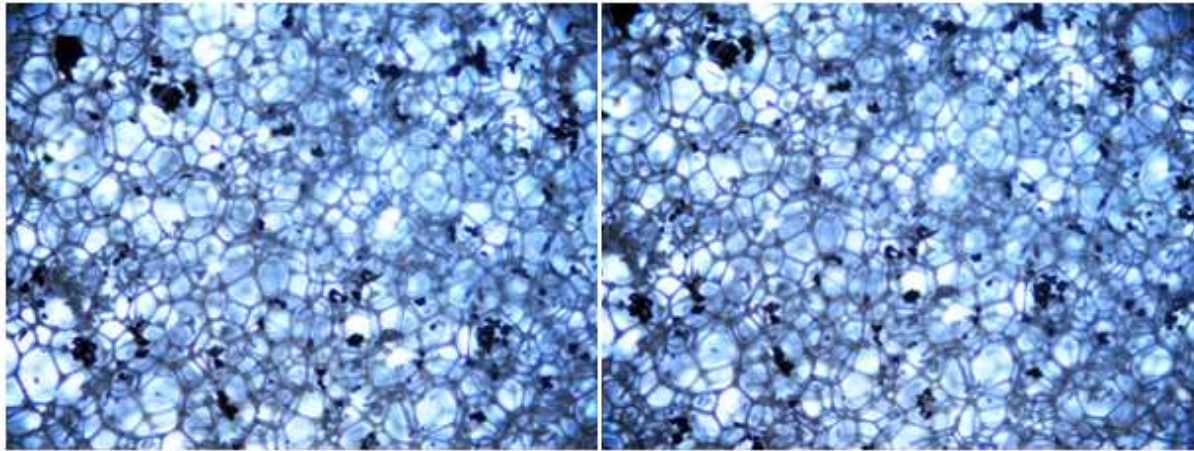


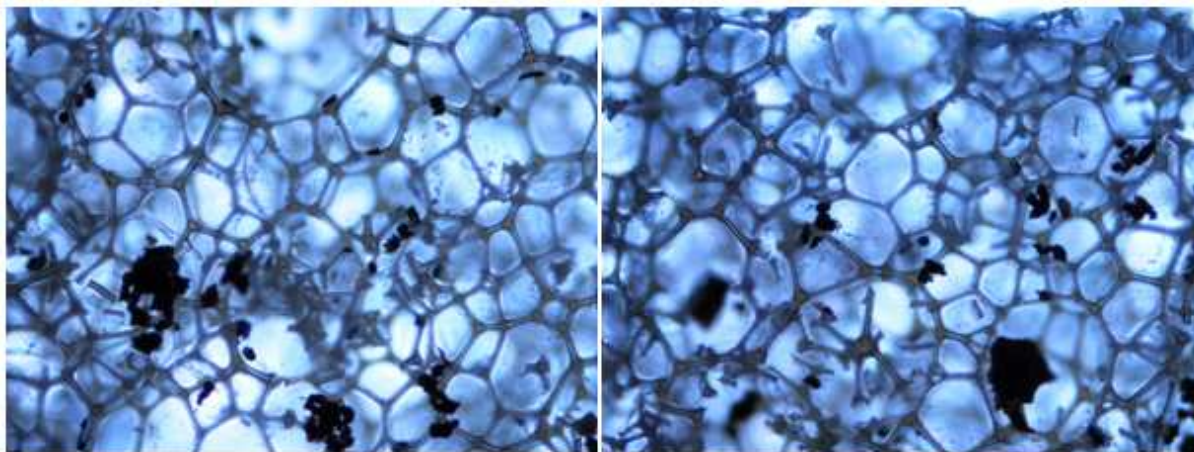
Figura 5.16. Representação gráfica do teste de respirometria em meio sólido sem inóculo.

As Figuras 5.17 a 5.19 mostram a análise microscópica das diferentes espumas, podendo-se constatar que a ocorrência de biodegradação observando-se a alteração do aspecto da parede das células da espuma, bem como falhas na estrutura das células do tipo rachas e buracos. A análise das imagens obtidas para as diferentes espumas parece indicar a existência de um grau de degradação semelhante nas diferentes amostras. Estes danos nas estruturas das células são descritos por Wang et al. (2007) ao visualizar

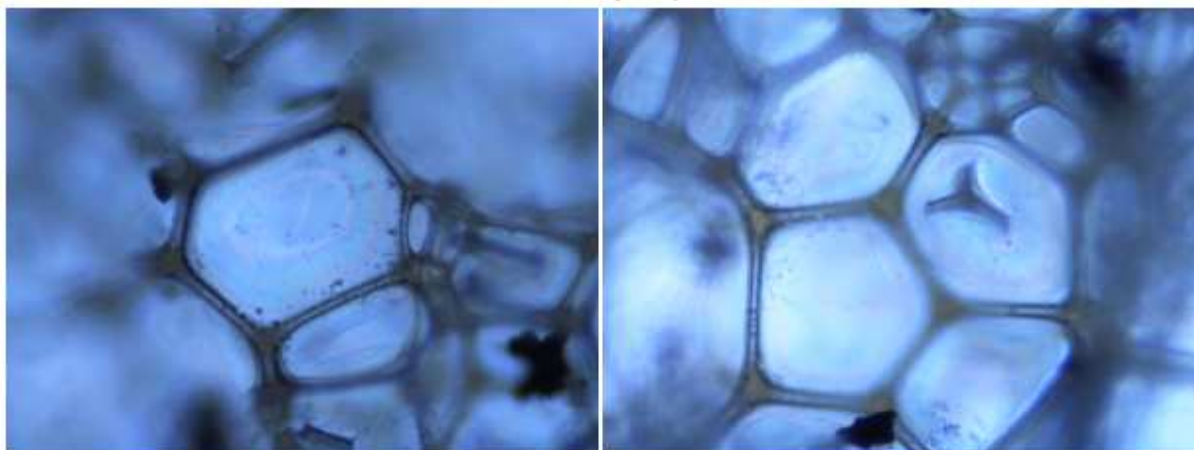
amostras de espumas de poliuretano à base de palha de trigo liquefeita quando enterradas em solo e analisadas por microscopia electrónica de varrimento.



Indulin AT ampliação 20x

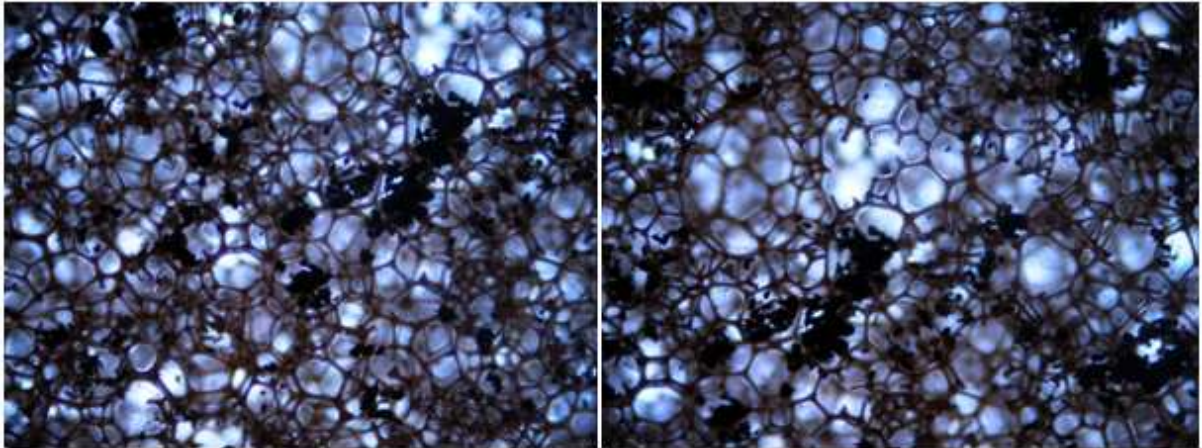


Indulin AT ampliação 40x

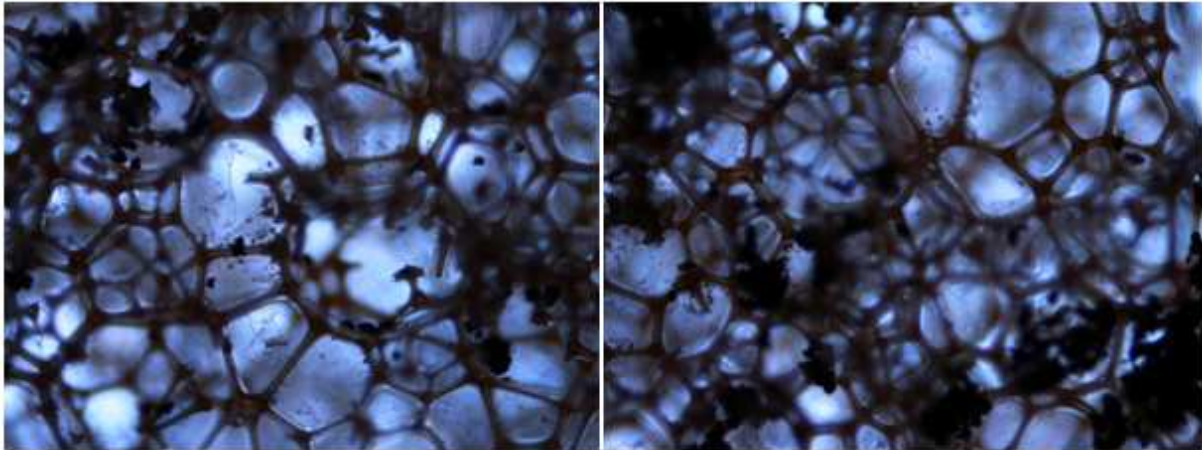


Indulin AT ampliação 100x

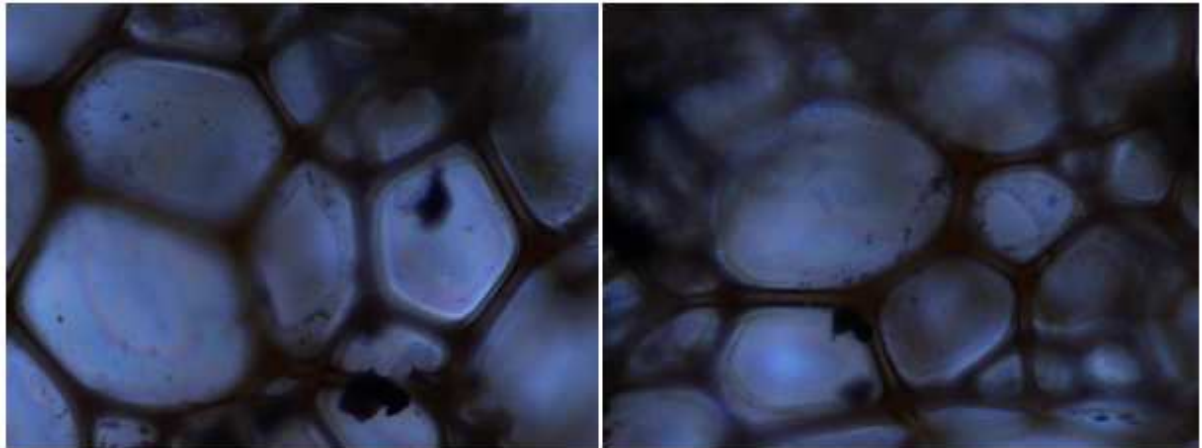
Figura 5.17. Análise da biodegradação em meio sólido sem inóculo da espuma Indulin AT por microscopia óptica. Para cada ampliação as figuras mostram duas zonas distintas da espuma.



Alcell ampliação 20x

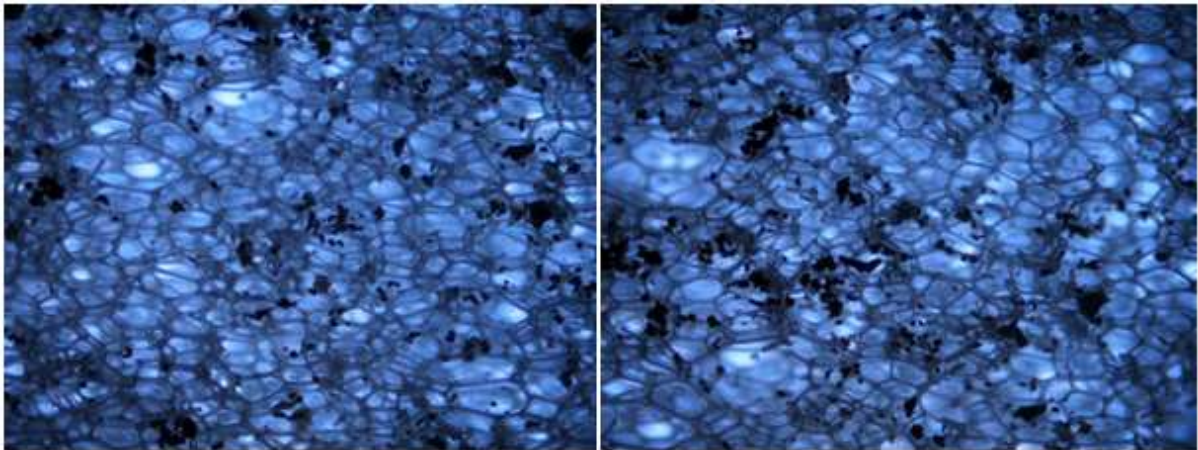


Alcell ampliação 40x

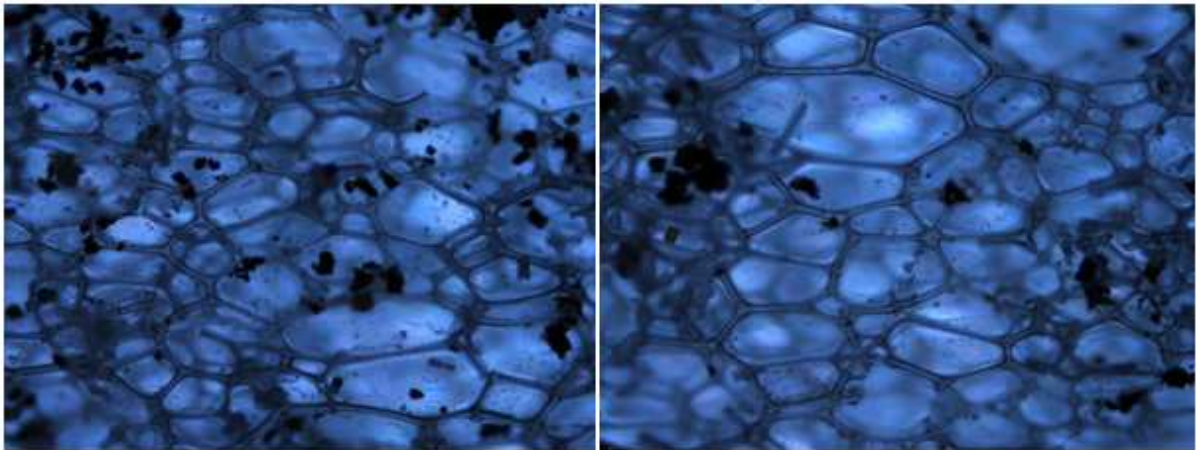


Alcell ampliação 100x

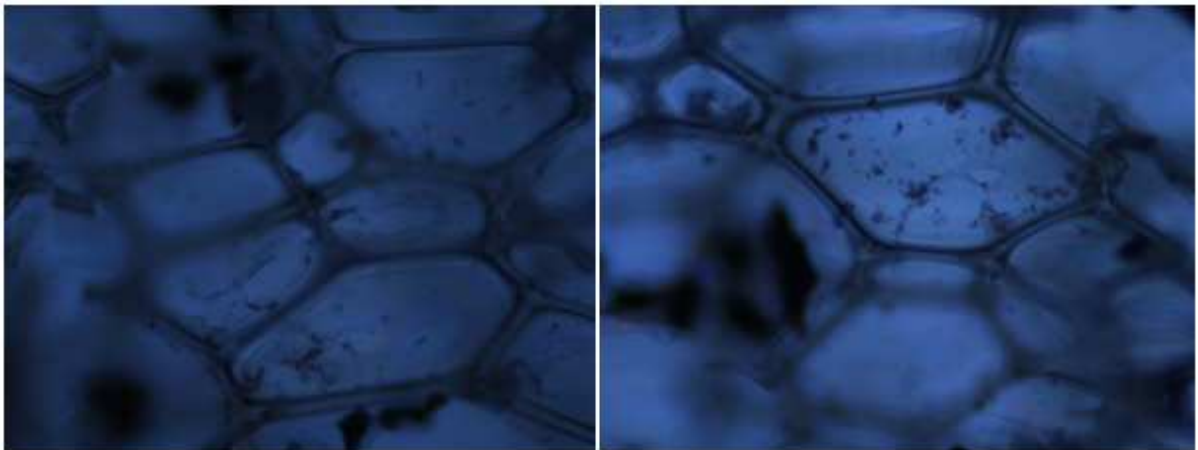
Figura 5.18. Análise da biodegradação em meio sólido sem inóculo da espuma Alcell por microscopia óptica. Para cada ampliação as figuras mostram duas zonas distintas da espuma.



Comercial ampliação 20x



Comercial ampliação 40x



Comercial ampliação 100x

Figura 5.19. Análise da biodegradação em meio sólido sem inóculo da espuma comercial por microscopia óptica. Para cada ampliação as figuras mostram duas zonas distintas da espuma.

Em diversos trabalhos disponíveis na literatura, a perda de massa das amostras é referida como um dos parâmetros utilizados frequentemente para avaliar a biodegradação de amostras diversas. No caso específico dos ensaios em meio sólido, como se pode verificar nas imagens obtidas por microscopia óptica, as amostras de espuma apresentam pequenas partículas de solo no seu interior que não foram passíveis de ser eliminadas pelas lavagens efectuadas. Uma vez que a massa das espumas utilizada foi muito baixa, a presença dessas partículas inviabilizou a determinação da perda de massa das amostras.

A Figura 5.20 mostra a evolução do CO₂ acumulado em função do tempo para as experiências conduzidas em meio sólido adicionado de suspensão de esporos de *Aspergillus niger*. Verifica-se que a produção de CO₂ foi mais acentuada para a espuma Indulin AT, o que indicia uma maior taxa de biodegradação para esta amostra. Seguiram-se por ordem decrescente de taxa de biodegradação as amostras Alcell e comercial. Pela observação do gráfico verifica-se um comportamento idêntico de todas as amostras ao longo das primeiras semanas de teste, ocorrendo alguma diferenciação na produção de CO₂ entre a maioria das amostras e o branco (solo sem amostra) a partir da 3^a semana de testes. A única excepção foi a espuma comercial, o que poderá estar relacionado com a heterogeneidade do solo, como anteriormente explicado. Como seria esperado, com a inclusão do fungo *Aspergillus niger*, comparativamente ao ensaio anterior pode-se observar a que a produção de CO₂ foi superior. Tal denota crescimento do fungo e podendo traduzir-se num potencial contributo na degradação das amostras.

De forma idêntica aos ensaios anteriores, aos 60 dias foram retiradas amostras para observação ao microscópio óptico. Novamente, a degradação da amostra de celulose (controlo positivo) foi total, não se tendo encontrado vestígios desta amostra no final deste período de tempo.

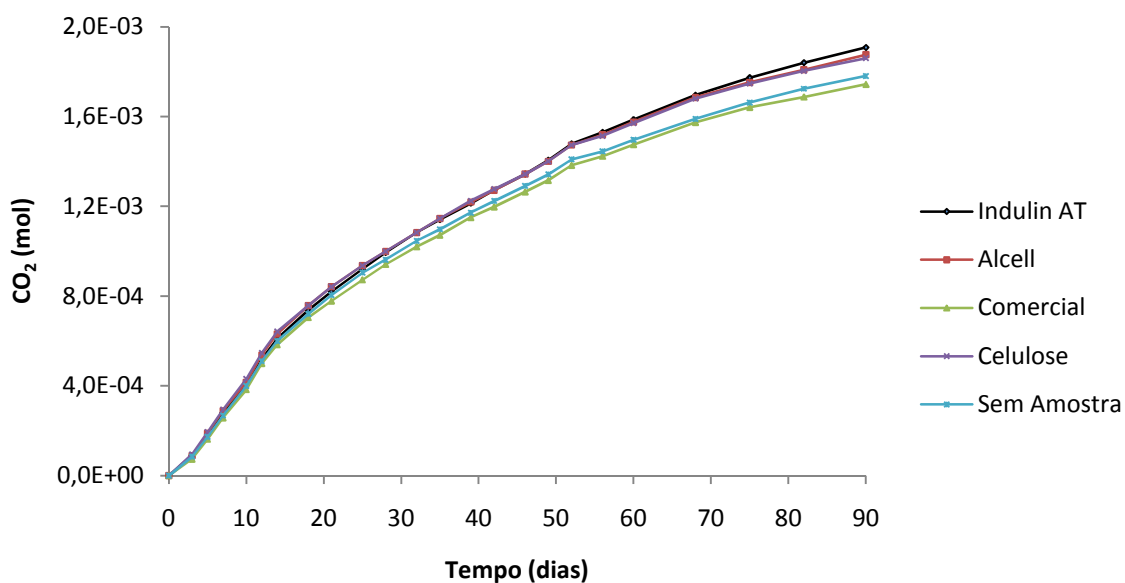
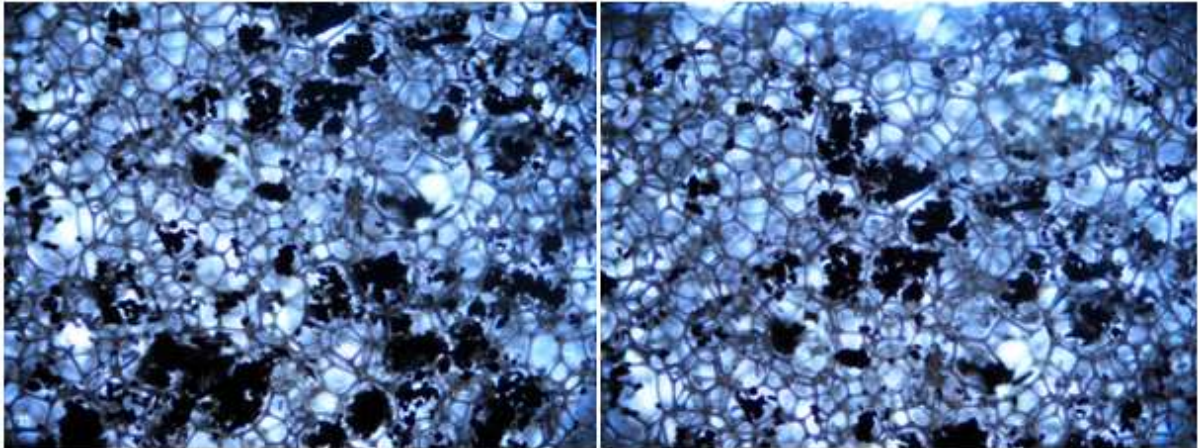
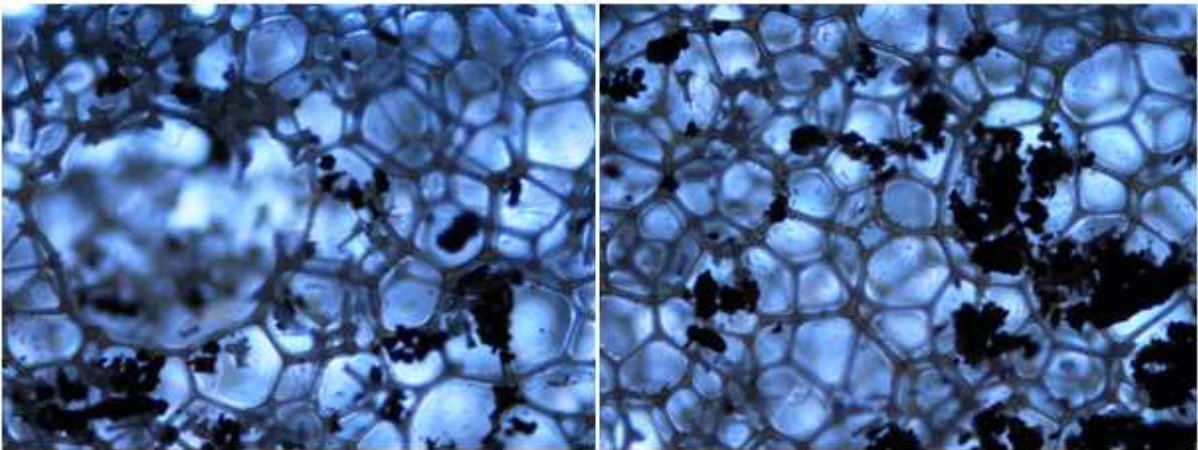


Figura 5.20. Representação gráfica do teste de respirometria em meio sólido com inóculo.

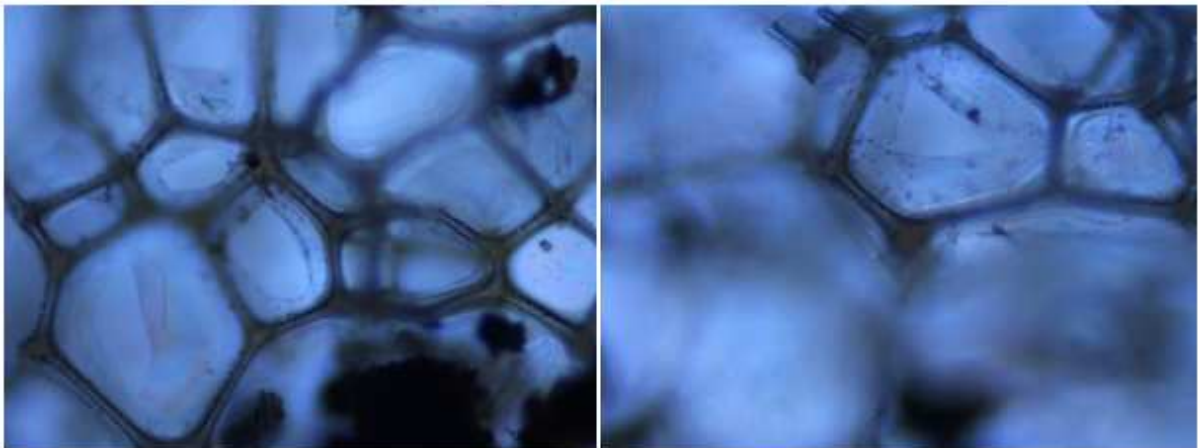
As Figuras 5.21 a 5.23 mostram a análise microscópica das diferentes espumas. Na Figura 5.23 não foi possível a análise na ampliação de 100x pois apesar de múltiplas tentativas não foi possível obter uma correcta focagem da amostra. Pode-se observar a existência de biodegradação das amostras pela visualização de falhas na estrutura das células com a apresentação de rachas e buracos. Comparativamente ao ensaio em solo sem adição de inóculo constata-se uma degradação superior das amostras, o que está de acordo com os resultados obtidos relativos à produção de CO_2 em ambos os casos. Contudo o grau de biodegradação parece ser claramente inferior ao visualizado no ensaio em meio líquido com adição do mesmo inóculo, após igual período de tempo. Nos testes conduzidos em meio sólido não foi perceptível visualmente o crescimento de micélio característico de *Aspergillus niger*, contrariamente ao que aconteceu em meio líquido. Isto pode significar que o crescimento deste fungo pode ter sido reduzido, o que pode estar associado a fenómenos de competição com outros microrganismos naturalmente existentes no solo, o que explicaria a menor degradação nos ensaios em solo.



Indulin AT ampliação 20x

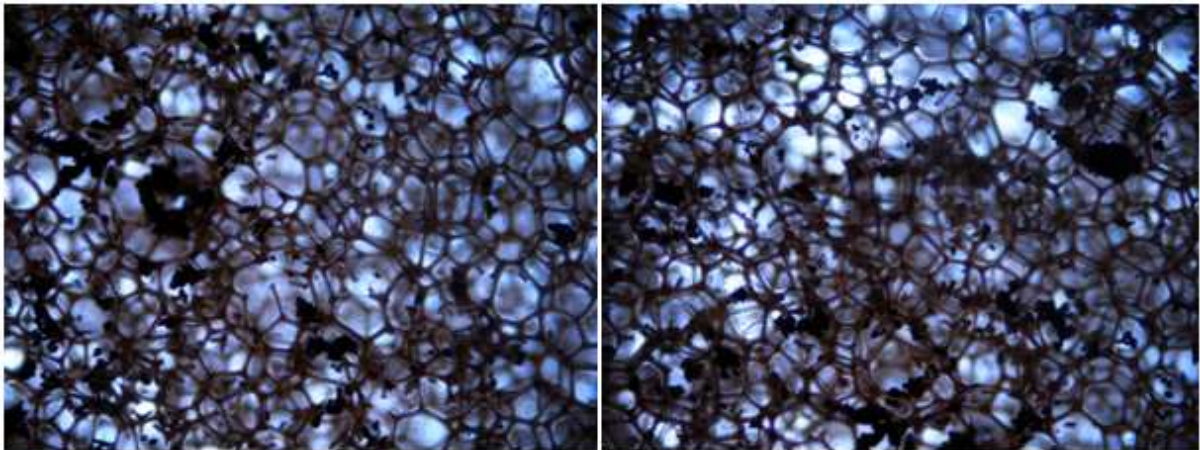


Indulin AT ampliação 40x

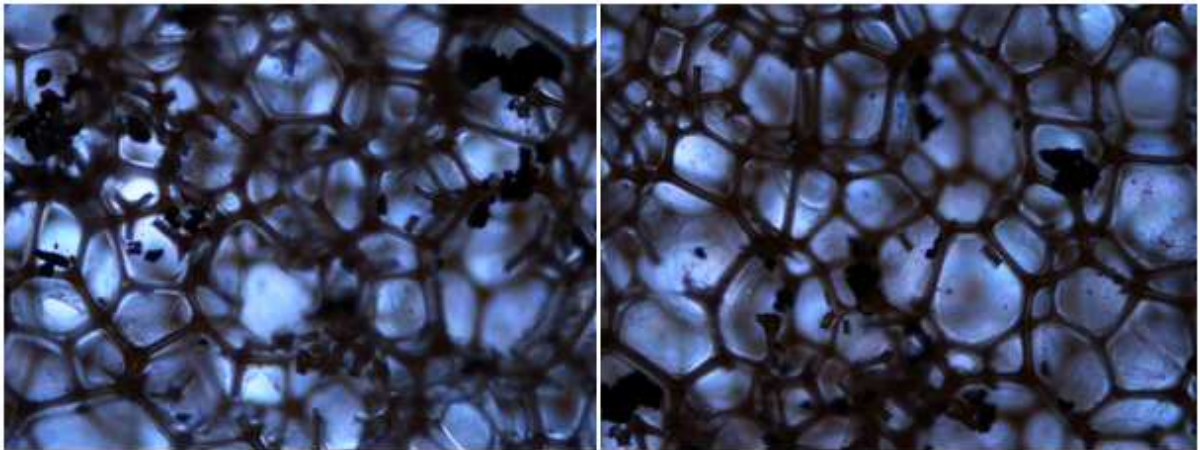


Indulin AT ampliação 100x

Figura 5.21. Análise da biodegradação em meio sólido com inóculo da espuma Indulin AT por microscopia óptica. Para cada ampliação as figuras mostram duas zonas distintas da espuma.



Alcell ampliação 20x

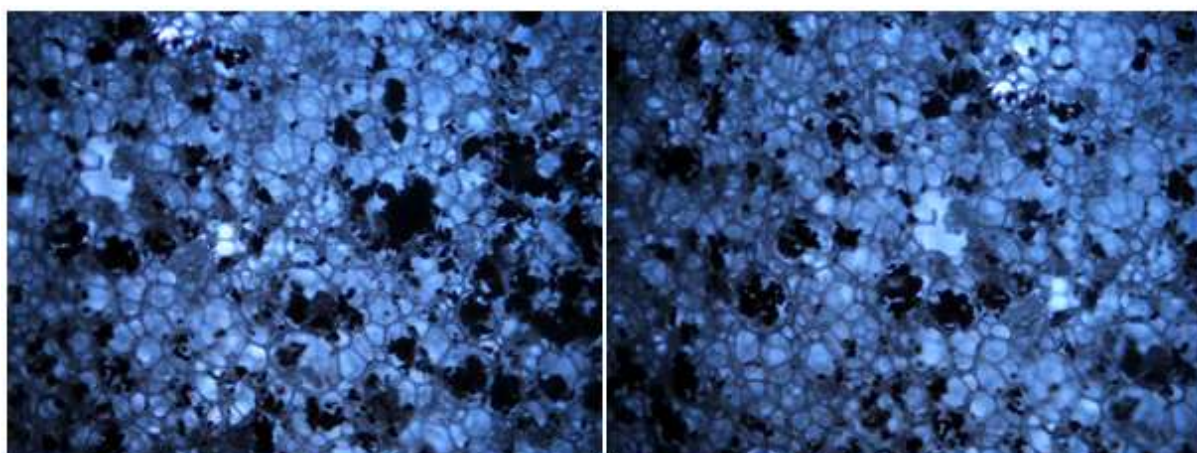


Alcell ampliação 40x

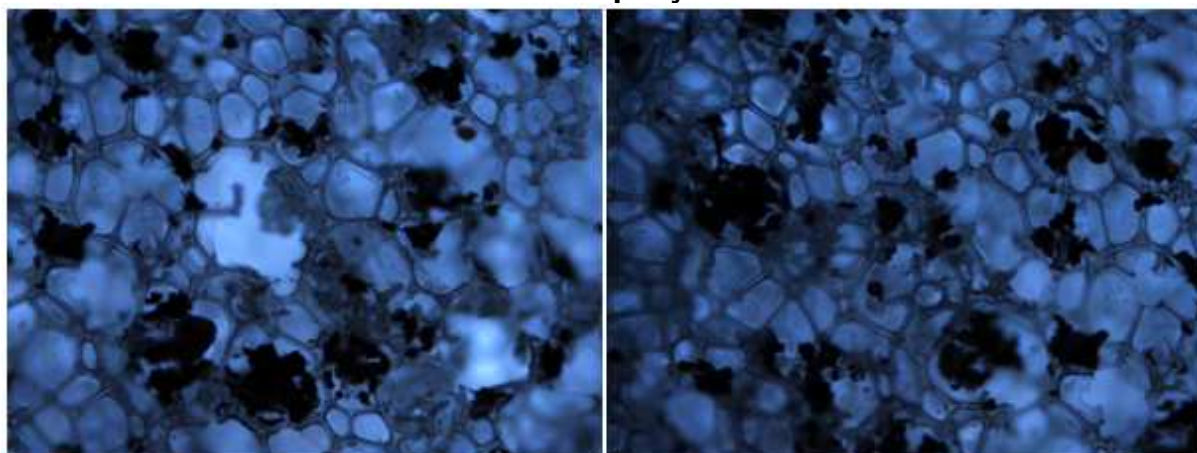


Alcell ampliação 100x

Figura 5.22. Análise da biodegradação em meio sólido com inóculo da espuma Alcell por microscopia óptica. Para cada ampliação as figuras mostram duas zonas distintas da espuma.



Comercial ampliação 20x



Comercial ampliação 40x

Figura 5.23. Análise da biodegradação em meio sólido com inóculo da espuma Comercial por microscopia óptica. Para cada ampliação as figuras mostram duas zonas distintas da espuma.

Efectuou-se ainda uma análise mais detalhada dos níveis de biodegradação no meio sólido sem inóculo e com inóculo para as diferentes espumas, com a análise comparada do CO₂ produzido nos testes. As figuras 5.24 a 5.26 mostram a comparação do CO₂ produzido nas três diferentes espumas estudadas.

Como esperado, na comparação dos testes de biodegradação em meio sólido sem inóculo e com inóculo, verificam-se diferenças na produção de CO₂. Em todos os casos, os testes de biodegradação em meio sólido com inóculo tiveram uma produção superior de CO₂ devido a inclusão do fungo *Aspergillus niger* que aumentou a concentração de microrganismos presentes no solo levando a uma maior biodegradação das amostras. Como referido, em ambos os casos (com e sem adição de inóculo), os resultados obtidos

parecem indicar uma maior apetência do fungo *Aspergillus niger* para degradar as espumas Indulin AT e Alcell pois em comparação com a espuma comercial estas apresentam maiores diferenças na produção de CO₂ quando comparados os ensaios com inóculo e sem inóculo. Tal poderá estar relacionado com as características dos materiais, quer a nível de estrutura química, quer relacionado com a própria estrutura das células (tamanho, espessura da parede, etc.).

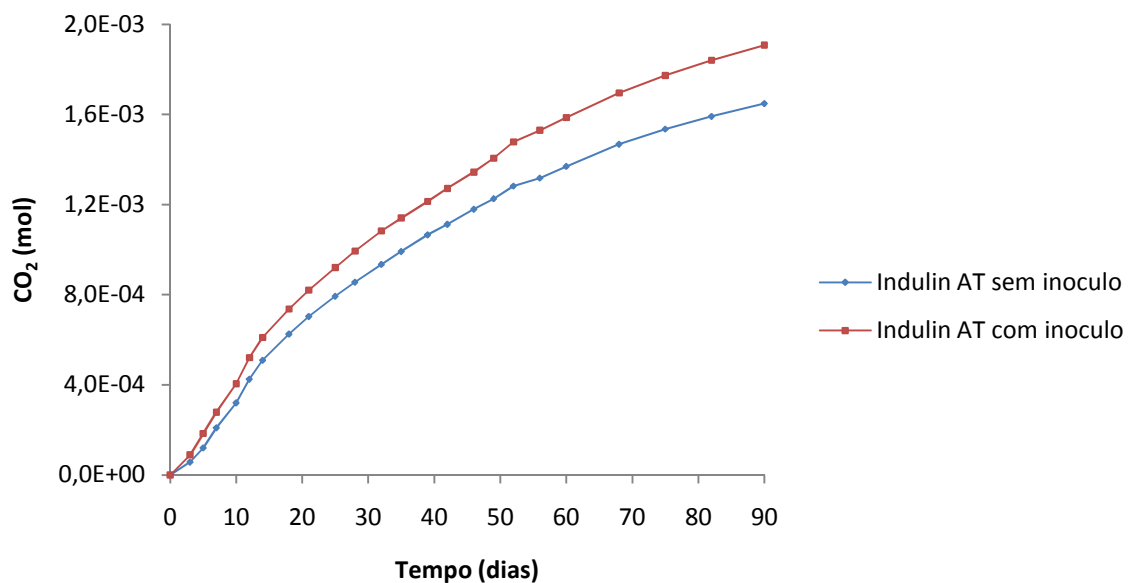


Figura 5.24. Representação gráfica da produção de CO₂ comparada, para a espuma Indulin AT nos testes de biodegradação em meio sólido com inóculo e sem inóculo.

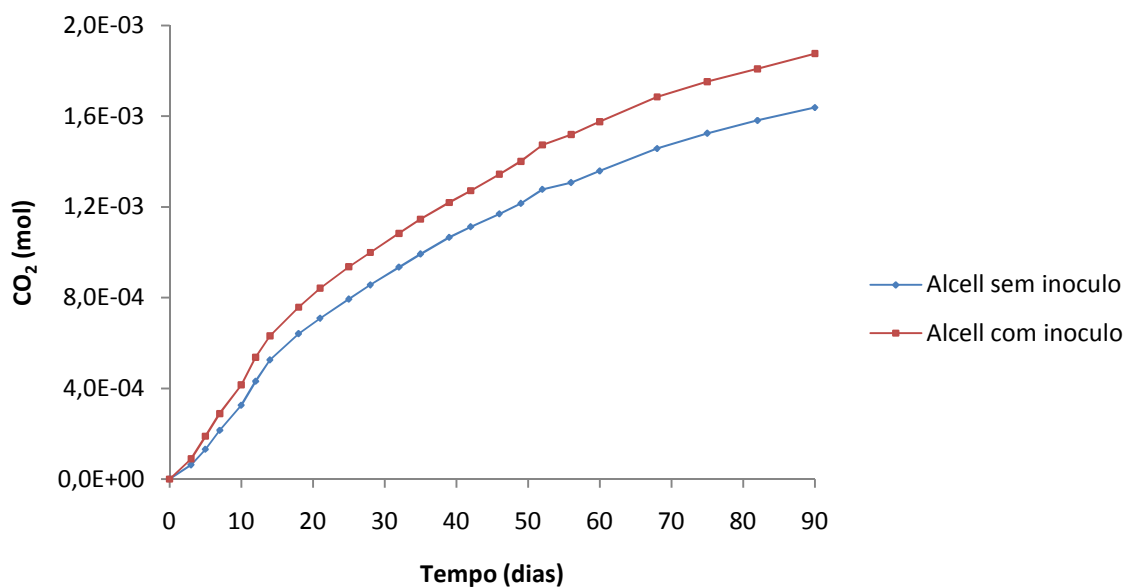


Figura 5.25. Representação gráfica da produção de CO₂ comparada, para a espuma Alcell nos testes de biodegradação em meio sólido com inóculo e sem inóculo.

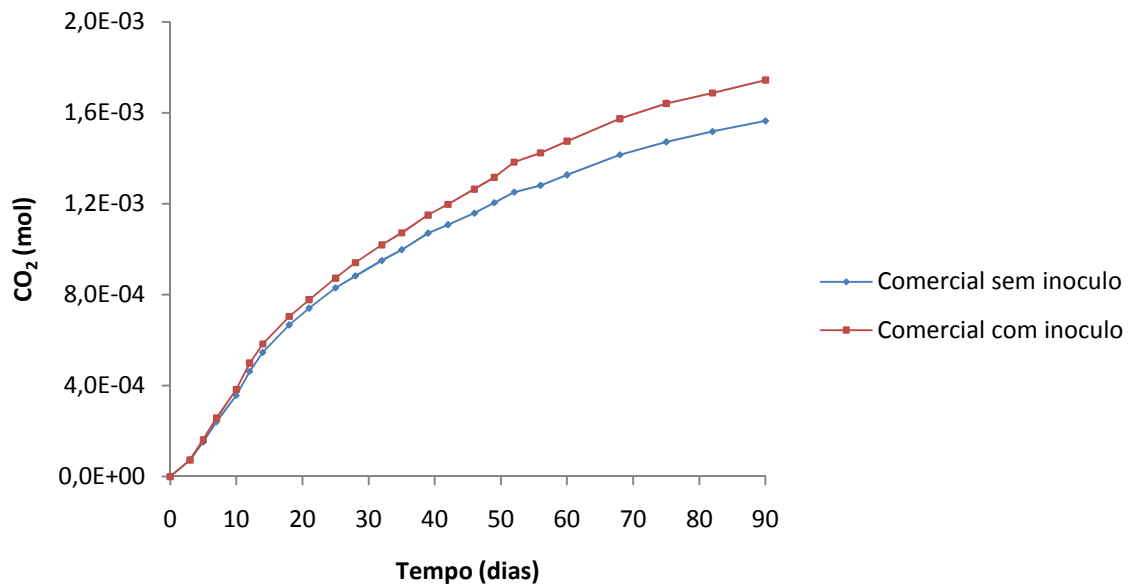


Figura 5.26. Representação gráfica da produção de CO₂ comparada, para a espuma comercial nos testes de biodegradação em meio sólido com inóculo e sem inóculo.

Na análise comparada por microscopia óptica nos testes de biodegradação em meio sólido sem inóculo e com inóculo, verifica-se que as amostras em meio sólido com inóculo apresentam a estrutura das células mais degradadas podendo-se observar mais falhas e buracos do que nos testes em meio sólido sem inóculo, estes indícios de degradação parece ser mais evidentes na espuma Indulin AT.

6. Conclusões e Perspectivas de Trabalho Futuro

No presente trabalho estudou-se a biodegradação de espumas de poliuretano provenientes de fontes renováveis através da implementação de testes diferentes. O procedimento experimental dividiu-se em três partes, nomeadamente testes de biodegradação em placas, testes de respirometria em meio líquido e testes de respirometria em meio sólido.

Na maioria dos testes realizados, o fungo *Aspergillus niger* foi o microrganismo escolhido devido à sua capacidade natural de biodegradação.

Os estudos de biodegradação incidiram sobre 2 amostras de espuma de poliuretano sintetizadas com um polioliol de base lenhina obtidos por oxipropilação. Essas amostras foram designadas por espuma Indulin AT e espuma Alcell reflectindo a lenhina base utilizada na preparação do polioliol. Utilizou-se ainda uma espuma preparada com um polioliol comercial de base poliéter (Lupranol 3323) que se designou por espuma comercial.

Os testes de biodegradação em placas foram realizados como uma análise preliminar para verificar a adequação do microrganismo escolhido. Pela observação visual das placas de petri verificou-se que o microrganismo conseguiu crescer na presença das várias espumas e que existiu um bom contacto do micélio fúngico com as amostras desenvolvendo-se através das hifas por toda a superfície das espumas. Para uma análise mais detalhada as espumas foram observadas por microscopia óptica que permitiu confirmar o crescimento do microrganismo nas amostras. Nas ampliações de 40x e 100x pode-se observar a presença do microrganismo nas paredes das células das espumas; pode-se observar ainda que as células das amostras no que respeita a sua integridade estrutural estão comprometidas apresentando fissuras, rachas e o colapso da sua estrutura.

Nos testes de respirometria em meio líquido verificou-se que a espuma Indulin AT foi a que apresentou maior CO_2 produzido, indicando que a espuma Indulin AT parece ser mais susceptível a sofrer fenómenos de biodegradação, seguindo-se a espuma Alcell e só por fim a espuma comercial. Na análise microscópica das diferentes espumas verificou-se, para além da presença de hifas, que a estrutura da parede das células, inicialmente com aspecto liso e brilhante, apresenta um aspecto rugoso tendo-se mesmo dissolvido e rompido em alguns pontos. Sobretudo para a espuma Indulin AT foi visível a presença de uma espécie de teia em torno das células destruídas, assim como quebras e pequenos buracos em toda a estrutura.

Os testes de respirometria em meio líquido com o mesmo caldo nutritivo diluído 1:1000 foram realizados para verificar se o caldo nutritivo inicialmente escolhido era adequado no que respeita à quantidade de nutrientes presentes. Isto porque em caso de excesso de nutrientes, o microrganismo poderia não apresentar tanta apetência para utilizar as amostras como fonte de energia. Um ponto crucial na aplicação de testes em meio líquido é a inclusão de fontes adicionais de carbono e azoto no qual tem que existir um ponto de equilíbrio entre o desenvolvimento do microrganismo e a biodegradação do material de teste. A criação de um meio pobre em nutrientes induziu que o microrganismo utilizasse a espuma como fonte de energia pela falta de nutrientes no meio. Ao longo da duração do teste, e como era de esperar, registou-se um fraco desenvolvimento do microrganismo que levou a uma produção de CO₂ muito inferior aos testes sem diluição. No entanto, constatou-se que as diferenças observadas entre as amostras foram muito mais evidentes comparativamente com o teste sem diluição.

Nos testes de respirometria em meio sólido sem inóculo verificou-se que o frasco com maior CO₂ produzido é o da espuma Indulin AT mostrando maior biodegradação, seguindo-se a Alcell e finalmente a comercial. Pela análise microscópica constatou-se a existência de biodegradação nas diferentes espumas podendo-se observar claramente falhas na estrutura das células (apresentando rachas e buracos).

À semelhança dos restantes testes, nos testes de respirometria em meio sólido com inóculo verificou-se a existência de uma maior produção de CO₂ no teste com espuma Indulin AT, seguindo-se a Alcell e no final a comercial. Nos ensaios em meio sólido sem inóculo as espumas Indulin AT e Alcell apresentaram consumos de CO₂ muito semelhantes ao passo que a espuma comercial teve um consumo de CO₂ inferior. Com a análise microscópica constatou-se que a biodegradação é evidente nas diferentes espumas podendo-se observar falhas na estrutura das células apresentando rachas e buracos.

Na comparação dos testes de biodegradação em meio sólido sem inóculo com os testes de biodegradação em meio sólido com inóculo, verificam-se diferenças na produção de CO₂, os testes de biodegradação em meio sólido com inóculo tiveram uma produção superior de CO₂ devido a inclusão do fungo *Aspergillus niger* que aumentou a concentração de microrganismos presentes no solo levando a uma maior biodegradação das amostras. Pela análise dos resultados obtidos, estes parecem indicar que existe uma maior apetência do fungo *Aspergillus niger* para degradar as espumas Indulin AT e Alcell pois em comparação com a espuma comercial estas apresentam maiores diferenças na produção de CO₂ quando comparados os ensaios com inóculo e sem inóculo. Na comparação dos testes de biodegradação em meio sólido sem inóculo e com inóculo, verificou-se que as amostras em meio sólido com inóculo apresentam a estrutura das

células mais degradadas do que nos testes em meio sólido sem inóculo, estes indícios de degradação parecem ser mais evidentes na espuma Indulin AT, o que demonstra que a presença do fungo *Aspergillus niger* aumenta a degradação das espumas.

Para trabalho futuro é possível identificar e sugerir algumas alterações, nomeadamente, aumentar a duração do tempo de teste, a implementação de outro tipo de testes de biodegradação, a utilização de outros microrganismos ou consórcios de diferentes microrganismos capazes de degradar as espumas estudadas, a utilização nos testes de biodegradação de diferentes meios líquidos e sólidos. Finalmente a análise da biodegradação pode ser mais estudada ao nível da estrutura química das amostras por FTIR e ao nível de estrutura física por microscopia electrónica de varrimento. Uma análise por FTIR permitiria uma melhor avaliação dos mecanismos de biodegradação das espumas, nomeadamente se esta biodegradação ocorre ao nível dos segmentos moles (poliol) ou ao nível dos segmentos duros (isocianato) e permitiria analisar se os grupos uretânicos presentes nas espumas são afectados no processo de biodegradação. Uma análise por microscopia electrónica de varrimento permitiria observar as amostras das espumas a uma maior ampliação e observar a estrutura das células numa perspectiva mais completa.

7. Referências bibliográficas

- Alma, M. H., e M. A. Basturk. "New polyurethane-type rigid foams from liquified wood powders." *Journal Of Materials Science Letters*, 22, 1225-1228 (2003)
- Bastioli, Catia. *Handbook of Biodegradable Polymers*. United Kingdom: Rapra Technology Limited, (2005)
- Cangemi, José M., Antonia M. dos Santos, Salvador C. Neto, e Gilberto O. Chierice. "Biodegradation of Polyurethane Derived from Castor Oil." *Polímeros: Ciência e Tecnologia*, Vol.18, 3, 201-206 (2008)
- Cangemi, José M., Salvador C. Neto, Gilberto O. Chierice, e Antonia M. Santos. "Study of the Biodegradation of a Polymer Derived from Castor Oil by Scanning Electron Microscopy, Thermogravimetry and Infrared Spectroscopy." *Polímeros: Ciência e Tecnologia*, Vol.16, 2, 129-135, (2006)
- Carlile, Michael J., Sarah C. Watkinson, e Graham W. Gooday. *The Fungi*, 2^oed. United Kingdom: Academic Press, (2001)
- Cateto, Carolina A. B. *Poliuretanos Derivados da Lenhina: Formação, Caracterização e Aplicações*. Porto: Tese de Doutorado em Engenharia Química e Biológica, Faculdade de Engenharia - Universidade do Porto, (2009)
- Costa, João B. *Caracterização e constituição do solo*, 5^oed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, (1995)
- Deacon, Jim. *Fungal Biology*, 4^oed. United Kingdom: Blackwell Publishing, (2006)
- Dutta, Suvangshu, Niranjana Karak, Jyoti Prasad Saikia, e Bolin Kumar Konwar. "Biodegradation of Epoxy and MF Modified Polyurethane Films Derived from a Sustainable Resource." *Journal of Polymers and the Environment* (2010)
- Eaves, David. *Handbook of Polymer Foams*. United Kingdom: Rapra Technology Limited, (2004)
- Eubeler, Jan P., Marco Bernhard, Sabine Zok, e Thomas P. Knepper. "Environmental biodegradation of synthetic polymers II. Biodegradation of different polymer groups." *Trends in Analytical Chemistry*, 10 ed. (2009)
- Gautam, R., A. S. Bassi, e E. K. Yanful. "A Review of Biodegradation of Synthetic and Foams." *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 141, 85-108 (2006)

- Gautam, R., A. S. Bassi, E. Y. Yanful, e E. Cullen. "Biodegradation of waste polyester polyurethane foam using *Pseudomonas chlororaphis* ATCC55729." *International Biodeterioration e Biodegradation*, 60, 245-249 (2007)
- Grazali, Razmah, Lai Choon Mei, Norin Zamiah Kassim Shaari, Mohtar Yusof, e Salmiah Ahmad. "Preliminary Study on Microbial Degradation Of Flexible Polyurethane Foams - Physico-Mechanical And Weight Changes During Fungal Deterioration." *Journal of Oil Palm Research*, Vol.17, 103-109 (2005)
- Grima, Sophia, Veronique Bellon-Maurel, Pierre Feuilloley, e Françoise Silvestre. "Aerobic Biodegradation of Polymers in Solid-State Conditions: A Review of Environmental and Physicochemical Parameter Settings in Laboratory Simulations." *Journal of Polymers and the Environment*, 4 ed. (2000)
- Howard, G. T., C. Ruiz, e N. P. Hilliard. "Growth of *Pseudomonas chlororaphis* on a polyester-polyurethane and the purification and characterization of a polyurethanase esterase enzyme." *International Biodeterioration e Biodegradation*, 43, 7-12 (1999)
- Howard, G. T., e N. P. Hilliard. "Use of Coomassie blue-polyurethane interaction in screening of polyurethanase proteins and polyurethanolytic bacteria." *International Biodeterioration e Biodegradation*, 43, 23-30 (1999)
- Howard, Gary T. "Biodegradation of polyurethane: a review." *International Biodeterioration e Biodegradation*, 49, 245-252 (2002)
- Innocenti-Mei, Lucia H., e Pilar D. S. C. Mariani. "Visão geral sobre polímeros ou plásticos ambientalmente degradáveis." (2005)
- Kay, M. J., L. H. G. Morton, e E. L. Prince. "Bacterial degradation of polyester polyurethane." *Internacional Biodeterioration e Biodegradation*, 27, 205-222 (1991)
- Kloss, Juliana R. *Síntese e caracterização de poliuretanos biodegradáveis à base de Poli(ϵ -Caprolactona)Diol*. Curitiba: Tese de Doutorado em Ciências, Programa de Pós-Graduação em Química - Universidade Federal do Paraná (2007)
- Kloss, Juliana R., et al. "Application of the principal component analysis method in the biodegradation polyurethanes evaluation." *Materials Science and Engineering*, 29, 470-473 (2009)
- Krzan, Andrej, Sarunya Hemjinda, Stanislav Miertus, Andrea Corti, e Emo Chiellini. "Standardization and certification in the area of environmentally degradable plastics: review article." *Polymer Degradation and Stability*, 91, 2819-2833 (2006)

- Llanos, Gustavo Adolfo Hincapié, e Margarita Enid Ramírez Cardona. "Evaluación de la biodegradación aerobia de poliuretano residual generado en la industria de fabricación de refrigeradores." *Revista Investigaciones Aplicadas*, 5, 15-25 (2009)
- Machida, Masayuki, e Katsuya Gomi. *Aspergillus: Molecular Biology and Genomics*. United Kingdom: Caister Academic Press, (2010)
- Moreira, Fátima M. S., e José O. Siqueira. *Microbiologia e Bioquímica do solo*, 2ªed. Lavras: Editora UFLA, (2006)
- Rudnik, Ewa. *Compostable Polymer Materials*. United Kingdom: Elsevier, (2008)
- Shah, Aamer A., Fariha Hasan, Abdul Hameed, e Safia Ahmed. "Biological degradation os plastics: A comprehensive review." *Biotechnology Advances*, 26, 246-265 (2008)
- Shah, Aamer A., Fariha Hasan, Javed I. Akhter, Abdul Hameed, e Safia Ahmed. "Degradation of polyurethane by novel bacterial consortium isolated from soil." *Annals of Microbiology*, 58, 381-386 (2007)
- Slivinski, Christiane T. *Produção, purificação parcial e caracterização bioquímica de glucoamilase de Aspergillus niger obtida por fermentação em estado sólido*. Ponta Grossa: Dissertação de Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos - Universidade Estadual de Ponta Grossa, (2007)
- Szycher, Michael. *Szycher's Handbook of Polyurethanes*. United States of America: CRC Press, (1999)
- Tokiwa, Yutaka, Buenaventura P. Calabia, Charles U. Ugwu, e Seiichi Aiba. "Biodegradability of Plastics: review." *International Journal of Molecular Sciences*, 10, 3722-3742 (2009)
- Tosin, Maurizio, Francesco Degli-Innocenti, e Catia Bastioli. "Detection of a Toxic Product Released by a Polyurethane-Containing Film Using a Composting Test Method Based on a Mineral Bed." *Journal of Environmental Polymer Degradation*, 2 (1998)
- Umare, Suresh S., e Ajay S. Chandure. "Synthesis, characterization and biodegradation studies of poly(ester urethane)s." *Chemical Engineering Journal*, 142, 65-77 (2008)
- Urgun-Demirtas, Meltem, Dileep Singh, e Krishma Pagilla. "Laboratory investigation of biodegradability of a polyurethane foam under anaerobic conditions." *Polymer Degradation and Stability*, 92, 1599-1610 (2007)
- Wainwright, M. *An Introduction to Fungal Biotechnology*. United Kingdom: John Wiley e Sons, (1992)

Wang, Hui, e Hong-Zhang Chen. "A novel method of utilizind the biomass resouce: Rapid liquefaction of wheat straw and preparation of biodegradable polyurethane foam (PUF)." *Journal of the Chinese Institute of Chemical Engineers*, 38, 95-102 (2007)

Watanabe, Atsushi, Yoshihiro Takebayashi, Toshiro Ohtsubo, e Mutsuhisa Furukawa. "Dependence of Biodegradation and Release Behavior on Physical Properties of Poly(caprolactone)-Base Polyurethanes." *Journal of Applied Polymer Science*, 114, 246-253 (2009)

Zheng, Ying, Ernest K. Yanful, e Amarjeet S. Bassi. "A review of plastic waste biodegradation." *Critical Reviews in Biotechnology*, 25, 243-250 (2005)

8. Anexos

Anexo A: Inventário das normas

Sociedade Americana para Testes e Materiais (ASTM: American Society for Testing and Materials International) (<http://www.astm.org>)

O comité responsável é o D20.96 (o comité D20 trabalha em plásticos e o subcomité 96 em plásticos ambientalmente degradáveis e seus produtos). Existem actualmente 26 normas activas e outros 10 itens em desenvolvimento. A Tabela A.1 lista o conjunto de normas mais relevantes publicadas pelo Comité ASTM D20.96.

Tabela A.1. Lista de normas publicadas pelo Comité ASTM D20.96.

Normas ASTM activas	Descrição
D5210 – 92 (2002)	Método de teste padrão para determinação da biodegradação anaeróbia de materiais plásticos na presença de lamas de esgotos municipais
D5247 – 92	Método de teste padrão para determinação da biodegradação anaeróbia de plásticos degradáveis por microrganismos específicos
D5272 – 92 (1999)	Prática padronizada para testes de exposição externa de plásticos fotodegradáveis
D5510 – 94 (2001) *	Prática padronizada para envelhecimento térmico de plásticos degradáveis por oxidação
D5511 – 02	Método de teste padrão para determinação da biodegradação anaeróbia de materiais plásticos sob condições de digestão anaeróbia de elevado conteúdo sólido
D5526 – 94 (2002)	Método de teste padrão para determinação da biodegradação anaeróbia de materiais plásticos sob condições aceleradas de aterro
D5951 – 96 (2002)	Prática padronizada para preparação de sólidos residuais, obtidos após método padrão de biodegradação para plásticos no lixo sólido, para testes de toxicidade e qualidade do composto
D5988 – 03 *	Método de teste padrão para determinação da biodegradação aeróbia em solo de materiais plásticos ou plásticos residuais após compostagem
D6002 – 96 (2002) e1	Guia padrão para a avaliação da compostabilidade de plásticos ambientalmente degradáveis
D6003 – 96	Método de teste padrão para determinação da perda de massa de materiais plásticos expostos a um lixo sólido municipal simulado, em ambiente de compostagem aeróbia

Tabela A.1. (continuação)

D6340 – 98	Método de teste padrão para determinação da biodegradação aeróbia de materiais plásticos radiomarcados em ambiente aquoso ou de compostagem
D6400 – 99e1*	Especificação padrão para plásticos compostáveis
D6691 – 01	Método de teste padrão para determinação da biodegradação aeróbia de materiais plásticos em ambiente marinho por um consórcio microbiano definido
D6692 – 01	Método de teste padrão para determinação da biodegradação de materiais plásticos radiomarcados em águas marinhas
D6776 – 02	Método de teste padrão para determinação da biodegradação anaeróbia de materiais plásticos radiomarcados, em escala laboratorial, com ambiente simulado de aterro
D6868 – 03	Especificação padrão para plásticos biodegradáveis usados como recobrimento de papel e outros substratos compostáveis
D6954 – 04	Guia padrão para exposição e teste de plásticos que degradam no ambiente pela combinação de oxidação e biodegradação

D Número de designação; - ano da adopção original ou da última revisão (ano de reaprovação) e número de mudança editorial *, indicando que uma revisão está a ser proposta para o actual norma.

Organização Internacional para Normalização (ISO: International Organization for Standardization) (www.iso.org)

A maioria das normas é lançada sob a responsabilidade dos comités T61/SC5/WG22 (o comité técnico T61 trabalha em plásticos, o subcomité SC5 trabalha com propriedades físicas e químicas e o grupo WG22 trabalha em plásticos biodegradáveis). Existem actualmente 23 normas activas e 4 itens sob desenvolvimento. A Tabela A.2 reúne a lista de normas mais relevantes publicadas pelo Comité ISO TC61/SC5.

Tabela A.2. Lista de normas publicadas pelo Comité ISO TC61/SC5.

Normas ISO activas	Descrição
ISO 7827:1994	Qualidade da água - avaliação da biodegradabilidade aeróbia definitiva de compostos orgânicos em um meio aquoso – método de análise do carbono orgânico dissolvido (COD)
ISO 9887:1992	Qualidade da água - avaliação da biodegradabilidade aeróbia definitiva de compostos orgânicos em meio aquoso – método semi-contínuo de lama activada (SCLA)

Tabela A.2. (continuação)

ISO 9888:1999	Qualidade da água - avaliação da biodegradabilidade aeróbia definitiva de compostos orgânicos em meio aquoso - teste estático (método Zahn-Wellens)
ISO 10707:1994	Qualidade da água - avaliação da biodegradabilidade aeróbia definitiva de compostos orgânicos em um meio aquoso - método de análise da carência bioquímica de oxigénio (teste da garrafa fechada)
ISO 10708:1997	Qualidade da água - avaliação da biodegradabilidade aeróbia definitiva de compostos orgânicos em um meio aquoso - determinação da carência bioquímica de oxigénio em um teste de garrafa fechada de duas fases
ISO 11266:1994	Qualidade do solo - guia de teste em laboratório para biodegradação de substâncias orgânicas em solo sob condições aeróbias
ISO 11733:2004	Qualidade da água - determinação da eliminação e da biodegradabilidade de compostos orgânicos em um meio aquoso - teste de simulação de lama activada
ISO 14851:1999	Determinação da biodegradação aeróbia definitiva de materiais plásticos em um meio aquoso - método da medida da carência de oxigénio em um respirómetro fechado
ISO 14852:1999	Determinação da biodegradação aeróbia definitiva de materiais plásticos em um meio aquoso - método da análise do dióxido de carbono envolvido
ISO 14855:1999 *	Determinação da biodegradação aeróbia definitiva e desintegração de materiais plásticos sob condições controladas de compostagem - método de análise do dióxido de carbono envolvido
ISO 15473:2002	Qualidade do solo - guia de testes de laboratório para biodegradação de substâncias orgânicas em solo sob condições anaeróbias
ISO 16929:2002	Plásticos - determinação do grau de desintegração dos materiais plásticos sob condições definidas de compostagem em teste de escala piloto
ISO 17556:2003	Plásticos - determinação da biodegradação aeróbia definitiva em solo, medindo a carência de oxigénio em um respirómetro ou da quantidade de dióxido de carbono envolvido
ISO 20200:2004	Plásticos - determinação do grau de desintegração de materiais plásticos sob condições simuladas de compostagem em escala laboratorial

ISO Número de designação; : ano da adopção do original ou da última revisão; TR = Relatório técnico

* indica que uma revisão da norma está a ser proposta

Comité Europeu de Normalização (CEN: European Committee for Standardization) (<http://www.cenorm.be/cenorm/index.htm>)

O comité responsável é o TC261/SC4/WG2 (comité técnico TC261 trabalha com embalagens, subcomité SC4 trabalha com tópicos ambientais e o grupo WG2 com degradabilidade e compostabilidade). A adopção de normas e normas CEN é requerida para todos os países membros da União Europeia. Existem actualmente 8 normas activas e 8 itens sob desenvolvimento. Muitas das normas CEN são baseadas nas normas ISO. A Tabela A.3 lista as normas mais relevantes do Comité CEN TC261.

Tabela A.3. Lista de normas publicadas pelo Comité CEN TC261.

Normas CEN activas	Descrição
EN 13432:2000*	Embalagem - requerimento para embalagem recuperável através da compostagem e biodegradação - esquema de teste e critério de avaliação para a aceitação final da embalagem
EN 14045:2003	Embalagem - avaliação da desintegração de materiais de embalagem em testes práticos orientados sob condições definidas de compostagem
EN ISO 14851:2004	Determinação da biodegradação aeróbia definitiva de materiais de embalagem em meio aquoso - método da medida da carência de oxigénio em respirómetro fechado (ISO 14851:1999)
EN ISO 14852:2004	Determinação da biodegradação aeróbia definitiva de materiais plásticos em meio aquoso - método pela análise do dióxido de carbono envolvido (ISO 14852:1999)
EN ISO 14855:2004	Determinação da biodegradação aeróbia definitiva e desintegração de materiais plásticos sob condições controladas de compostagem - método pela análise do dióxido de carbono envolvido (ISO 14855:1999)

EN Número de designação; : ano da adopção do original ou da última revisão

* indica que uma revisão do Norma está sendo proposta

Instituto Germânico de Normalização (DIN: German Institute for Standardization) (<http://www2.din.de>)

O comité responsável é o DIN FNK 103.3. Existem actualmente 9 normas activas, sendo que quatro delas foram originalmente desenvolvidas pelo DIN, ou seja, o DIN V 54900 ff. A Tabela A.4 lista o conjunto de normas mais relevantes publicadas pelo Comité DIN FNK 103.3.

Tabela A.4. Lista de normas publicadas pelo Comité DIN FNK 103.3.

Normas DIM activas	Descrição
DIN V 54900-1	Teste de compostabilidade de plásticos – Parte 1: teste químico
DIN V 54900-2	Teste de compostabilidade de plásticos – Parte 2: teste da biodegradabilidade completa de plásticos em testes de laboratório
DIN V 54900-3	Teste de compostabilidade de plásticos – Parte 3: teste na prática – condições relevantes e método de teste da qualidade dos compostos
DIN 54900-4	Teste de compostabilidade de plásticos – Parte 4: teste da ecotoxicidade dos compostos
DIN Número de designação	

Anexo B: Estudos relatados na literatura sobre a degradação de poliuretanos

A Tabela B.1 apresenta os aspectos mais importantes de estudos disponíveis na literatura relativos a estudos de biodegradação de poliuretanos, consultados no âmbito da realização deste trabalho.

Tabela B.1. Estudos relatados na literatura sobre a degradação de poliuretanos.

Poliuretano (sistema químico)	Teste de biodegradação	Parâmetros de avaliação	Referências
<u>Tipo:</u> Espuma (provenientes de bancos de automóveis) <u>SQ:</u> Comercial	<u>Tipo:</u> Meio líquido <u>Microrganismo:</u> <i>Pseudomonas chlororaphis</i> ATCC 55729	Estrutura química/FTIR e GC; gravimetria; estrutura física/SEM; degradação enzimática/FTIR	Gautam et al., 2007
<u>Tipo:</u> Espuma <u>SQ:</u> Não comercial (Polióis: sucrose propoxilada, glicerina, ester aromático funcional e amina aromática propoxilada; Isocianato: MDI)	<u>Tipo:</u> Meio sólido e líquido As amostras foram enterradas em solo e meio mineral básico	Perca de massa/gravimetria; estrutura física/mudanças nas propriedades mecânicas; estrutura química/FTRI	Urgun-Demirtas et al., 2007
<u>Tipo:</u> Espuma <u>SQ:</u> Não comercial (Poliol: polietileno glicol; Isocianato: PMDI ^c)	<u>Tipo:</u> Meio sólido (solo) e placa <u>Microrganismo:</u> <i>Phanerochaete chrysosporium</i> , <i>Pleurotus ostreatus</i> , <i>Mucor pussilus</i> , <i>Streptomyces murinus</i> , <i>Aspergillus repens</i> , <i>A. niger</i> , <i>A. wentii</i> , <i>Penicillium claviforme</i>	Perca de massa/gravimetria; estrutura física/observações visuais	Alma et al., 2003
<u>Tipo:</u> Espuma <u>SQ:</u> Espuma comercial e espuma não comercial produzida a partir de óleo de castor	<u>Tipo:</u> Meio líquido <u>Microrganismo:</u> <i>Aspergillus sp. FUN1</i> , <i>Aspergillus sp. FUN5</i> e <i>Chryseobacterium meningosepticum BAC1</i>	Estrutura física/mudanças nas propriedades mecânicas e SEM; estrutura química/FTRI	Cangemi et al. 2006
<u>Tipo:</u> Espumas <u>SQ:</u> Espuma comercial e espuma não comercial produzida a partir de óleo de castor	<u>Tipo:</u> Placa <u>Microrganismo:</u> <i>Aspergillus sp. FUN1</i> , <i>Aspergillus sp. FUN5</i> e <i>Chryseobacterium meningosepticum BAC1</i>	Estrutura física/observações visuais	Cangemi et al. 2008
<u>Tipo:</u> Espuma <u>SQ:</u> Não comercial (Poliol: palha de trigo liquefeita (celulose, semi-celulose e lenhina) Isocianato: MDI)	<u>Tipo:</u> Meio sólido As amostras foram enterradas em solo	Perca de massa/gravimetria; estrutura física/SEM	Wang et al., 2007
<u>Tipo:</u> Espuma <u>SQ:</u> Espuma comercial e espuma não comercial à base de óleo de palma	<u>Tipo:</u> Placa <u>Microrganismo:</u> <i>Aspergillus niger</i> ATCC 9642	Estrutura física/observações visuais, SEM; propriedades mecânicas; perca de massa/gravimetria	Grazali et al. 2005

Tabela B.1. (continuação)

<u>Tipo:</u> Espuma <u>SQ:</u> Comercial – Resíduos de poliuretano das paredes de frigoríficos	<u>Tipo:</u> Placa, meio líquido e meio sólido (solo) <u>Microrganismo:</u> <i>Aspergillus niger</i>	Estrutura física/observações visuais, evolução de CO ₂ ; SEM; estrutura química/FTIR	Llanos et al., 2009
<u>Tipo:</u> Elastômero <u>SQ:</u> Comercial – Impranil DLN	<u>Tipo:</u> Placa e meio líquido <u>Microrganismo:</u> <i>Pseudomonas chlororaphis</i> ATCC 55729	Perca de massa/gravimetria	Zheng et al., 2005
<u>Tipo:</u> Elastômero <u>SQ:</u> Não comercial (Poliol: polipropileno succinato; Isocianato: MDI)	<u>Tipo:</u> Placa e meio sólido (solo)	Perca de massa/gravimetria; estrutura física/SEM	Umare et al., 2008
<u>Tipo:</u> Elastômero <u>SQ:</u> Não comercial (Poliol: poli(ε-caprolactona)diol; Isocianato: TDI ^a)	<u>Tipo:</u> Meio sólido As amostras foram enterradas em solo	Estrutura química/FTIR	Kloss et al., 2009
<u>Tipo:</u> Elastômero <u>SQ:</u> Não comercial (Polióis: poli(ε-caprolactona)diol e poli(ε-caprolactona)triol; Isocianato: MDI ^b)	<u>Tipo:</u> Meio sólido As amostras foram enterradas em solo	Perca de massa/gravimetria; estrutura física/SEM	Watanabe et al., 2009
<u>Tipo:</u> Elastômero <u>SQ:</u> Comercial (Mater-Bi ZI01U e Mater-Bi 2030/489)	<u>Tipo:</u> Meio sólido (cama de compostagem composta por vermiculita)	Gravimetria; estrutura química/HPLC, UV-VIS, FTIR e NMR	Tosin et al., 1998
<u>Tipo:</u> Elastômero <u>SQ:</u> Comercial – Impranil DLN	<u>Tipo:</u> Placa <u>Microrganismo:</u> <i>Pseudomonas chlororaphis</i>	Estrutura física/observações visuais	Howard et al., 1999
<u>Tipo:</u> Elastômero <u>SQ:</u> Não comercial (Poliol: Mono glicerida Isocianato: TDI)	<u>Tipo:</u> Meio sólido (solo) e meio líquido <u>Microrganismo:</u> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> MTCC 7815, <i>Pseudomonas aeruginosa</i> MTCC 7814 e <i>Pseudomonas aeruginosa</i> PN8A1	Estrutura física/observações visuais, microscopia óptica, SEM; propriedades mecânicas; Gravimetria; estrutura química/FTIR	Dutta et al. 2010

^a TDI: diisocianato de tolueno; ^b MDI: diisocianato de 4,4-difenilmetano; ^c PMDI: diisocianato difenilmetano polimérico

Anexo C: Amostras duplicadas dos testes de biodegradação em placas

A Figura C.1 mostra os resultados da análise visual dos duplicados ao fim dos 28 dias.

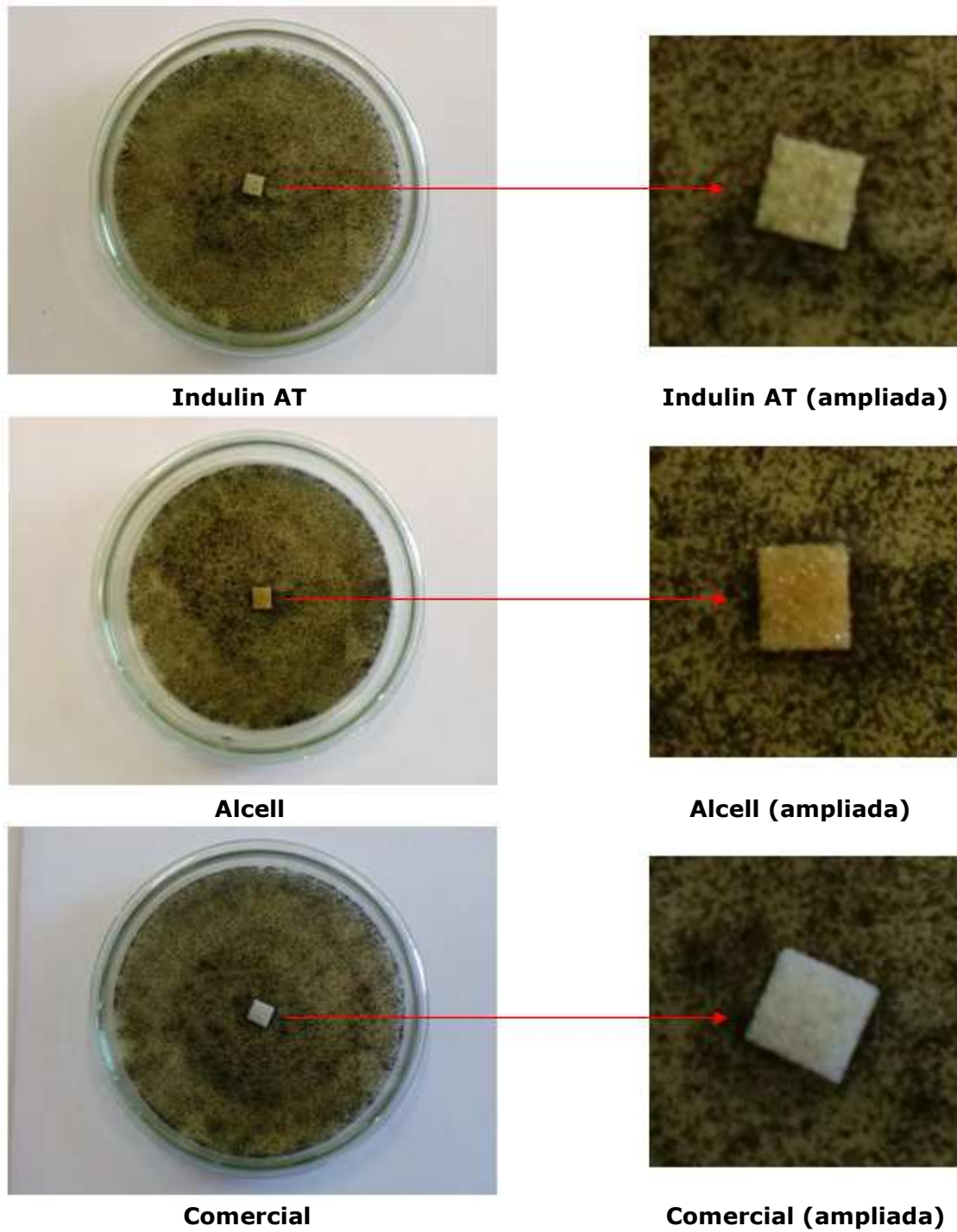
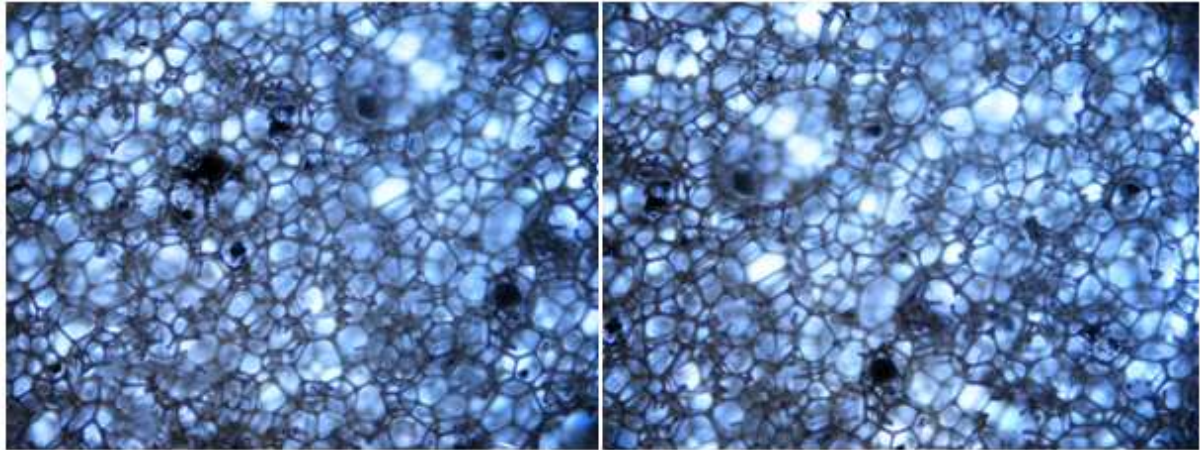
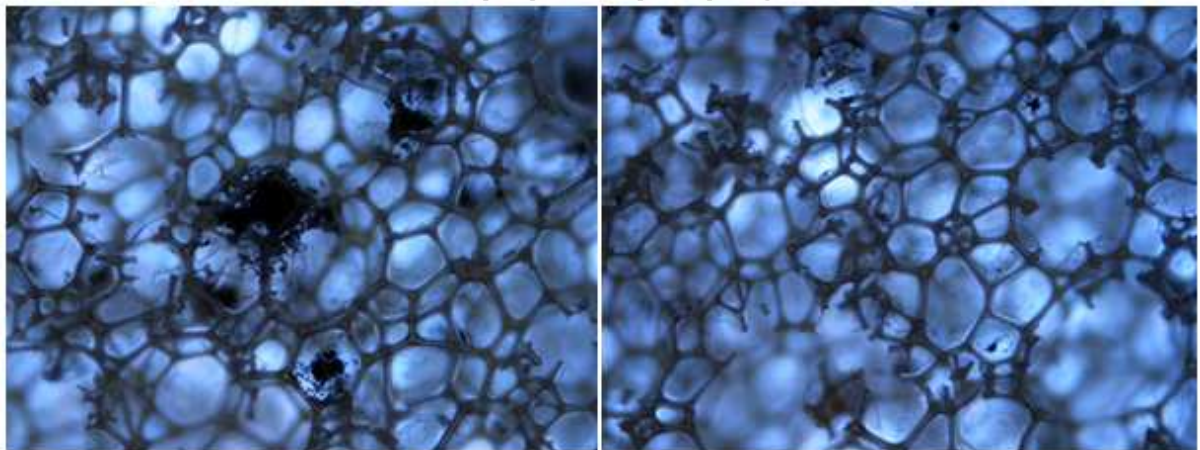


Figura C.1. Testes duplicados da biodegradação em placas com *Aspergillus niger* para as espumas Indulin AT, Alcell e comercial, ao fim de 28 dias.

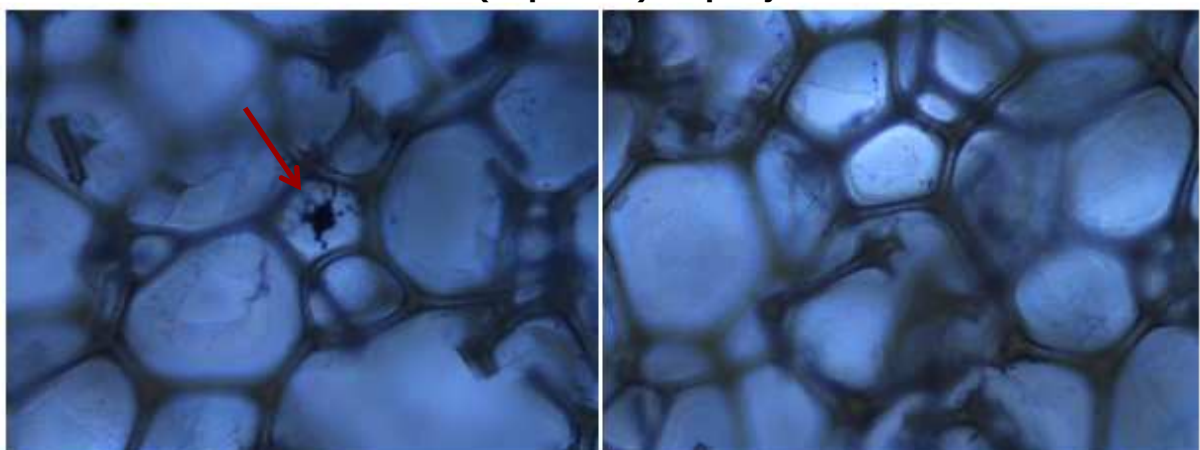
Nas Figuras C.2 a C.4 mostra-se os resultados da análise por microscopia óptica dos duplicados ao fim dos 28 dias.



Indulin AT (duplicado) ampliação 20x

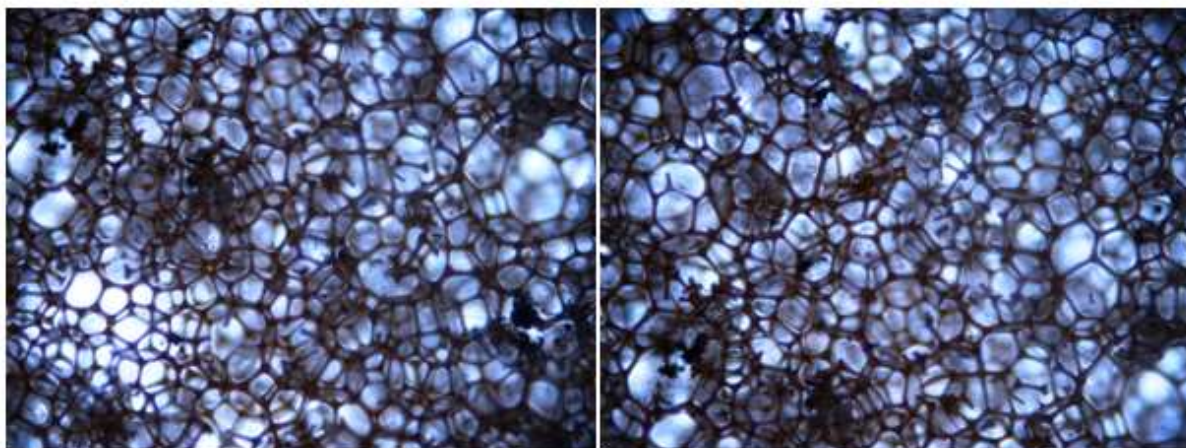


Indulin AT (duplicado) ampliação 40x

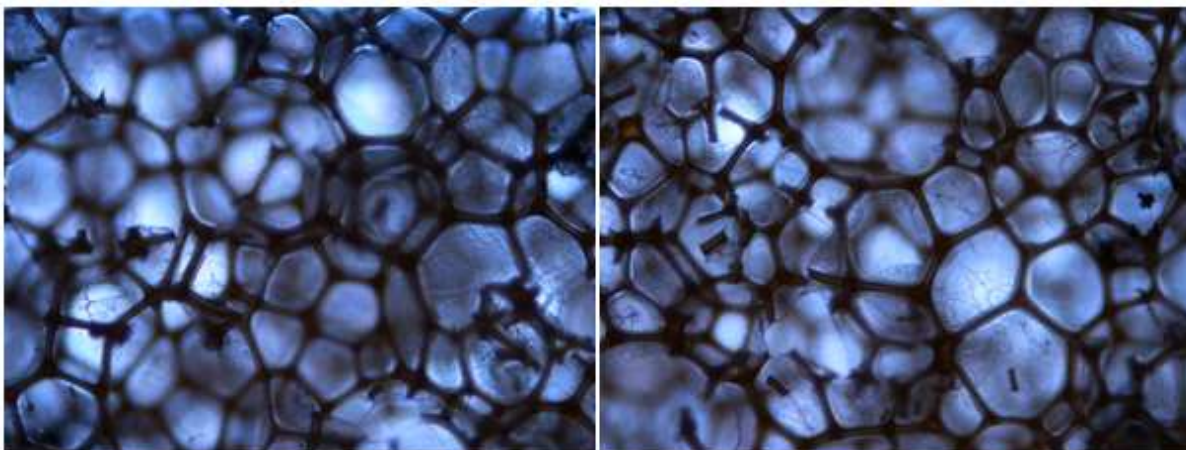


Indulin AT (duplicado) ampliação 100x

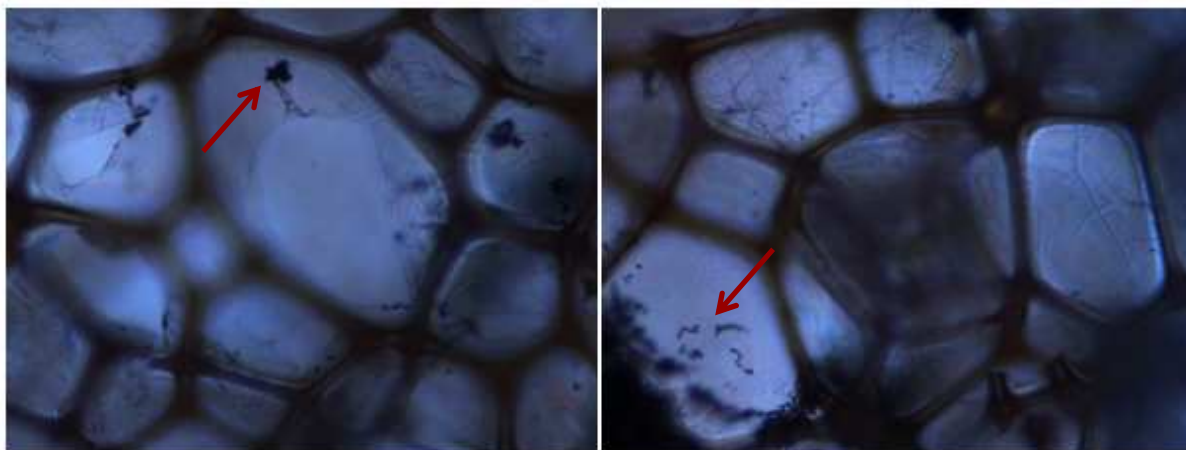
Figura C.2. Análise da biodegradação em placa do duplicado da espuma Indulin AT por microscopia óptica. Para cada ampliação as figuras mostram duas zonas distintas da espuma.



Alcell (duplicado) ampliação 20x

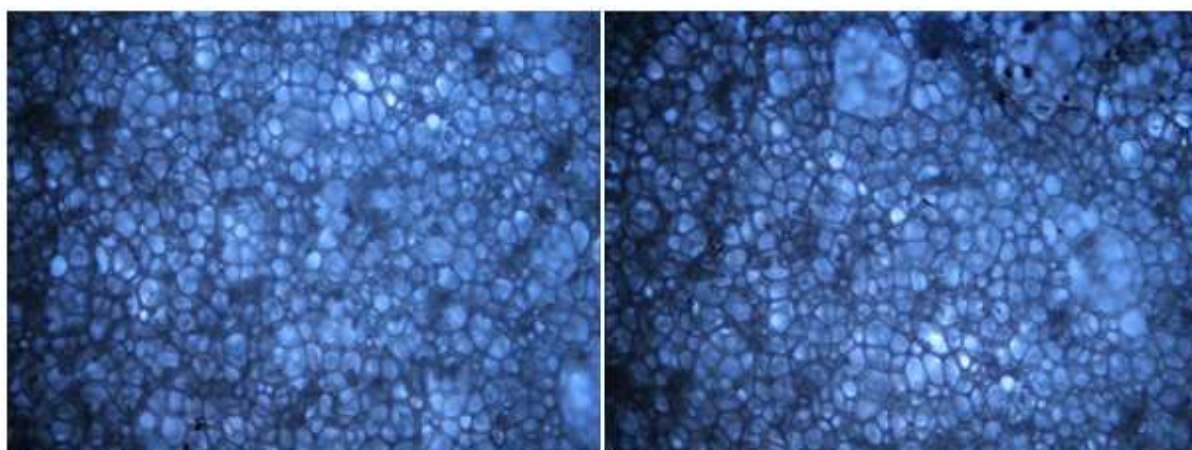


Alcell (duplicado) ampliação 40x

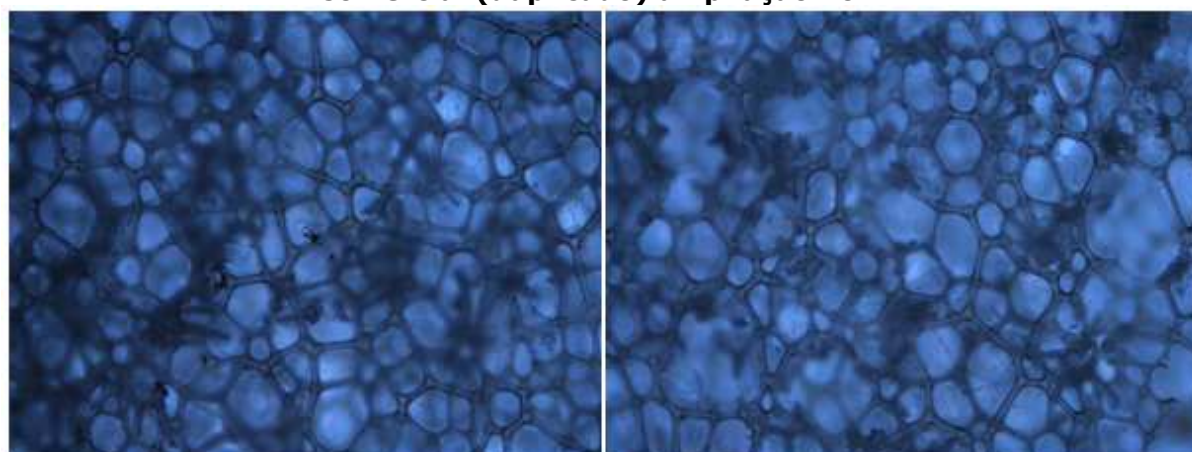


Alcell (duplicado) ampliação 100x

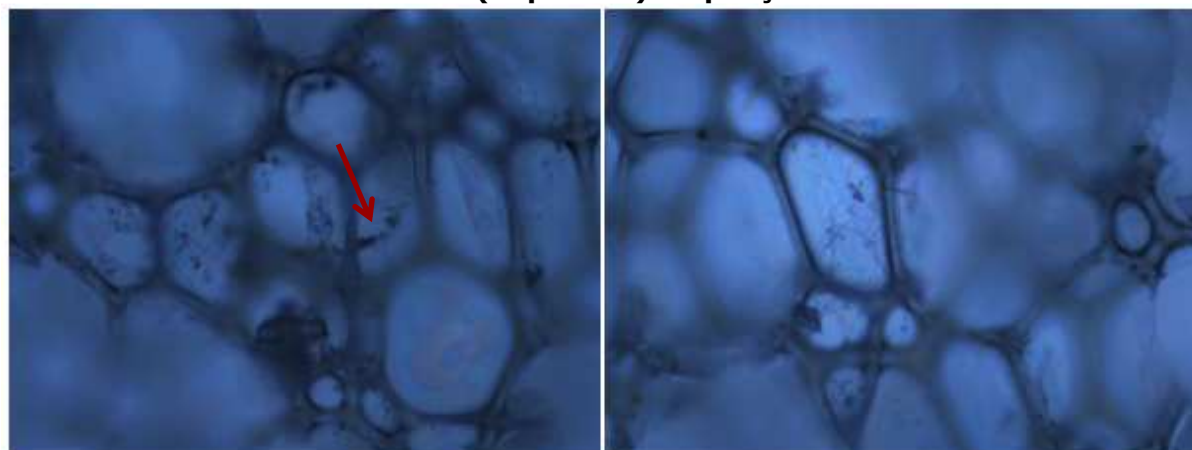
Figura C.3. Análise da biodegradação em placa do duplicado da espuma Alcell por microscopia óptica. Para cada ampliação as figuras mostram duas zonas distintas da espuma.



Comercial (duplicado) ampliação 20x



Comercial (duplicado) ampliação 40x



Comercial (duplicado) ampliação 100x

Figura C.4. Análise da biodegradação em placa do duplicado da espuma comercial por microscopia óptica. Para cada ampliação as figuras mostram duas zonas distintas da espuma.

Anexo D: Procedimento para a contagem do número de esporos

- Nos tubos de ensaio preparados anteriormente com meio de agar nutritivo em rampa e o fungo *Aspergillus niger*, adicionou-se 4ml de água destilada a cada tubo de ensaio, adicionou-se 2ml e raspou-se com uma ança e transferiu-se para vários tubos de ensaio, adicionou-se mais 2ml de água destilada voltou a raspou-se e transferiu-se para os tubos de ensaio. Esta transferência não foi feita directamente pois filtrou-se tudo com a ajuda de um funil e um filtro de pregas para retirar algum material maior como, agar ou micélios;
- Levou-se os tubos de ensaio à centrífugadora durante 15 minutos a 4000rpm;
- Retirou-se o sobrenadante e adicionou-se mais 2ml de água destilada a cada tubo de ensaio e agitou-se bem;
- Levou-se novamente os tubos de ensaio à centrífugadora durante 15 minutos a 4000rpm;
- Voltou-se retirar o sobrenadante e adicionou-se 2ml de água destilada a cada tubo de ensaio e agitou-se bem;
- Introduziu-se o inóculo num só tubo de ensaio maior e agitou-se muito bem no vortex de modo a homogeneizar bem o inóculo;
- Procedeu-se à contagem do número de esporos numa câmara de Neubauer;
- Para se obter o número de microrganismos pretendido foi-se adicionando 5ml de água destilada ao tubo de ensaio e depois agitou-se bem no vortex para homogeneizar bem a solução com o inóculo e procedeu-se à contagem do número de esporos na câmara de Neubauer até se atingir o número pretendido.

Anexo E: Determinação do teor de humidade do solo

- Lavou-se as caixas de petri, secou-se na estufa durante 2 horas a $105\pm 3^\circ\text{C}$ e deixou-se arrefecer num excicador;
- Determinou-se a massa das caixas de petri pelo menos duas vezes para garantir a exactidão do peso;
- Anotou-se a massa das caixas de petri. Tarou-se a balança e recolheu-se o solo (o solo foi previamente homogeneizado para se retirar os pedaços e pedras maiores);
- Pesou-se aproximadamente 5g de solo (m_i). Anotou-se a sua massa;
- Introduziu-se na estufa a $105\pm 3^\circ\text{C}$ durante 1 hora;
- Retirou-se da estufa e colocou-se no excicador até arrefecer;
- Mediu-se a massa do solo (m_f) e colocou-se novamente no excicador;
- Repetiu-se a pesagem sucessivamente em intervalos de 1 hora, até que a diferença entre 3 pesagens consecutivas não fosse superior 0.001g;
- Relacionou-se a massa residual com a massa inicial de acordo com a equação:

$$\text{Teor de humidade(\%)} = 1 - \frac{m_f}{m_i} * 100$$

- As determinações do teor de humidade foram feitas em duplicado.

Anexo F: Determinação do pH solo

- Pesou-se 10g de solo para um gobelé de 100ml;
- Adicionou-se 25ml de água destilada ao solo (a proporção solo/solução=1:2.5);
- Deixou-se em contacto 1 hora, agitando várias vezes com uma vareta de vidro;
- Calibrou-se o potenciómetro com soluções tampão de pH=4, pH=7 e pH=10;
- Depois de agitar-se a suspensão de solo, emergiu-se o eléctrodo e fez-se a leitura do valor de pH depois de o valor estabilizar.

Anexo G: Composição dos meios utilizados

- **Meio utilizado:** Agar nutritivo

Composição por litro:

Agar	15.0g
Peptona	5.0g
Cloreto de sódio	5.0g
Extracto de leveduras	2.0g
Extracto de bife	1.0g

pH 7.4 ± 0.2 a 25°C

Preparação do meio: Adicionar os componentes a água destilada até atingir o volume de 1L. Agitar vigorosamente, aquecer até ferver e distribuir por tubos ou frascos. Autoclave durante 15 minutos a 15psi e 121°C . Verter para placas de petri ou deixar em tubos.

- **Meio utilizado:** Caldo nutritivo

Composição por litro:

Peptona	5.0g
Cloreto de sódio	5.0g
Extracto de leveduras	2.0g
Extracto de bife	1.0g

pH 7.4 ± 0.2 a 25°C

Preparação do meio: Adicionar os componentes a água destilada até atingir o volume de 1L. Agitar vigorosamente e distribuir por tubos ou frascos. Autoclave durante 15 minutos a 15psi e 121°C . Verter para os frascos.

➤ **Meio utilizado:** Solo

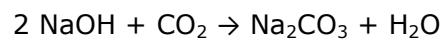
Características:

Matéria orgânica total	78.69%
Cálcio total	2.69%
Azoto total	1.33%
Fósforo total	0.69%
Ferro total	0.60%
Potássio total	0.26%
Magnésio total	0.14%
Humidade máxima	40%
pH	6 a 6.5

Anexo H: Valores recolhidos nas titulações dos testes de respirometria

Exemplo de cálculo para a determinação do número de moles de CO₂ produzido, para o dia 3 do ensaio em meio líquido para 1IAT → V_{HClgasto} = 8.8E-3L.

Reacção de carbonatação do hidróxido de sódio:



$$C_{\text{NaOH}} = 0.197 \text{mol/L}$$

$$V_{\text{NaOH}} = 1.00\text{E-}02\text{L}$$

$$n_{\text{NaOH}} = 0.00197 \text{mol}$$

$$C_{\text{Na}_2\text{CO}_3} = ? \text{ mol/L}$$

Da titulação de Na₂CO₃ com o HCl,

$$C_{\text{HCl}} = 0.212 \text{mol/L}$$

$$V_{\text{HCl}} = 8.80\text{E-}03\text{L}$$

$$V_{\text{Na}_2\text{CO}_3} = 1.00\text{E-}02\text{L}$$

como n_{ácido} = n_{base} no ponto de equivalência,

$$C_{\text{HCl}} * V_{\text{HCL}} = C_{\text{Na}_2\text{CO}_3} * V_{\text{Na}_2\text{CO}_3}$$

$$C_{\text{Na}_2\text{CO}_3} = 0.1866 \text{ mol/L}$$

$$V_{\text{Na}_2\text{CO}_3} = 1.00 \text{E-}02 \text{ L}$$

$$n_{\text{Na}_2\text{CO}_3} = 0.001866 \text{ mol}$$

De acordo com a estequiometria da reacção,



$$n_{\text{NaOH}} = 0.00197 - 0.001866 = 0.000104 \text{ mol}$$

$$n_{\text{CO}_2} = 1/2 * 0.000104 = 0.0000520 \text{ mol}$$

Seguidamente apresentam-se os valores recolhidos nas titulações dos testes de respirometria, assim como os valores de CO₂ produzido.

Nas Tabelas H.1 a H.4 estão os valores recolhidos e o CO₂ produzido nos testes em meio líquido, nas Tabelas H.5 a H.8 os testes em meio líquido com diluição 1:1000, nas Tabelas H.9 a H.12 os testes em meio sólido sem inóculo e nas Tabelas H.13 a H.16 os testes em meio sólido com inóculo.

Tabela H.1. Registo dos valores das titulações dos testes em meio líquido.

Amostra	1 IAT	2 IAT	3 Alcell	4 Alcell	5 Comercial	6 Comercial	7 Celulose	8 Celulose	9 Sem Amostra	10 Sem Amostra
Dias	Volume de HCl gasto (L)									
0	0.0E+00	0.0E+00	0.0E+00	0.0E+00	0.0E+00	0.0E+00	0.0E+00	0.0E+00	0.0E+00	0.0E+00
3	8.8E-03	8.7E-03	8.9E-03	8.9E-03	8.9E-03	9.0E-03	9.1E-03	9.1E-03	9.1E-03	9.0E-03
5	8.8E-03	8.7E-03	8.9E-03	8.8E-03	8.7E-03	8.7E-03	8.8E-03	8.8E-03	8.7E-03	8.8E-03
7	8.6E-03	8.7E-03	8.7E-03	8.7E-03	8.7E-03	8.7E-03	8.8E-03	8.7E-03	8.7E-03	8.8E-03
10	8.7E-03	8.6E-03	8.7E-03	8.7E-03	8.7E-03	8.6E-03	8.7E-03	8.7E-03	8.7E-03	8.7E-03
12	8.7E-03	8.6E-03	8.7E-03	8.8E-03	8.7E-03	8.7E-03	8.8E-03	8.8E-03	8.8E-03	8.8E-03
14	8.7E-03	8.8E-03	8.8E-03	8.7E-03	8.7E-03	8.7E-03	8.8E-03	8.7E-03	8.8E-03	8.8E-03
18	8.6E-03	8.7E-03	8.7E-03	8.6E-03	8.6E-03	8.6E-03	8.6E-03	8.5E-03	8.6E-03	8.6E-03
21	8.8E-03	8.7E-03	8.8E-03	8.8E-03	8.9E-03	8.8E-03	8.9E-03	8.9E-03	8.9E-03	8.8E-03
25	8.7E-03	8.7E-03	8.6E-03	8.7E-03	8.7E-03	8.7E-03	8.7E-03	8.7E-03	8.7E-03	8.7E-03
28	8.8E-03	8.8E-03	8.8E-03	8.9E-03	9.0E-03	8.9E-03	8.9E-03	8.8E-03	8.9E-03	8.9E-03
32	8.8E-03	8.8E-03	8.8E-03	8.7E-03	8.8E-03	8.8E-03	8.9E-03	8.8E-03	8.8E-03	8.9E-03
35	8.9E-03	8.9E-03	8.9E-03	8.9E-03	8.9E-03	8.9E-03	9.0E-03	8.9E-03	9.0E-03	8.9E-03
39	8.7E-03	8.8E-03	8.8E-03	8.8E-03	8.8E-03	8.8E-03	8.8E-03	8.9E-03	8.8E-03	8.9E-03
42	9.0E-03	8.9E-03	9.0E-03	8.9E-03	9.0E-03	9.0E-03	8.9E-03	9.0E-03	9.0E-03	9.0E-03
46	8.9E-03	8.9E-03	8.9E-03	9.0E-03	8.9E-03	8.9E-03	8.9E-03	9.0E-03	8.9E-03	8.9E-03
49	8.9E-03	9.0E-03	9.0E-03	9.0E-03	9.0E-03	9.1E-03	9.0E-03	9.1E-03	9.0E-03	9.1E-03
52	8.9E-03	8.9E-03	8.9E-03	9.0E-03	9.0E-03	9.1E-03	9.0E-03	9.0E-03	9.0E-03	9.0E-03
56	9.0E-03	9.0E-03	9.1E-03	9.0E-03	9.1E-03	9.1E-03	9.1E-03	9.1E-03	9.1E-03	9.1E-03
60	8.9E-03	9.0E-03	9.0E-03	9.0E-03	9.0E-03	9.0E-03	9.0E-03	9.0E-03	9.0E-03	9.1E-03
68	8.7E-03	(a)	8.6E-03	(a)	8.7E-03	(a)	8.7E-03	(a)	8.7E-03	8.7E-03
75	8.9E-03	(a)	8.8E-03	(a)	9.0E-03	(a)	9.0E-03	(a)	8.9E-03	8.9E-03
82	8.9E-03	(a)	8.9E-03	(a)	9.0E-03	(a)	8.9E-03	(a)	8.9E-03	8.9E-03
90	9.0E-03	(a)	9.1E-03	(a)	9.1E-03	(a)	9.0E-03	(a)	9.1E-03	9.1E-03

(a) valores não recolhidos

Tabela H.2. Número de moles de CO₂ produzido nos testes em meio líquido.

Amostra	1 IAT	2 IAT	3 Alcell	4 Alcell	5 Comercial	6 Comercial	7 Celulose	8 Celulose	9 Sem Amostra	10 Sem Amostra
Dias	Moles de CO2									
0	0.0000000	0.0000000	0.0000000	0.0000000	0.0000000	0.0000000	0.0000000	0.0000000	0.0000000	0.0000000
3	0.0000522	0.0000628	0.0000416	0.0000416	0.0000416	0.0000310	0.0000204	0.0000204	0.0000204	0.0000310
5	0.0000522	0.0000628	0.0000416	0.0000522	0.0000628	0.0000628	0.0000522	0.0000522	0.0000628	0.0000522
7	0.0000734	0.0000628	0.0000628	0.0000628	0.0000628	0.0000628	0.0000522	0.0000628	0.0000628	0.0000522
10	0.0000628	0.0000734	0.0000628	0.0000628	0.0000628	0.0000734	0.0000628	0.0000628	0.0000628	0.0000628
12	0.0000628	0.0000734	0.0000628	0.0000522	0.0000628	0.0000628	0.0000522	0.0000522	0.0000522	0.0000522
14	0.0000628	0.0000522	0.0000522	0.0000628	0.0000628	0.0000628	0.0000522	0.0000628	0.0000522	0.0000522
18	0.0000734	0.0000628	0.0000628	0.0000734	0.0000734	0.0000734	0.0000734	0.0000840	0.0000734	0.0000734
21	0.0000522	0.0000628	0.0000522	0.0000522	0.0000416	0.0000522	0.0000416	0.0000416	0.0000416	0.0000522
25	0.0000628	0.0000628	0.0000734	0.0000628	0.0000628	0.0000628	0.0000628	0.0000628	0.0000628	0.0000628
28	0.0000522	0.0000522	0.0000522	0.0000416	0.0000310	0.0000416	0.0000416	0.0000522	0.0000416	0.0000416
32	0.0000522	0.0000522	0.0000522	0.0000628	0.0000522	0.0000522	0.0000416	0.0000522	0.0000522	0.0000416
35	0.0000416	0.0000416	0.0000416	0.0000416	0.0000416	0.0000416	0.0000310	0.0000416	0.0000310	0.0000416
39	0.0000628	0.0000522	0.0000522	0.0000522	0.0000522	0.0000522	0.0000522	0.0000416	0.0000522	0.0000416
42	0.0000310	0.0000416	0.0000310	0.0000416	0.0000310	0.0000310	0.0000416	0.0000310	0.0000310	0.0000310
46	0.0000461	0.0000461	0.0000461	0.0000355	0.0000461	0.0000461	0.0000461	0.0000355	0.0000461	0.0000461
49	0.0000461	0.0000355	0.0000355	0.0000355	0.0000355	0.0000249	0.0000355	0.0000249	0.0000355	0.0000249
52	0.0000461	0.0000461	0.0000461	0.0000355	0.0000355	0.0000249	0.0000355	0.0000355	0.0000355	0.0000355
56	0.0000355	0.0000355	0.0000249	0.0000355	0.0000249	0.0000249	0.0000249	0.0000249	0.0000249	0.0000249
60	0.0000461	0.0000355	0.0000355	0.0000355	0.0000355	0.0000355	0.0000355	0.0000355	0.0000355	0.0000249
68	0.0000672	0.0000000	0.0000777	0.0000000	0.0000672	0.0000000	0.0000672	0.0000000	0.0000672	0.0000672
75	0.0000461	0.0000000	0.0000566	0.0000000	0.0000355	0.0000000	0.0000355	0.0000000	0.0000461	0.0000461
82	0.0000461	0.0000000	0.0000461	0.0000000	0.0000355	0.0000000	0.0000461	0.0000000	0.0000461	0.0000461
90	0.0000355	0.0000000	0.0000249	0.0000000	0.0000249	0.0000000	0.0000355	0.0000000	0.0000249	0.0000249

Tabela H.3. Média do número de moles de CO₂ produzido nos testes em meio líquido.

Amostra	IAT	Alcell	Comercial	Celulose	Sem Amostra
Dias	Moles de CO₂, média das duas amostras				
0	0.0000000	0.0000000	0.0000000	0.0000000	0.0000000
3	0.0000575	0.0000416	0.0000363	0.0000204	0.0000257
5	0.0000575	0.0000469	0.0000628	0.0000522	0.0000575
7	0.0000681	0.0000628	0.0000628	0.0000575	0.0000575
10	0.0000681	0.0000628	0.0000681	0.0000628	0.0000628
12	0.0000681	0.0000575	0.0000628	0.0000522	0.0000522
14	0.0000575	0.0000575	0.0000628	0.0000575	0.0000522
18	0.0000681	0.0000681	0.0000734	0.0000787	0.0000734
21	0.0000575	0.0000522	0.0000469	0.0000416	0.0000469
25	0.0000628	0.0000681	0.0000628	0.0000628	0.0000628
28	0.0000522	0.0000469	0.0000363	0.0000469	0.0000416
32	0.0000522	0.0000575	0.0000522	0.0000469	0.0000469
35	0.0000416	0.0000416	0.0000416	0.0000363	0.0000363
39	0.0000575	0.0000522	0.0000522	0.0000469	0.0000469
42	0.0000363	0.0000363	0.0000310	0.0000363	0.0000310
46	0.0000461	0.0000408	0.0000461	0.0000408	0.0000461
49	0.0000408	0.0000355	0.0000302	0.0000302	0.0000302
52	0.0000461	0.0000408	0.0000302	0.0000355	0.0000355
56	0.0000355	0.0000302	0.0000249	0.0000249	0.0000249
60	0.0000408	0.0000355	0.0000355	0.0000355	0.0000302
68	0.0000672 ^(b)	0.0000777 ^(b)	0.0000672 ^(b)	0.0000672 ^(b)	0.0000672 ^(b)
75	0.0000461 ^(b)	0.0000566 ^(b)	0.0000355 ^(b)	0.0000355 ^(b)	0.0000461 ^(b)
82	0.0000461 ^(b)	0.0000461 ^(b)	0.0000355 ^(b)	0.0000461 ^(b)	0.0000461 ^(b)
90	0.0000355 ^(b)	0.0000249 ^(b)	0.0000249 ^(b)	0.0000355 ^(b)	0.0000249 ^(b)

(b) apenas o valor de uma amostra foi contabilizado

Tabela H.4. Média do número de moles acumulado de CO₂ produzido nos testes em meio líquido.

Amostra	IAT	Alcell	Comercial	Celulose	Sem Amostra
Dias	Moles de CO₂, média das duas amostras acumulado				
0	0.0000000	0.0000000	0.0000000	0.0000000	0.0000000
3	0.0000575	0.0000416	0.0000363	0.0000204	0.0000257
5	0.0001150	0.0000885	0.0000991	0.0000726	0.0000832
7	0.0001831	0.0001513	0.0001619	0.0001301	0.0001407
10	0.0002512	0.0002141	0.0002300	0.0001929	0.0002035
12	0.0003193	0.0002716	0.0002928	0.0002451	0.0002557
14	0.0003768	0.0003291	0.0003556	0.0003026	0.0003079
18	0.0004449	0.0003972	0.0004290	0.0003813	0.0003813
21	0.0005024	0.0004494	0.0004759	0.0004229	0.0004282
25	0.0005652	0.0005175	0.0005387	0.0004857	0.0004910
28	0.0006174	0.0005644	0.0005750	0.0005326	0.0005326
32	0.0006696	0.0006219	0.0006272	0.0005795	0.0005795
35	0.0007112	0.0006635	0.0006688	0.0006158	0.0006158
39	0.0007687	0.0007157	0.0007210	0.0006627	0.0006627
42	0.0008050	0.0007520	0.0007520	0.0006990	0.0006937
46	0.0008511	0.0007928	0.0007981	0.0007398	0.0007398
49	0.0008918	0.0008283	0.0008283	0.0007700	0.0007700
52	0.0009379	0.0008691	0.0008585	0.0008055	0.0008055
56	0.0009734	0.0008993	0.0008835	0.0008305	0.0008304
60	0.0010142	0.0009348	0.0009190	0.0008660	0.0008607
68	0.0010813	0.0010125	0.0009861	0.0009331	0.0009278
75	0.0011274	0.0010691	0.0010216	0.0009686	0.0009739
82	0.0011734	0.0011151	0.0010571	0.0010147	0.0010199
90	0.0012089	0.0011401	0.0010821	0.0010502	0.0010449

Tabela H.5. Registo dos valores das titulações dos testes em meio líquido com diluição 1:1000.

Amostra	1 IAT	2 IAT	3 Alcell	4 Alcell	5 Comercial	6 Comercial	7 Celulose	8 Celulose
Dias	Volume de HCl gasto (L)							
0	0.0E+00	0.0E+00	0.0E+00	0.0E+00	0.0E+00	0.0E+00	0.0E+00	0.0E+00
3	9.0E-03	9.0E-03	8.9E-03	9.0E-03	9.1E-03	9.1E-03	9.0E-03	9.0E-03
5	9.2E-03	9.2E-03	9.3E-03	9.3E-03	9.3E-03	9.2E-03	9.3E-03	9.3E-03
7	9.2E-03	9.3E-03	9.2E-03	9.3E-03	9.2E-03	9.2E-03	9.2E-03	9.2E-03
10	9.1E-03	9.2E-03	9.2E-03	9.2E-03	9.2E-03	9.3E-03	9.3E-03	9.2E-03
12	9.3E-03	9.2E-03	9.3E-03	9.3E-03	9.3E-03	9.3E-03	9.3E-03	9.3E-03
14	9.3E-03	9.3E-03	9.2E-03	9.3E-03	9.3E-03	9.3E-03	9.3E-03	9.2E-03
18	9.2E-03	9.2E-03	9.2E-03	9.3E-03	9.2E-03	9.3E-03	9.3E-03	9.3E-03
21	9.2E-03	9.3E-03	9.2E-03	9.3E-03	9.3E-03	9.3E-03	9.3E-03	9.3E-03
25	9.3E-03	9.3E-03	9.3E-03	9.3E-03	9.3E-03	9.3E-03	9.3E-03	9.3E-03
33	9.2E-03	9.3E-03	9.2E-03	9.3E-03	9.3E-03	9.3E-03	9.3E-03	9.3E-03
40	9.2E-03	9.3E-03	9.3E-03	9.3E-03	9.3E-03	9.3E-03	9.3E-03	9.3E-03
47	9.3E-03	9.3E-03	9.3E-03	9.3E-03	9.3E-03	9.3E-03	9.3E-03	9.3E-03

Tabela H.6. Número de moles de CO₂ produzido nos testes em meio líquido com diluição 1:1000.

Amostra	1 IAT	2 IAT	3 Alcell	4 Alcell	5 Comercial	6 Comercial	7 Celulose	8 Celulose
Dias	Moles de CO2							
0	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000
3	0.000031	0.000031	0.000042	0.000031	0.000020	0.000020	0.000031	0.000031
5	0.000014	0.000014	0.000004	0.000004	0.000004	0.000014	0.000004	0.000004
7	0.000014	0.000004	0.000014	0.000004	0.000014	0.000014	0.000014	0.000014
10	0.000025	0.000014	0.000014	0.000014	0.000014	0.000004	0.000004	0.000014
12	0.000004	0.000014	0.000004	0.000004	0.000004	0.000004	0.000004	0.000004
14	0.000004	0.000004	0.000014	0.000004	0.000004	0.000004	0.000004	0.000014
18	0.000014	0.000014	0.000014	0.000004	0.000014	0.000004	0.000004	0.000004
21	0.000014	0.000004	0.000014	0.000004	0.000004	0.000004	0.000004	0.000004
25	0.000004	0.000004	0.000004	0.000004	0.000004	0.000004	0.000004	0.000004
33	0.000014	0.000004	0.000014	0.000004	0.000004	0.000004	0.000004	0.000004
40	0.000014	0.000004	0.000004	0.000004	0.000004	0.000004	0.000004	0.000004
47	0.000004	0.000004	0.000004	0.000004	0.000004	0.000004	0.000004	0.000004

Tabela H.7. Média do número de moles de CO₂ produzido nos testes em meio líquido com diluição 1:1000.

Amostra	IAT	Alcell	Comercial	Celulose
Dias	Moles de CO₂, média das duas amostras			
0	0.0000000	0.0000000	0.0000000	0.0000000
3	0.0000310	0.0000363	0.0000204	0.0000310
5	0.0000144	0.0000039	0.0000091	0.0000039
7	0.0000091	0.0000091	0.0000144	0.0000144
10	0.0000197	0.0000144	0.0000091	0.0000091
12	0.0000091	0.0000039	0.0000039	0.0000039
14	0.0000039	0.0000091	0.0000039	0.0000091
18	0.0000144	0.0000091	0.0000091	0.0000039
21	0.0000091	0.0000091	0.0000039	0.0000039
25	0.0000039	0.0000039	0.0000039	0.0000039
33	0.0000091	0.0000091	0.0000039	0.0000039
40	0.0000091	0.0000039	0.0000039	0.0000039
47	0.0000039	0.0000039	0.0000039	0.0000039

Tabela H.8. Média do número de moles acumulado de CO₂ produzido nos testes em meio líquido com diluição 1:1000.

Amostra	IAT	Alcell	Comercial	Celulose
Dias	Moles de CO₂, média das duas amostras acumulado			
0	0.0000000	0.0000000	0.0000000	0.0000000
3	0.0000310	0.0000363	0.0000204	0.0000310
5	0.0000454	0.0000402	0.0000295	0.0000349
7	0.0000545	0.0000493	0.0000439	0.0000493
10	0.0000742	0.0000637	0.0000531	0.0000584
12	0.0000833	0.0000675	0.0000569	0.0000622
14	0.0000872	0.0000767	0.0000608	0.0000714
18	0.0001016	0.0000858	0.0000699	0.0000752
21	0.0001107	0.0000949	0.0000737	0.0000791
25	0.0001146	0.0000988	0.0000776	0.0000829
33	0.0001237	0.0001079	0.0000814	0.0000868
40	0.0001328	0.0001117	0.0000853	0.0000906
47	0.0001367	0.0001156	0.0000891	0.0000945

Tabela H.9. Registo dos valores das titulações dos testes em meio sólido sem inóculo.

Amostra	1 IAT	2 IAT	3 Alcell	4 Alcell	5 Comercial	6 Comercial	7 Celulose	8 Celulose	9 Sem Amostra	10 Sem Amostra
Dias	Volume de HCl gasto (L)									
0	0.0E+00	0.0E+00	0.0E+00	0.0E+00	0.0E+00	0.0E+00	0.0E+00	0.0E+00	0.0E+00	0.0E+00
3	8.8E-03	8.7E-03	8.7E-03	8.7E-03	8.6E-03	8.6E-03	8.6E-03	8.6E-03	8.5E-03	8.5E-03
5	8.7E-03	8.7E-03	8.6E-03	8.7E-03	8.6E-03	8.5E-03	8.6E-03	8.5E-03	8.5E-03	8.5E-03
7	8.5E-03	8.4E-03	8.5E-03	8.5E-03	8.4E-03	8.5E-03	8.5E-03	8.4E-03	8.5E-03	8.5E-03
10	8.3E-03	8.2E-03	8.2E-03	8.3E-03	8.2E-03	8.2E-03	8.2E-03	8.2E-03	8.2E-03	8.2E-03
12	8.3E-03	8.3E-03	8.3E-03	8.3E-03	8.3E-03	8.3E-03	8.3E-03	8.3E-03	8.3E-03	8.3E-03
14	8.5E-03	8.5E-03	8.4E-03	8.4E-03	8.5E-03	8.5E-03	8.6E-03	8.6E-03	8.5E-03	8.5E-03
18	8.2E-03	8.2E-03	8.2E-03	8.2E-03	8.1E-03	8.2E-03	8.2E-03	8.1E-03	8.1E-03	8.1E-03
21	8.5E-03	8.6E-03	8.6E-03	8.7E-03	8.6E-03	8.6E-03	8.6E-03	8.6E-03	8.5E-03	8.6E-03
25	8.5E-03	8.4E-03	8.5E-03	8.5E-03	8.5E-03	8.4E-03	8.5E-03	8.4E-03	8.4E-03	8.4E-03
28	8.7E-03	8.7E-03	8.7E-03	8.7E-03	8.8E-03	8.8E-03	8.8E-03	8.7E-03	8.7E-03	8.7E-03
32	8.5E-03	8.6E-03	8.5E-03	8.6E-03	8.7E-03	8.6E-03	8.5E-03	8.6E-03	8.5E-03	8.6E-03
35	8.8E-03	8.7E-03	8.8E-03	8.7E-03	8.9E-03	8.8E-03	8.8E-03	8.8E-03	8.7E-03	8.7E-03
39	8.6E-03	8.6E-03	8.6E-03	8.6E-03	8.6E-03	8.6E-03	8.7E-03	8.6E-03	8.6E-03	8.6E-03
42	8.9E-03	8.8E-03	8.8E-03	8.9E-03	8.9E-03	9.0E-03	8.8E-03	8.9E-03	8.9E-03	8.9E-03
46	8.7E-03	8.7E-03	8.8E-03	8.8E-03	8.8E-03	8.9E-03	8.8E-03	8.7E-03	8.7E-03	8.7E-03
49	8.9E-03	8.9E-03	8.9E-03	8.9E-03	8.9E-03	8.9E-03	8.9E-03	9.0E-03	8.8E-03	8.9E-03
52	8.8E-03	8.8E-03	8.7E-03	8.8E-03	8.9E-03	8.9E-03	8.8E-03	8.9E-03	8.9E-03	8.8E-03
56	9.0E-03	9.0E-03	9.0E-03	9.1E-03	9.0E-03	9.1E-03	9.1E-03	9.0E-03	9.0E-03	9.1E-03
60	8.8E-03	8.9E-03	8.9E-03	8.8E-03	8.9E-03	8.9E-03	8.8E-03	8.9E-03	8.8E-03	8.8E-03
68	8.4E-03	(a)	8.4E-03	(a)	8.5E-03	(a)	8.5E-03	(a)	8.3E-03	8.4E-03
75	8.7E-03	(a)	8.7E-03	(a)	8.8E-03	(a)	8.7E-03	(a)	8.7E-03	8.7E-03
82	8.8E-03	(a)	8.8E-03	(a)	8.9E-03	(a)	8.8E-03	(a)	8.8E-03	8.7E-03
90	8.8E-03	(a)	8.8E-03	(a)	8.9E-03	(a)	8.9E-03	(a)	8.9E-03	8.8E-03

(a) valores não recolhidos

Tabela H.10. Número de moles de CO₂ produzido nos testes em meio sólido sem inóculo.

Amostra	1 IAT	2 IAT	3 Alcell	4 Alcell	5 Comercial	6 Comercial	7 Celulose	8 Celulose	9 Sem Amostra	10 Sem Amostra
Dias	Moles de CO2									
0	0.0000000	0.0000000	0.0000000	0.0000000	0.0000000	0.0000000	0.0000000	0.0000000	0.0000000	0.0000000
3	0.0000522	0.0000628	0.0000628	0.0000628	0.0000734	0.0000734	0.0000734	0.0000734	0.0000840	0.0000840
5	0.0000628	0.0000628	0.0000734	0.0000628	0.0000734	0.0000840	0.0000734	0.0000840	0.0000840	0.0000840
7	0.0000840	0.0000946	0.0000840	0.0000840	0.0000946	0.0000840	0.0000840	0.0000946	0.0000840	0.0000840
10	0.0001052	0.0001158	0.0001158	0.0001052	0.0001158	0.0001158	0.0001158	0.0001158	0.0001158	0.0001158
12	0.0001052	0.0001052	0.0001052	0.0001052	0.0001052	0.0001052	0.0001052	0.0001052	0.0001052	0.0001052
14	0.0000840	0.0000840	0.0000946	0.0000946	0.0000840	0.0000840	0.0000734	0.0000734	0.0000840	0.0000840
18	0.0001158	0.0001158	0.0001158	0.0001158	0.0001264	0.0001158	0.0001158	0.0001264	0.0001264	0.0001264
21	0.0000840	0.0000734	0.0000734	0.0000628	0.0000734	0.0000734	0.0000734	0.0000734	0.0000840	0.0000734
25	0.0000840	0.0000946	0.0000840	0.0000840	0.0000840	0.0000946	0.0000840	0.0000946	0.0000946	0.0000946
28	0.0000628	0.0000628	0.0000628	0.0000628	0.0000522	0.0000522	0.0000522	0.0000628	0.0000628	0.0000628
32	0.0000840	0.0000734	0.0000840	0.0000734	0.0000628	0.0000734	0.0000840	0.0000734	0.0000840	0.0000734
35	0.0000522	0.0000628	0.0000522	0.0000628	0.0000416	0.0000522	0.0000522	0.0000522	0.0000628	0.0000628
39	0.0000734	0.0000734	0.0000734	0.0000734	0.0000734	0.0000734	0.0000628	0.0000734	0.0000734	0.0000734
42	0.0000416	0.0000522	0.0000522	0.0000416	0.0000416	0.0000310	0.0000522	0.0000416	0.0000416	0.0000416
46	0.0000672	0.0000672	0.0000566	0.0000566	0.0000566	0.0000461	0.0000566	0.0000672	0.0000672	0.0000672
49	0.0000461	0.0000461	0.0000461	0.0000461	0.0000461	0.0000461	0.0000461	0.0000355	0.0000566	0.0000461
52	0.0000566	0.0000566	0.0000672	0.0000566	0.0000461	0.0000461	0.0000566	0.0000461	0.0000461	0.0000566
56	0.0000355	0.0000355	0.0000355	0.0000249	0.0000355	0.0000249	0.0000249	0.0000355	0.0000355	0.0000249
60	0.0000566	0.0000461	0.0000461	0.0000566	0.0000461	0.0000461	0.0000566	0.0000461	0.0000566	0.0000566
68	0.0000988	0.0000000	0.0000988	0.0000000	0.0000882	0.0000000	0.0000882	0.0000000	0.0001094	0.0000988
75	0.0000672	0.0000000	0.0000672	0.0000000	0.0000566	0.0000000	0.0000672	0.0000000	0.0000672	0.0000672
82	0.0000566	0.0000000	0.0000566	0.0000000	0.0000461	0.0000000	0.0000566	0.0000000	0.0000566	0.0000672
90	0.0000566	0.0000000	0.0000566	0.0000000	0.0000461	0.0000000	0.0000461	0.0000000	0.0000461	0.0000566

Tabela H.11. Média do número de moles de CO₂ produzido nos testes em meio sólido sem inóculo.

Amostra	IAT	Alcell	Comercial	Celulose	Sem Amostra
Dias	Moles de CO₂, média das duas amostras				
0	0.0000000	0.0000000	0.0000000	0.0000000	0.0000000
3	0.0000575	0.0000628	0.0000734	0.0000734	0.0000840
5	0.0000628	0.0000681	0.0000787	0.0000787	0.0000840
7	0.0000893	0.0000840	0.0000893	0.0000893	0.0000840
10	0.0001105	0.0001105	0.0001158	0.0001158	0.0001158
12	0.0001052	0.0001052	0.0001052	0.0001052	0.0001052
14	0.0000840	0.0000946	0.0000840	0.0000734	0.0000840
18	0.0001158	0.0001158	0.0001211	0.0001211	0.0001264
21	0.0000787	0.0000681	0.0000734	0.0000734	0.0000787
25	0.0000893	0.0000840	0.0000893	0.0000893	0.0000946
28	0.0000628	0.0000628	0.0000522	0.0000575	0.0000628
32	0.0000787	0.0000787	0.0000681	0.0000787	0.0000787
35	0.0000575	0.0000575	0.0000469	0.0000522	0.0000628
39	0.0000734	0.0000734	0.0000734	0.0000681	0.0000734
42	0.0000469	0.0000469	0.0000363	0.0000469	0.0000416
46	0.0000672	0.0000566	0.0000513	0.0000619	0.0000672
49	0.0000461	0.0000461	0.0000461	0.0000408	0.0000513
52	0.0000566	0.0000619	0.0000461	0.0000513	0.0000513
56	0.0000355	0.0000302	0.0000302	0.0000302	0.0000302
60	0.0000513	0.0000513	0.0000461	0.0000513	0.0000566
68	0.0000988 ^(b)	0.0000988 ^(b)	0.0000882 ^(b)	0.0000882 ^(b)	0.0001041 ^(b)
75	0.0000672 ^(b)	0.0000672 ^(b)	0.0000566 ^(b)	0.0000672 ^(b)	0.0000672 ^(b)
82	0.0000566 ^(b)	0.0000566 ^(b)	0.0000461 ^(b)	0.0000566 ^(b)	0.0000619 ^(b)
90	0.0000566 ^(b)	0.0000566 ^(b)	0.0000461 ^(b)	0.0000461 ^(b)	0.0000513 ^(b)

(b) apenas o valor de uma amostra foi contabilizado

Tabela H.12. Média do número de moles acumulado de CO₂ produzido nos testes em meio sólido sem inóculo.

Amostra	IAT	Alcell	Comercial	Celulose	Sem Amostra
Dias	Moles de CO₂, média das duas amostras acumulado				
0	0.0000000	0.0000000	0.0000000	0.0000000	0.0000000
3	0.0000575	0.0000628	0.0000734	0.0000734	0.0000840
5	0.0001203	0.0001309	0.0001521	0.0001521	0.0001680
7	0.0002096	0.0002149	0.0002414	0.0002414	0.0002520
10	0.0003201	0.0003254	0.0003572	0.0003572	0.0003678
12	0.0004253	0.0004306	0.0004624	0.0004624	0.0004730
14	0.0005093	0.0005252	0.0005464	0.0005358	0.0005570
18	0.0006251	0.0006410	0.0006675	0.0006569	0.0006834
21	0.0007038	0.0007091	0.0007409	0.0007303	0.0007621
25	0.0007931	0.0007931	0.0008302	0.0008196	0.0008567
28	0.0008559	0.0008559	0.0008824	0.0008771	0.0009195
32	0.0009346	0.0009346	0.0009505	0.0009558	0.0009982
35	0.0009921	0.0009921	0.0009974	0.0010080	0.0010610
39	0.0010655	0.0010655	0.0010708	0.0010761	0.0011344
42	0.0011124	0.0011124	0.0011071	0.0011230	0.0011760
46	0.0011796	0.0011690	0.0011584	0.0011849	0.0012432
49	0.0012256	0.0012151	0.0012045	0.0012257	0.0012945
52	0.0012822	0.0012769	0.0012505	0.0012770	0.0013458
56	0.0013177	0.0013072	0.0012808	0.0013072	0.0013760
60	0.0013690	0.0013585	0.0013268	0.0013585	0.0014326
68	0.0014678	0.0014573	0.0014151	0.0014468	0.0015367
75	0.0015350	0.0015244	0.0014717	0.0015139	0.0016039
82	0.0015916	0.0015810	0.0015177	0.0015705	0.0016657
90	0.0016482	0.0016376	0.0015638	0.0016166	0.0017171

Tabela H.13. Registo dos valores das titulações dos testes em meio sólido com inóculo.

Amostra	1 IAT	2 IAT	3 Alcell	4 Alcell	5 Comercial	6 Comercial	7 Celulose	8 Celulose	9 Sem Amostra	10 Sem Amostra
Dias	Volume de HCl gasto (L)									
0	0.0E+00	0.0E+00	0.0E+00	0.0E+00	0.0E+00	0.0E+00	0.0E+00	0.0E+00	0.0E+00	0.0E+00
3	8.4E-03	8.5E-03	8.5E-03	8.4E-03	8.6E-03	8.6E-03	8.4E-03	8.4E-03	8.5E-03	8.5E-03
5	8.4E-03	8.4E-03	8.4E-03	8.3E-03	8.5E-03	8.4E-03	8.4E-03	8.3E-03	8.4E-03	8.5E-03
7	8.4E-03	8.4E-03	8.4E-03	8.3E-03	8.4E-03	8.4E-03	8.4E-03	8.3E-03	8.4E-03	8.4E-03
10	8.1E-03	8.1E-03	8.1E-03	8.1E-03	8.1E-03	8.1E-03	8.0E-03	8.0E-03	8.0E-03	8.1E-03
12	8.2E-03	8.2E-03	8.2E-03	8.1E-03	8.2E-03	8.2E-03	8.2E-03	8.2E-03	8.2E-03	8.3E-03
14	8.4E-03	8.5E-03	8.4E-03	8.4E-03	8.5E-03	8.5E-03	8.4E-03	8.4E-03	8.5E-03	8.4E-03
18	8.1E-03	8.1E-03	8.1E-03	8.1E-03	8.2E-03	8.1E-03	8.2E-03	8.2E-03	8.1E-03	8.2E-03
21	8.5E-03	8.5E-03	8.5E-03	8.5E-03	8.6E-03	8.6E-03	8.5E-03	8.5E-03	8.5E-03	8.5E-03
25	8.4E-03	8.3E-03	8.4E-03	8.4E-03	8.4E-03	8.4E-03	8.4E-03	8.4E-03	8.3E-03	8.4E-03
28	8.6E-03	8.6E-03	8.7E-03	8.7E-03	8.7E-03	8.6E-03	8.7E-03	8.7E-03	8.7E-03	8.8E-03
32	8.4E-03	8.5E-03	8.5E-03	8.5E-03	8.6E-03	8.5E-03	8.5E-03	8.5E-03	8.5E-03	8.5E-03
35	8.8E-03	8.7E-03	8.7E-03	8.7E-03	8.8E-03	8.8E-03	8.7E-03	8.7E-03	8.8E-03	8.8E-03
39	8.6E-03	8.6E-03	8.6E-03	8.6E-03	8.6E-03	8.5E-03	8.5E-03	8.6E-03	8.6E-03	8.6E-03
42	8.7E-03	8.8E-03	8.8E-03	8.8E-03	8.8E-03	8.9E-03	8.8E-03	8.8E-03	8.8E-03	8.8E-03
46	8.6E-03	8.7E-03	8.7E-03	8.6E-03	8.7E-03	8.7E-03	8.7E-03	8.7E-03	8.7E-03	8.7E-03
49	8.7E-03	8.8E-03	8.8E-03	8.8E-03	8.9E-03	8.8E-03	8.8E-03	8.8E-03	8.8E-03	8.9E-03
52	8.6E-03	8.7E-03	8.6E-03	8.7E-03	8.7E-03	8.7E-03	8.7E-03	8.6E-03	8.7E-03	8.7E-03
56	8.8E-03	8.9E-03	8.9E-03	8.9E-03	9.0E-03	8.9E-03	8.9E-03	9.0E-03	9.0E-03	9.0E-03
60	8.8E-03	8.8E-03	8.8E-03	8.8E-03	8.8E-03	8.9E-03	8.8E-03	8.8E-03	8.8E-03	8.9E-03
68	8.3E-03	(a)	8.3E-03	(a)	8.4E-03	(a)	8.3E-03	(a)	8.5E-03	8.4E-03
75	8.6E-03	(a)	8.7E-03	(a)	8.7E-03	(a)	8.7E-03	(a)	8.6E-03	8.7E-03
82	8.7E-03	(a)	8.8E-03	(a)	8.9E-03	(a)	8.8E-03	(a)	8.7E-03	8.8E-03
90	8.7E-03	(a)	8.7E-03	(a)	8.8E-03	(a)	8.8E-03	(a)	8.8E-03	8.8E-03

(a) valores não recolhidos

Tabela H.14. Número de moles de CO₂ produzido nos testes em meio sólido com inóculo.

Amostra	1 IAT	2 IAT	3 Alcell	4 Alcell	5 Comercial	6 Comercial	7 Celulose	8 Celulose	9 Sem Amostra	10 Sem Amostra
Dias	Moles de CO2									
0	0.0000000	0.0000000	0.0000000	0.0000000	0.0000000	0.0000000	0.0000000	0.0000000	0.0000000	0.0000000
3	0.0000946	0.0000840	0.0000840	0.0000946	0.0000734	0.0000734	0.0000946	0.0000946	0.0000840	0.0000840
5	0.0000946	0.0000946	0.0000946	0.0001052	0.0000840	0.0000946	0.0000946	0.0001052	0.0000946	0.0000840
7	0.0000946	0.0000946	0.0000946	0.0001052	0.0000946	0.0000946	0.0000946	0.0001052	0.0000946	0.0000946
10	0.0001264	0.0001264	0.0001264	0.0001264	0.0001264	0.0001264	0.0001370	0.0001370	0.0001370	0.0001264
12	0.0001158	0.0001158	0.0001158	0.0001264	0.0001158	0.0001158	0.0001158	0.0001158	0.0001158	0.0001052
14	0.0000946	0.0000840	0.0000946	0.0000946	0.0000840	0.0000840	0.0000946	0.0000946	0.0000840	0.0000946
18	0.0001264	0.0001264	0.0001264	0.0001264	0.0001158	0.0001264	0.0001158	0.0001158	0.0001264	0.0001158
21	0.0000840	0.0000840	0.0000840	0.0000840	0.0000734	0.0000734	0.0000840	0.0000840	0.0000840	0.0000840
25	0.0000946	0.0001052	0.0000946	0.0000946	0.0000946	0.0000946	0.0000946	0.0000946	0.0001052	0.0000946
28	0.0000734	0.0000734	0.0000628	0.0000628	0.0000628	0.0000734	0.0000628	0.0000628	0.0000628	0.0000522
32	0.0000946	0.0000840	0.0000840	0.0000840	0.0000734	0.0000840	0.0000840	0.0000840	0.0000840	0.0000840
35	0.0000522	0.0000628	0.0000628	0.0000628	0.0000522	0.0000522	0.0000628	0.0000628	0.0000522	0.0000522
39	0.0000734	0.0000734	0.0000734	0.0000734	0.0000734	0.0000840	0.0000840	0.0000734	0.0000734	0.0000734
42	0.0000628	0.0000522	0.0000522	0.0000522	0.0000522	0.0000416	0.0000522	0.0000522	0.0000522	0.0000522
46	0.0000777	0.0000672	0.0000672	0.0000777	0.0000672	0.0000672	0.0000672	0.0000672	0.0000672	0.0000672
49	0.0000672	0.0000566	0.0000566	0.0000566	0.0000461	0.0000566	0.0000566	0.0000566	0.0000566	0.0000461
52	0.0000777	0.0000672	0.0000777	0.0000672	0.0000672	0.0000672	0.0000672	0.0000777	0.0000672	0.0000672
56	0.0000566	0.0000461	0.0000461	0.0000461	0.0000355	0.0000461	0.0000461	0.0000355	0.0000355	0.0000355
60	0.0000566	0.0000566	0.0000566	0.0000566	0.0000566	0.0000461	0.0000566	0.0000566	0.0000566	0.0000461
68	0.0001094	0.0000000	0.0001094	0.0000000	0.0000988	0.0000000	0.0001094	0.0000000	0.0000882	0.0000988
75	0.0000777	0.0000000	0.0000672	0.0000000	0.0000672	0.0000000	0.0000672	0.0000000	0.0000777	0.0000672
82	0.0000672	0.0000000	0.0000566	0.0000000	0.0000461	0.0000000	0.0000566	0.0000000	0.0000672	0.0000566
90	0.0000672	0.0000000	0.0000672	0.0000000	0.0000566	0.0000000	0.0000566	0.0000000	0.0000566	0.0000566

Tabela H.15. Média do número de moles de CO₂ produzido nos testes em meio sólido com inóculo.

Amostra	IAT	Alcell	Comercial	Celulose	Sem Amostra
Dias	Moles de CO₂, média das duas amostras				
0	0.0000000	0.0000000	0.0000000	0.0000000	0.0000000
3	0.0000893	0.0000893	0.0000734	0.0000946	0.0000840
5	0.0000946	0.0000999	0.0000893	0.0000999	0.0000893
7	0.0000946	0.0000999	0.0000946	0.0000999	0.0000946
10	0.0001264	0.0001264	0.0001264	0.0001370	0.0001317
12	0.0001158	0.0001211	0.0001158	0.0001158	0.0001105
14	0.0000893	0.0000946	0.0000840	0.0000946	0.0000893
18	0.0001264	0.0001264	0.0001211	0.0001158	0.0001211
21	0.0000840	0.0000840	0.0000734	0.0000840	0.0000840
25	0.0000999	0.0000946	0.0000946	0.0000946	0.0000999
28	0.0000734	0.0000628	0.0000681	0.0000628	0.0000575
32	0.0000893	0.0000840	0.0000787	0.0000840	0.0000840
35	0.0000575	0.0000628	0.0000522	0.0000628	0.0000522
39	0.0000734	0.0000734	0.0000787	0.0000787	0.0000734
42	0.0000575	0.0000522	0.0000469	0.0000522	0.0000522
46	0.0000724	0.0000724	0.0000672	0.0000672	0.0000672
49	0.0000619	0.0000566	0.0000513	0.0000566	0.0000513
52	0.0000724	0.0000724	0.0000672	0.0000724	0.0000672
56	0.0000513	0.0000461	0.0000408	0.0000408	0.0000355
60	0.0000566	0.0000566	0.0000513	0.0000566	0.0000513
68	0.0001094 ^(b)	0.0001094 ^(b)	0.0000988 ^(b)	0.0001094 ^(b)	0.0000935 ^(b)
75	0.0000777 ^(b)	0.0000672 ^(b)	0.0000672 ^(b)	0.0000672 ^(b)	0.0000724 ^(b)
82	0.0000672 ^(b)	0.0000566 ^(b)	0.0000461 ^(b)	0.0000566 ^(b)	0.0000619 ^(b)
90	0.0000672 ^(b)	0.0000672 ^(b)	0.0000566 ^(b)	0.0000566 ^(b)	0.0000566 ^(b)

(b) apenas o valor de uma amostra foi contabilizado

Tabela H.16. Média do número de moles acumulado de CO₂ produzido nos testes em meio sólido com inóculo.

Amostra	IAT	Alcell	Comercial	Celulose	Sem Amostra
Dias	Moles de CO₂, média das duas amostras acumulado				
0	0.0000000	0.0000000	0.0000000	0.0000000	0.0000000
3	0.0000893	0.0000893	0.0000734	0.0000946	0.0000840
5	0.0001839	0.0001892	0.0001627	0.0001945	0.0001733
7	0.0002785	0.0002891	0.0002573	0.0002944	0.0002679
10	0.0004049	0.0004155	0.0003837	0.0004314	0.0003996
12	0.0005207	0.0005366	0.0004995	0.0005472	0.0005101
14	0.0006100	0.0006312	0.0005835	0.0006418	0.0005994
18	0.0007364	0.0007576	0.0007046	0.0007576	0.0007205
21	0.0008204	0.0008416	0.0007780	0.0008416	0.0008045
25	0.0009203	0.0009362	0.0008726	0.0009362	0.0009044
28	0.0009937	0.0009990	0.0009407	0.0009990	0.0009619
32	0.0010830	0.0010830	0.0010194	0.0010830	0.0010459
35	0.0011405	0.0011458	0.0010716	0.0011458	0.0010981
39	0.0012139	0.0012192	0.0011503	0.0012245	0.0011715
42	0.0012714	0.0012714	0.0011972	0.0012767	0.0012237
46	0.0013438	0.0013438	0.0012644	0.0013439	0.0012909
49	0.0014057	0.0014004	0.0013157	0.0014005	0.0013422
52	0.0014781	0.0014729	0.0013828	0.0014729	0.0014093
56	0.0015295	0.0015189	0.0014236	0.0015137	0.0014448
60	0.0015861	0.0015755	0.0014749	0.0015703	0.0014962
68	0.0016954	0.0016849	0.0015737	0.0016796	0.0015897
75	0.0017731	0.0017520	0.0016409	0.0017468	0.0016621
82	0.0018403	0.0018086	0.0016869	0.0018034	0.0017240
90	0.0019074	0.0018758	0.0017435	0.0018600	0.0017806