

Recomendações para Determinação da Biodegradabilidade Aeróbia Usando um Respirômetro Automatizado

Renato Carrhá Leitão¹
Ana Iraidy Santa Brígida²
Sandra Tédde Santaella³
Morsyleide de Freitas Rosa⁴
Gustavo Adolfo Saavedra Pinto⁵

Introdução

As atividades industriais, bem como as domésticas, geram resíduos sólidos que, caso não sejam reaproveitados, têm aterros e lixões como disposição final. A degradação desses resíduos sólidos e o tempo que isso leva a ocorrer dependerão de ações naturais como degradação por raios ultravioletas, aquecimento, reações oxidativas e biodegradação, sendo o papel desta última de extrema importância. Quanto mais biodegradável for um dado material, menor o tempo necessário para a sua decomposição e maior a perspectiva de “vida” do aterro ou lixão no qual ele está depositado (MELLO et al., 2007).

Dentre os resíduos sólidos gerados a partir de atividades industriais e domésticas, destacam-se os

plásticos. De 1940 até hoje, os materiais plásticos mais utilizados são derivados do petróleo. Além de serem provenientes de uma fonte não renovável, muitos perduram na natureza, em média, mais de 200 anos até a sua completa degradação. Nesse sentido, estudos que visam à elaboração de materiais com maior biodegradabilidade têm sido intensamente realizados buscando fornecer alternativas para um mercado sólido e crescente. Diversos métodos têm sido utilizados para avaliar a biodegradabilidade desses materiais: medição do consumo de O₂, teste enzimático, determinação da perda de massa e medição da produção de CO₂ (AMBRÓSIO et al., 2011).

Atualmente, o monitoramento de CO₂ pelo teste de Sturm é o método mais aceito para avaliação da biodegradabilidade de polímeros; porém, a

¹Engenheiro civil, doutor em Ciências Ambientais, pesquisador da Embrapa Agroindústria Tropical, Fortaleza, CE, renato.leitao@embrapa.br

²Engenheira química, doutora em Tecnologia em Processos Químicos e Bioquímicos, pós-doutoranda na Embrapa Agroindústria Tropical, Fortaleza, CE, ana-iraidy@hotmail.com

³Química, doutora em Hidráulica e Saneamento, professora associada da Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, CE, sandra@ufc.br

⁴Engenheira química, doutora em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, pesquisadora da Embrapa Agroindústria Tropical, Fortaleza, CE, morsyleide.rosa@embrapa.br

⁵Químico, doutor em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, pesquisador da Embrapa Agroindústria Tropical, Fortaleza, CE, gustavo.saavedra@embrapa.br

necessidade de um espaço relativamente grande e o tempo consumido para as determinações de CO_2 limitam bastante a técnica (AMBRÓSIO et al., 2011). No Brasil, o método padronizado pela norma brasileira NBR 14283 para estudos de biodegradação de poluentes e resíduos no solo é o respirométrico de Bartha (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS, 1999). Recentemente, alguns grupos de pesquisa estão utilizando esse método para avaliar a biodegradabilidade de materiais poliméricos (AMBRÓSIO et al., 2011). Contudo, como a quantificação do CO_2 emitido no respirômetro de Bartha é realizada por método titulométrico, muitos erros analíticos ainda são inseridos.

Algumas empresas internacionais estão desenvolvendo respirômetros automatizados, interligados a sensores de oxigênio e dióxido de carbono. Entre elas, podem ser citadas: Loligo Systems, Challenge Technology, RSA e, recentemente, a Columbus Instruments. Esta última desenvolveu o Micro-Oxymax Respirometer System, que tem sido aplicado em ensaios de biodegradabilidade aeróbia e anaeróbia de novos materiais (IMAN; GORDON, 2002; ROSA et al., 2009; PETROVIC et al., 2010; VARGAS et al., 2012; CAMPOS et al., 2012). Entretanto, variáveis como temperatura ambiente, sensibilidade dos sensores de gases, tipo de amostra a ser analisada e, principalmente, o tipo de inóculo podem interferir no desempenho do sistema.

Este trabalho visa apresentar adaptações à metodologia ISO ASTM D5988-12 *Standard Test*

Method for Determining Aerobic Biodegradation of Plastic Materials in Soil (ASTM, 2012) para ensaios de biodegradabilidade aeróbia de materiais, de forma a compatibilizá-la com as condições operacionais do Respirômetro Micro-Oxymax, produzido pela Columbus Instruments.

Parâmetros que Afetam o Teste de Respirometria Utilizando o Respirômetro Micro-Oxymax

O Respirômetro Micro-Oxymax (Figura 1), quando usado para ensaios de biodegradabilidade aeróbia, utiliza um método de monitoramento do CO_2 produzido baseado na medição da variação de pressão e da concentração de CO_2 nos frascos de reação.

Durante o ensaio de biodegradabilidade aeróbia usando o respirômetro Micro-Oxymax, alguns parâmetros devem ser considerados:

- **Faixa de sensibilidade do sensor de CO_2** – O respirômetro está equipado com um detector infravermelho não dispersivo para determinação de dióxido de carbono. Esse sensor pode determinar concentração de CO_2 na faixa de 0,0% a 1,0%. Se o sistema em estudo produzir uma concentração de CO_2 maior que 1%, promoverá uma leitura subestimada do acúmulo de CO_2 e, consecutivamente, da biodegradabilidade. Caso isso ocorra, o sistema deve ser reajustado quanto à massa de substrato ou volume do frasco para que a concentração de CO_2 seja sempre menor que 1%.

Foto: Renato Carrá Leitão

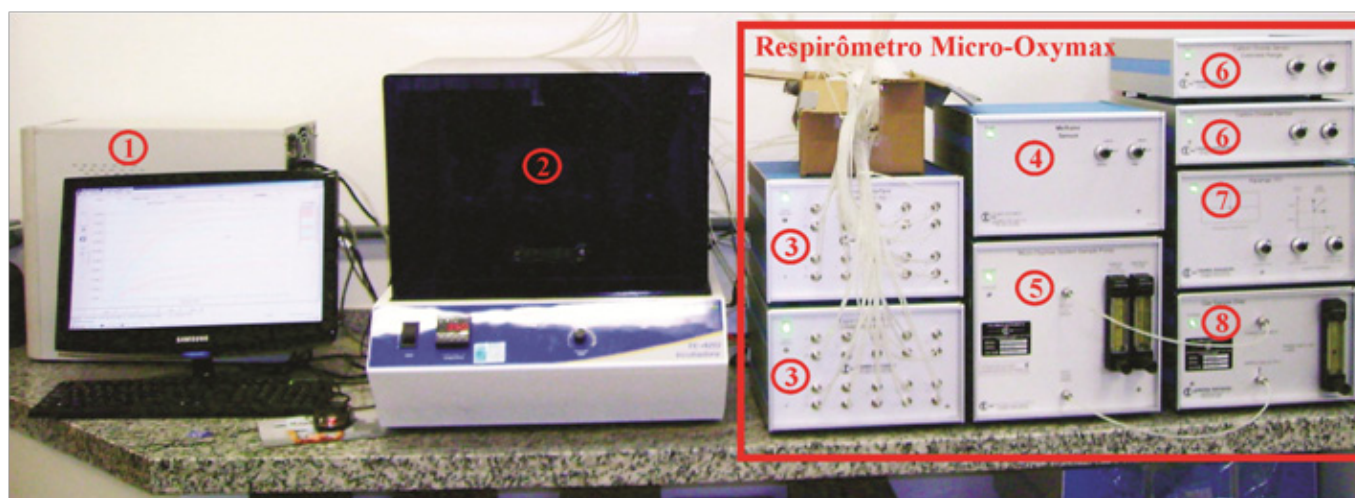


Figura 1. Respirômetro Micro-Oxymax adaptado para os ensaios de biodegradabilidade. (1) Computador, (2) incubadora, (3) módulos de portas de entrada para conexão com os frascos de reação, (4) sensor de metano, (5) sistema de bombeamento das amostras, (6) sensor de CO_2 , (7) Sensor de O_2 , (8) desumidificador de amostras gasosas.

- **Volume do frasco de reação** – O gás produzido durante o intervalo entre amostragens fica diluído no volume do frasco de reação até que o respirômetro efetue a troca da atmosfera do frasco. Assim, quanto maior o volume, maior a diluição do gás.
- **Tempo para análise** – O tempo mínimo para cada amostragem e determinações de pressão e concentração de CO₂ em cada frasco é de 6 minutos.
- **Taxa de produção específica de CO₂** – Durante a degradação biológica do substrato, os microrganismos presentes no inóculo produzirão CO₂ a uma taxa que pode variar dependendo do tipo de inóculo, estado de preservação, tipo de substrato, etc.
- **Inóculo** – O tipo de inóculo utilizado irá interferir diretamente na capacidade de biodegradabilidade do sistema. As condições de armazenamento e a idade do inóculo são outros fatores que interferem na biodegradabilidade. Logo, devem sempre ser utilizados inóculos novos e bem conservados.
- **Massa inicial da mistura de inóculo com substrato** – A massa de inóculo e substrato afetará diretamente a quantidade de CO₂ produzida por intervalo de tempo. Deve-se considerar também a proporção usada entre inóculo e substrato.
- **Umidade da mistura de inóculo com substrato** – A umidade deve ser mantida entre 50% e 70% para que a biodegradação ocorra sem problemas (INBAR et al., 1988; BANDEIRA, 2010; LEEJARKPAI et al., 2011). Durante os ensaios, que podem durar até vários meses, ocorre a perda de umidade da amostra, devido à temperatura (em geral 30 °C) e ao processo de reaeração dos frascos ao longo do teste. Essa troca da atmosfera é promovida automaticamente pelo respirômetro de forma a manter a concentração de O₂ em níveis próximos ao normal (20,9%) e a concentração de CO₂ abaixo do limite do sensor. Existem alguns métodos para repor essa umidade: a) módulo condensador; b) utilização de um frasco intermediário com água para que o ar da reaeração fique saturado; c) aspersão periódica de água diretamente dentro dos frascos.

O respirômetro faz a medição de pressão e coleta de amostra, para determinação de CO₂, de forma sequencial e cíclica. Isso significa que o primeiro

frasco somente será monitorado novamente após todos os outros terem sido. Consequentemente, se a taxa de produção de CO₂ for suficientemente elevada, a concentração de CO₂ no frasco poderá ultrapassar o limite de detecção do sensor, sem que haja tempo de o respirômetro efetuar a troca de atmosfera no frasco. Com isso, pode-se inferir que haverá um número máximo de frascos em cada ensaio, que pode ser calculado pela Equação 1.

$$N_f = \frac{\%CO_2 \times V_f \times 60}{t \times r_{CO_2} \times M_x} \quad (\text{Equação 1})$$

Em que:

N_f é o número máximo de frascos em um ensaio de biodegradabilidade aeróbia.

$\%CO_2$ é a concentração máxima operacional do sensor (%).

V_f é o volume útil do frasco, descontado o volume da amostra (mL).

t é o tempo necessário para coleta da amostra e determinação da pressão e concentração de CO₂ (min).

r_{CO_2} é a taxa de produção específica de CO₂ que deve ser determinada para cada inóculo e substrato em ensaios preliminares (mL CO₂/g.d).

M_x é a massa de lodo a ser usada no ensaio (g).

Recomendações para o Teste de Biodegradabilidade Aeróbia Usando o Respirômetro Micro-Oxymax

As recomendações que seguem foram resultado da observação de ensaios de biodegradabilidade aeróbia, utilizando uma metodologia adaptada de ISO ASTM D5988-12 *Standard Test Method for Determining Aerobic Biodegradation of Plastic Materials in Soil* (ASTM, 2012; IMAN; GORDON, 2002; PETROVIC et al., 2010; VARGAS et al., 2012; CAMPOS et al., 2012). Os testes foram realizados com amido de milho comercial (maisena), produzido pela Refinações de Milho Brasil Ltda., em triplicata, em temperatura ambiente (30 °C).

Preparo do inóculo

Para obtenção de um inóculo padrão, pode-se misturar composto orgânico e húmus de minhoca comercial na proporção 1:1 em massa seca. O composto orgânico deve ser preparado previamente a partir da mistura de esterco bovino e matéria orgânica (ex.: bagaço de cana-de-açúcar) na proporção 1:2. Deve-se usar composto orgânico e húmus preparados há menos de um mês, para preservar a atividade metabólica dos microrganismos. A umidade deve ser corrigida para valores entre 60% e 70%.

Ensaio de biodegradabilidade aeróbia

Para os ensaios de biodegradabilidade, o substrato deve ser misturado ao inóculo padrão na proporção de 1:100 (m/m), e a mistura, inserida em frascos de vidro borossilicato de 330 mL, cujas tampas contêm saídas para monitoramento dos gases e trocas de atmosferas. Os frascos devem ser conectados ao respirômetro em circuito fechado. A fim de acompanhar a biodegradação, a concentração de CO_2 em cada frasco deve ser monitorada no menor intervalo de tempo possível (ver Equação 1). O teor de umidade da mistura de inóculo com substrato deve ser determinado a cada 7 dias. O software de controle do respirômetro calcula o volume acumulado de CO_2 em cada frasco baseando-se na concentração de CO_2 , na variação da pressão e no volume do espaço livre nos frascos durante o processo de biodegradação.

Cada teste deve ser acompanhado por frascos-controle em triplicata, no qual se monitorou o acúmulo de CO_2 em sistema contendo apenas o inóculo padrão (sem o substrato).

Massa inicial da mistura de inóculo com substrato

A massa inicial da mistura de inóculo com substrato é um fator importante que influencia: a) a transferência de gases entre a mistura de inóculo/substrato e o ar contido no sistema fechado em estudo; b) a umidade final da mistura; c) a concentração final dos gases a cada ciclo de leitura. A Figura 2 apresenta o efeito da massa da mistura sobre o teor de umidade, aos 7 dias de ensaio de biodegradabilidade aeróbia de amido de milho. Observa-se que a perda de umidade ocorre em todos os sistemas, embora seja menor para aqueles com massa igual 20 g.

O efeito da massa da mistura de inóculo com substrato na concentração de CO_2 ao longo do ensaio é ilustrado na Figura 3. Observa-se que os frascos contendo 20 g e 10 g da mistura de inóculo/substrato produziram volumes de CO_2 suficientes para fazer com que as concentrações nas suas atmosferas ultrapassassem os limites do detector (1,0%). Esse fenômeno ocorreu durante várias horas e em mais de um ponto de amostragem. Isso indica que essas massas não são adequadas, ocasionando erros, subestimando o acúmulo de CO_2 .

Para substratos facilmente biodegradáveis, recomenda-se o valor de 5 g para a massa da mistura de inóculo com substrato que será introduzida nos frascos. No entanto, indica-se a realização de ensaios preliminares, de curta duração, para avaliar se a taxa de produção de CO_2 está adequada ao sensor do respirômetro.

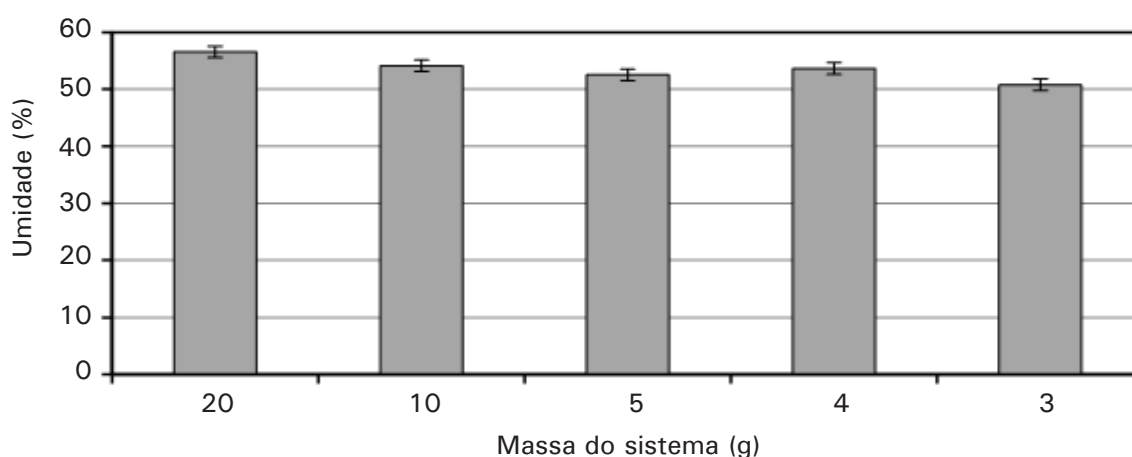


Figura 2. Efeito da massa da mistura de inóculo com substrato no teor de umidade final após 7 dias de ensaio de biodegradabilidade aeróbia.

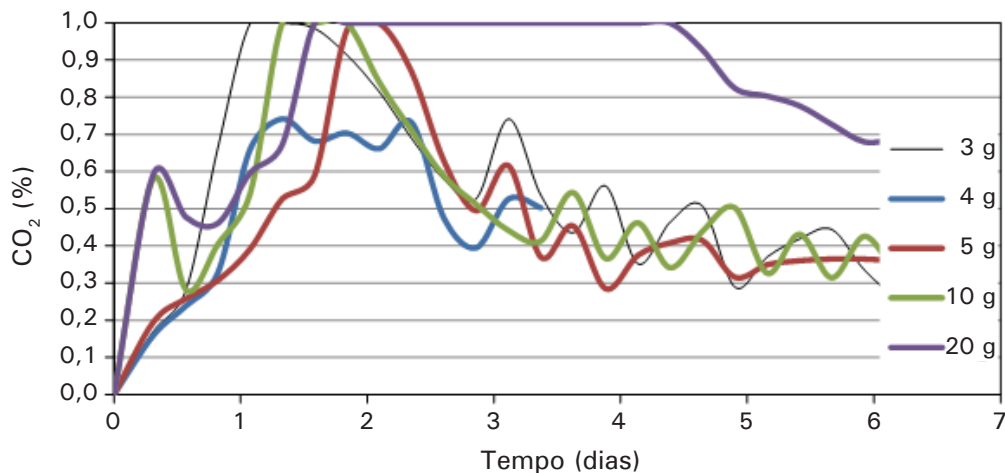


Figura 3. Efeito da massa da mistura de inóculo com substrato na concentração de CO₂ durante o teste de biodegradabilidade aeróbia.

Controle da umidade

A preservação do teor de umidade em sistemas bioativos é fundamental para manter um desempenho constante da atividade da biota. Assim, caso o teste tenha duração superior a um mês, devido à perda de umidade no sistema durante o ensaio de biodegradabilidade, pode haver necessidade de reposição de água no sistema.

Foram testadas duas formas de reposição: aspersão direta de água e uso de frasco intermediário com água. Entretanto, apenas a primeira foi efetiva no controle de umidade. Nesse caso, os frascos devem ser abertos semanalmente, e a mistura de inóculo com substrato deve ser umidificada com um borrifador manual, usando 0,5 mL de água destilada. Os frascos devem ser novamente fechados e reconectados ao respirômetro.

Número de frascos

Deve-se manter o ciclo de amostragem o mais curto possível. Como cada amostragem dura 6 minutos, quanto menor o número de frascos, menor o tempo do ciclo total de amostragem. O número máximo de frascos pode ser calculado pela Equação 1, que é função da taxa de produção específica de CO₂ (r_{CO_2}), a qual deve ser determinada para cada inóculo e substrato em ensaios preliminares de curta duração.

Observação geral: Todos os ensaios foram realizados utilizando um substrato facilmente biodegradável (amido). Como cada substrato tem

suas características intrínsecas que afetam a biodegradabilidade e, conseqüentemente, a taxa de produção específica de CO₂, testes preliminares usando o método adaptado descrito neste trabalho, com duração de poucos dias, devem ser executados antes de iniciar um teste completo de biodegradabilidade com duração de 30 dias. Com isso, pode-se verificar se ocorrerá grande produção de CO₂, ultrapassando o limite do sensor. Nesse caso deve-se reiniciar os testes utilizando massas menores da mistura de inóculo com substrato.

Agradecimentos

Os autores agradecem o apoio financeiro da Embrapa, Edital 01/2009 PAC-Embrapa – Macroprograma 2, e ao CNPq, pela bolsa de Pós-Doutorado PNPd Edital MCT/CNPq/FINEP Nº 028/2010 - PNPd 2010.

Referências

AMBRÓSIO, F. B.; ALVES, D. A.; FECHINE, G. J. M. Estudo da biodegradabilidade de polímeros por meio do respirômetro de Bartha. *Revista Mackenzie de Engenharia e Computação*, São Paulo, v.11, n.1, p.46-55, 2011.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 14283 resíduos em solo**: determinação da biodegradação pelo método respirométrico. Rio de Janeiro: ABNT, 1999.

ASTM. **Standard D5988-12 standard test method for determining aerobic biodegradation of plastic materials in soil**. West Conshohocken: ASTM International, 2012. Disponível em: <http://enterprise.astm.org/filtrex40.cgi?+REDLINE_PAGES/D5988.htm>. Acesso em: em 17 dez. 2012.

BANDEIRA, C. A. L. **Avaliação da estabilidade biológica de combustível derivado de resíduo**. 2010. 63 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia do Ambiente) - Instituto Superior Técnico da Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa.

CAMPOS, A.; MARCONCINI, J. M.; IMAM, S. H.; KLAMCZYNSKI, A.; ORTIS, W. J.; WOOD, D. H.; WILLIAMS, T. G.; MARTINS-FRANCHETTI, S. M.; MATTOSO, L. H. C. Morphological, mechanical properties and biodegradability of biocomposite thermoplastic starch and polycaprolactone reinforced with sisal fibers. **Journal of Reinforced Plastics and Composites**, Westport, v. 31, n. 8, p. 573-581, 2012.

IMAM, S. H.; GORDON, S. H. Biodegradation of coproducts from industrially processed corn in a compost environment. **Journal of Polymers and the Environment**, v.10, n.4, p.147-154, 2002.

INBAR, Y.; CHEN, Y.; HADAR, Y. Composting of agricultural wastes for their use as container media: simulation of the composting process. **Biological Wastes**, v.26, n. 4, p.247-259, 1988.

LEEJARKPAI, T.; SUWANMANEE, U.; RUDEEKIT, Y.; MUNGCHAROEN, T. Biodegradable kinetics of plastics under controlled composting conditions. **Waste Management**, Oxford, v. 31, n. 6, p.1153-1161, 2011.

MELLO, G. S. L.; MORITA, D. M.; MANFREDINI, S.; RIVERA, I. N. G. Viabilidade da aplicação do método respirométrico de Bartha para determinação da biodegradação de poluentes ou resíduos em latossolos. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, Rio de Janeiro, v. 12, n. 1, p. 71-78, 2007.

PETROVIC, Z. S.; XU, Y.; MILIC, J.; GLENN, G.; KLAMCZYNSKI, A. Biodegradation of thermoplastic polyurethanes from vegetable oils. **Journal of Polymers and the Environment**, v. 18, n. 2, p. 94-97, 2010.

ROSA, M. F.; CHIOU, B.-S., MEDEIROS, E. S.; WOOD, D. F.; MATTOSO, L. H. C.; ORTIS, W. J.; IMAM, S. H. Biodegradable composites based on starch/EVOH/glycerol blends and coconut fibers. **Journal of Applied Polymer Science**, New York, v. 111, n. 2, p. 612-618, 2009.

VARGA, A.; BERRIOS, J. D. J.; CHIOU, B.-S.; WOOD, D.; BELLO, L. A.; GLENN, G. M.; IMAM, S. H. Extruded/injection-molded composites containing unripe plantain flour, ethylene-vinyl alcohol, and glycerol: evaluation of mechanical property, storage conditions, biodegradability, and color. **Journal of Applied Polymer Science**, New York, v.124, n.3, p.2632-2639, 2012.

Comunicado Técnico, 193



Exemplares desta edição podem ser adquiridos na:
Embrapa Agroindústria Tropical
Endereço: Rua Dra. Sara Mesquita 2270, Pici,
 CEP 60511-110 Fortaleza, CE
Fone: (0xx85) 3391-7100
Fax: (0xx85) 3391-7109 / 3391-7141
E-mail: vendas@cnpat.embrapa.br

1ª edição (2012): on-line

Comitê de Publicações

Presidente: Marlon Vagner Valentim Martins
Secretário-Executivo: Marcos Antonio Nakayama
Membros: José de Arimatéia Duarte de Freitas, Celli Rodrigues Muniz, Renato Manzini Bonfim, Rita de Cassia Costa Cid, Rubens Sonsol Gondim, Fábio Rodrigues de Miranda.

Expediente

Revisão de texto: Marcos Antonio Nakayama
Editoração eletrônica: Arilo Nobre de Oliveira
Normalização bibliográfica: Edineide Maria M. Maia.