

**Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Materiais**

**FILMES DE POLISULFONA MODIFICADOS SUPERFICIALMENTE POR
IRRADIAÇÃO UV-ASSISTIDA PARA AVALIAÇÃO DA BIODEGRADAÇÃO POR
MICRO-ORGANISMOS**

Gabriela Albara Lando

Dissertação de Mestrado

Porto Alegre, fevereiro de 2016.

**Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Materiais**

**FILMES DE POLISULFONA MODIFICADOS SUPERFICIALMENTE POR
IRRADIAÇÃO UV-ASSISTIDA PARA AVALIAÇÃO DA BIODEGRADAÇÃO POR
MICRO-ORGANISMOS**

Gabriela Albara Lando

Dissertação realizada sob a orientação do Prof. Dr. Daniel Eduardo Weibel, apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Materiais da Universidade Federal do Rio Grande do Sul em preenchimento parcial dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciência dos Materiais.

Porto Alegre, fevereiro de 2016.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador e professor Dr. Daniel Eduardo Weibel, por estar sempre disposto a ensinar e guiar seus alunos pelo mundo da pesquisa científica. Obrigada novamente por ter me aceito como sua bolsista e orientanda, desde a graduação.

Ao meu eterno doutorando, que hoje já é Dr. e Prof., Felipe Kessler, por ter deixado o legado desta pesquisa em minhas mãos. Por todos os anos de amizade e incansável trabalho, por toda a confiança em mim depositada e pelas palavras de apoio nos momentos mais difíceis.

À Ma. Letícia Marconatto, por ter, desde a graduação, ajudado a desenvolver a multidisciplinaridade necessária ao meu trabalho.

Ao brilhante William Lopes, sem o qual eu não teria conseguido aprender e desenvolver o lado microbiológico do trabalho. Obrigada pelas incontáveis horas de trabalho frente ao fluxo laminar e microscópio óptico, além dos momentos de alegria. Hyphae lovers!

Ao Laboratório de Biologia Molecular e Fungos de Importância Médica (CBiot), em especial à profa. Marilene Henning Vainstein, pela grande colaboração e preocupação com o andamento do trabalho.

À Cláudia Vicentini e Felipe Ornaghi, pelo treinamento e auxílio imprescindível no DSC e TGA.

Aos colegas e ex-colegas do LAFOS, minha segunda família, por todos os momentos de auxílio e amizade. Aos colegas dos “laboratórios-irmãos”, LINDIM, LMC e Polibio pelos empréstimos de materiais, equipamentos e troca de experiências.

Aos meus amigos, que não cabe aqui citar tantos nomes, que estiveram comigo durante este último ano de mestrado. Vocês sabem o quanto foram importantes para minha saúde mental. Obrigada por toda a parceria e alegria proporcionada.

Aos meus queridos pais, Iva e Edgar, pelo suporte, auxílio, incentivo e amor por todos estes longos anos longe de casa, por segurarem a barra nos momentos mais complicados e por não desistirem de sonhar comigo.

LISTA DE TRABALHOS GERADOS

1. Biodegradation improvement of poly(3-hydroxy-butyrate) films by entomopathogenic fungi and UV-assisted surface functionalization. Kessler, F.; Marconatto, L.; Rodrigues, R. d. S. B.; Lando, G. A.; Schank, A.; Vainstein, M. H.; Weibel, D. E., *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* – v. 130, p. 57-67, 2014.
2. Wettability and Cell Spreading Enhancement in Poly(Sulfone) and Polyurethane Surfaces by UV-Assisted Treatment for Tissue Engineering Purposes. *Tissue Engineering and Regenerative Medicine*. Kessler, F.; Steffens, D.; Lando, G. A.; Pranke, P.; Weibel, D. E. – v. 11, p. 23-31, 2014.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REFERENCIAL BIBLIOGRÁFICO.....	4
2.1 MODIFICAÇÃO SUPERFICIAL DE POLÍMEROS.....	4
2.2 RADIAÇÃO ELETROMAGNÉTICA E SUA INTERAÇÃO COM A MATÉRIA....	5
2.3 RADIAÇÃO UV E SUA INTERAÇÃO COM POLÍMEROS.....	9
2.4 POLISULFONA.....	11
2.5 <i>METARHIZIUM ANISOPLIAE</i>	14
2.6 BIOPOLÍMEROS E BIODEGRADAÇÃO.....	15
3. OBJETIVO.....	20
3.1 OBJETIVO GERAL.....	20
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	20
4. METODOLOGIA.....	21
4.1 PREPARO DOS FILMES.....	21
4.2 FOTOFUNCIONALIZAÇÕES.....	21
4.2.1 Caracterização dos Filmes.....	22
4.3 ENSAIO DE BIODEGRADAÇÃO FÚNGICA.....	25
4.3.1 Linhagem do Fungo.....	25
4.3.2 Suspensão de Esporos do <i>M. anisopliae</i>	25
4.3.3 Condições de Cultivo do Fungo.....	26
4.4 ENSAIO DE BIODEGRADAÇÃO EM SOLO SIMULADO.....	27
4.4.1 Condições Gerais de Ensaio.....	27
4.5 CARACTERIZAÇÃO DOS FILMES PÓS-ENSAIOS DE BIODEGRADAÇÃO.....	28
5. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	29
5.1 CARACTERIZAÇÃO DOS FILMES.....	29
5.2 CARACTERIZAÇÃO DOS FILMES PÓS-ENSAIOS DE BIODEGRADAÇÃO FÚNGICA.....	43
5.3 CARACTERIZAÇÃO DOS FILMES PÓS-ENSAIOS DE BIODEGRADAÇÃO EM SOLO SIMULADO.....	59
5.3.1 Identificação morfológica dos micro-organismos presentes no Solo Simulado.....	72
6. CONCLUSÕES.....	75
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	77

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação do espectro eletromagnético.....	6
Figura 2. Representação do diagrama de energia dos orbitais moleculares ligantes e antiligantes de uma molécula diatômica homonuclear.....	8
Figura 3. Representação das transições eletrônicas possíveis para moléculas orgânicas.....	9
Figura 4. Mecanismos simplificados de iniciação das principais reações fotoquímicas que podem ocorrer em compostos contendo carbonila.....	10
Figura 5. Representação do monômero de PAA.....	10
Figura 6. Representação do monômero da PSU.....	11
Figura 7. Adaptação da representação do mecanismo de fotoenxerto em PES...	13
Figura 8. Imagem de microscopia eletrônica de varredura do esporo do <i>Metharizium anisopliae</i> em desenvolvimento. CO: esporo (conídia), GT: hifa, AP: apressório.....	15
Figura 9. Representação do monômero do PHB.....	16
Figura 10. Representação da ação de micro-organismos na degradação de polímeros.....	17
Figura 11. Esquema do reator utilizado nas fotólises com atmosfera de vapor de AA.....	22
Figura 12. Cultivo do <i>Metarhizium anisopliae</i> em frasco falcon.....	26
Figura 13. Ângulo de contato em água das amostras de PSU tratadas com AA e O ₂ , em função do tempo de irradiação UV.....	29
Figura 14. Figura 14. Espectro de FTIR-ATR de um filme de PSU.....	30
Figura 15. Espectro de FTIR-ATR de um filme de PAA.....	31

Figura 16. Espectro de FTIR-ATR comparando o filme de PSU original com os filmes tratados com O ₂ , por 30 minutos e por 120 minutos.....	32
Figura 17. Espectro de FTIR-ATR comparando o filme de PSU original com os filmes tratados com AA, por 10 minutos e por 30 minutos.....	33
Figura 18. (a) Imagem de SEM do filme de PSU sem tratamento e (b) Imagem de SEM do filme de PSU após 120 minutos de fotólise na presença de O ₂	34
Figura 19. Imagens 2D (esquerda) e 3D (direita) dos filmes de PSU (a) sem tratamento, (b) após 120 minutos de fotólise com O ₂ e (c) após 30 minutos de fotólise com AA.....	35
Figura 20. Difratogramas dos filmes de PSU sem tratamento, após 120 minutos de fotólise com O ₂ e após 30 minutos de fotólise com AA.....	36
Figura 21. Gráficos de DSC dos filmes de PSU sem tratamento, após 120 minutos de fotólise com O ₂ e após 30 minutos de fotólise com AA.....	37
Figura 22. Termogramas dos filmes de PSU sem tratamento e após 30 de fotólise com O ₂	38
Figura 23. Termogramas dos filmes de PSU sem tratamento e após 10 e 30 minutos de fotólise com AA.....	39
Figura 24. Proposta de mecanismo de fotopolimerização do PAA sobre o filme de PSU, durante e após a irradiação de UV na presença de vapores de AA.....	41
Figura 25. Proposta de mecanismo simplificado do enxerto de grupos oxigenados sobre o filme de PSU, durante e após a irradiação de UV na presença de atmosfera oxidante.....	42
Figura 26. Imagens de MEV das superfícies dos filmes de PSU após o cultivo do fungo. PSU ST após 10 dias de incubação (a) e após 30 dias de incubação (d); PSU 10 AA após 10 dias de incubação (b) e após 30 dias de incubação (e); e PSU 30 AA após 10 dias de incubação (c) e após 30 dias de incubação (f).....	46

Figura 27. Imagens de MO do crescimento do fungo sobre os filmes de PSU. PSU ST após 30 dias de incubação (a) e após 60 dias de incubação (d); PSU 30 O ₂ após 30 dias de incubação (b) e após 60 dias de incubação (e); PSU 120 O ₂ após 30 dias de incubação (c) e após 60 dias de incubação (f).....	47
Figura 28. Imagens de MO do crescimento do fungo sobre os filmes de PSU. PSU ST após 10 dias de incubação (a) e após 30 dias de incubação (d); PSU 10 AA após 10 dias de incubação (b) e após 30 dias de incubação (e); PSU 30 AA após 10 dias de incubação (c) e após 30 dias de incubação (f).....	48
Figura 29. Imagens de SEM das superfícies dos filmes de PSU após o cultivo do fungo. PSU ST após 30 dias de incubação (a) e após 60 dias de incubação (d); PSU 30 O ₂ após 30 dias de incubação (b) e após 60 dias de incubação (e); e PSU 120 O ₂ após 30 dias de incubação (c) e após 60 dias de incubação (f).....	49
Figura 30. Imagens de SEM das superfícies dos filmes de PSU após o cultivo do fungo. PSU ST após 10 dias de incubação (a) e após 30 dias de incubação (d); PSU 10 AA após 10 dias de incubação (b) e após 30 dias de incubação (e); e PSU 30 AA após 10 dias de incubação (c) e após 30 dias de incubação (f).....	50
Figura 31. Perfilometria óptica dos filmes de PSU incubados por 10 dias, (a) sem tratamento, (b) tratado com AA por 10 minutos, e (c) tratado com AA por 30 minutos.....	51
Figura 32. Espectro de FTIR-ATR do fungo <i>M. anisopliae</i> seco.....	52
Figura 33. Espectros de FTIR-ATR de PSU sem tratamento e incubados por 10 e 30 dias.....	53
Figura 34. Espectros de FTIR-ATR de PSU tratado por 10 minutos com AA e incubados por 10 e 30 dias.....	54
Figura 35. Espectros de FTIR-ATR de PSU tratado por 30 minutos com AA e incubados por 10 e 30 dias.....	54
Figura 36. Termogramas dos filmes de PSU sem tratamento antes e após incubação com <i>M. anisopliae</i>	56

Figura 37. Termogramas dos filmes de PSU fotolisados por 10 minutos com AA, antes e após incubação com <i>M. anisopliae</i>	56
Figura 38. Termogramas dos filmes de PSU fotolisados por 30 minutos com AA, antes e após incubação com <i>M. anisopliae</i>	57
Figura 39. Dados de perda de massa das amostras de PHB e PSU não tratado (ST) e tratado (30 O ₂ , 120 O ₂ , 10AA, 30AA,) após ensaio de solo simulado.....	60
Figura 40. Imagem de SEM das amostras de PHB após (a) 1 semana, (b) 4 semanas e (c) 10 semanas em contato com solo simulado.....	63
Figura 41. Imagem de SEM das amostras de PSU 30min UV+AA após (a) 1, (b) 4 e (c) 10 semanas em contato com solo simulado.....	63
Figura 42. Imagem de SEM dos filmes de PSU ST após (a) 1, (b) 2, (c) 4 e (d) 10 semanas em contato com solo simulado.....	64
Figura 43. Espectros de FTIR-ATR dos filmes de PHB após ensaio em solo simulado.....	65
Figura 44. Espectros de FTIR-ATR dos filmes de PSU sem tratamento após ensaio em solo simulado.....	66
Figura 45. Espectros de FTIR-ATR dos filmes de PSU fotolisados por 30 minutos com O ₂ após ensaio em solo simulado.....	66
Figura 46. Espectros de FTIR-ATR dos filmes de PSU fotolisados por 120 minutos com O ₂ após ensaio em solo simulado, na região entre 3800 e 2400 cm ⁻¹	67
Figura 47. Espectros de FTIR-ATR dos filmes de PSU fotolisados por 120 minutos com O ₂ após ensaio em solo simulado, na região 2000-500 cm ⁻¹	67
Figura 48. Espectros de FTIR-ATR dos filmes de PSU fotolisados por 10 minutos com AA após ensaio em solo simulado.....	68
Figura 49. Espectros de FTIR-ATR dos filmes de PSU fotolisados por 30 minutos com AA após ensaio em solo simulado.....	69

Figura 50. Termogramas dos filmes de PSU sem tratamento antes e filmes tratados e não tratado após 90 dias em solo simulado.....	70
Figura 51. Gráfico de Mn dos filmes de PSU em função do período de ensaio em solo simulado.....	71
Figura 52. Gráfico de PDI dos filmes de PSU em função do período de ensaio em solo simulado.....	71
Figura 53. Fotos das placas de cultivo dos micro-organismos isolados do solo simulado (1a-7a) e respectivas imagens de microscopia óptica (1b-7b) com magnificação 40x.....	74

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Bandas de um espectro de FTIR-ATR do filme de PAA.....	22
Tabela 2. Medidas de rugosidade e da área superficial dos filmes de PSU antes e depois dos tratamentos, obtida perfilometria óptica.....	36
Tabela 3. Massa molar média (Mw), número médio de unidade de massa molar (Mn) e o índice de polidispersividade (PDI) para amostras não tratadas e após os tratamentos com radiação UV em presença de O ₂ e AA.....	40
Tabela 4. Massa molar média (Mw), número médio de unidade de massa molar (Mn) e o índice de polidispersividade (PDI) para amostras não tratadas e tratadas com AA, antes e após incubações de 10 e 30 dias com <i>M. anisopliae</i>	58
Tabela 5. Concentração elementar no solo simulado	60
Tabela 6. Identificação morfológica dos micro-organismos isolados do substrato utilizado como solo simulado.....	73

LISTA DE ABREVIATURAS

AA – Ácido Acrílico	PS - Poliestireno
CG97 – Linhagem de <i>M. anisopliae</i>	PS/DVB – Poli (estireno/divinil benzeno) (coluna cromatográfica de GPC)
CNANO – Centro de Nanociência e Nanotecnologia	PES – Poli(éter)sulfona
FTIR-ATR – Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier no Módulo de Refletância Total Atenuada	PSU – Polisulfona
GPC – Cromatografia de Permeação em Gel	PVA – Álcool Polivinílico
MCC/Cove – Meio de cultura completo	PU – Poliuretano
MMC – Meio mínimo de cultura	SEM – Microscopia Eletrônica de Varredura
NEXAFS – Espectroscopia de Absorção de Raios-X de Estrutura Fina Próxima da Borda	SR - Síncrotron
OM – Microscopia Óptica	THF – Tetrahidrofurano
PAA – Poli (ácido acrílico)	Tof-SIMS - Espectrometria de Massas por Ions Secundários por Tempo-de-Vôo
PC – Policarbonato	TOM – Teoria do orbital molecular
PE - Polietileno	UV – Ultravioleta
PHB – Poli(hidróxibutirato)	VUV – Ultravioleta de vácuo
PHBV – Poli(hidróxibutirato-co-valeriato)	VUV – Ultravioleta de Vácuo
PLA – Poli (ácido láctico)	XPS – Espectroscopia de Fotoelétrons de Raios-X
	WCA – Ângulo de Contato em Água

RESUMO

A Polissulfona (PSU) é um polímero largamente utilizado em diversas áreas industriais por possuir grande estabilidade química e térmica. Estas propriedades o fazem um polímero de difícil degradação, trazendo prejuízos ao meio ambiente quando descartado incorretamente após seu uso. A etapa inicial no processo de biodegradação de polímeros se dá através da modificação de suas propriedades superficiais inertes, aumentando sua energia livre de superfície e, em consequência, sua capacidade de interagir com o meio externo. Neste trabalho a superfície de filmes de PSU foi modificada por tratamentos fotoquímicos UV em presença de uma atmosfera oxidante (O₂) e de vapores reativos de ácido acrílico (AA) possibilitando obter superfícies poliméricas que podem ser reconhecidas como substrato para o desenvolvimento de micro-organismos.

As amostras modificadas foram caracterizadas pelas técnicas de WCA, FTIR–ATR, GPC, TGA, DSC e XRD, detectando a inserção de grupamentos oxigenados e resultando em superfícies com características hidrofílicas. Utilizou-se do fungo filamentosso *Metarhizium anisopliae* e do ensaio em solo simulado, contendo um consórcio de micro-organismos, para estudar a biodegradação do PSU. Foi observado por SEM, OM, perfilometria óptica e gravimetria que, quanto maior a hidrofilicidade dos filmes, maior é a adesão microbiana e maior o desenvolvimento fúngico sobre os mesmos. É necessário destacar que praticamente não foi observada atividade de biodegradação em filmes de PSU sem tratamento. Os resultados obtidos confirmaram que a metodologia para modificação superficial utilizada no presente trabalho pode ser utilizada para aumentar ou melhorar a degradação da PSU, impactando positivamente no manejo de resíduos poliméricos.

ABSTRACT

Polysulfone (PSU) is widely used in the industry mainly due to its chemical and thermal stability. These properties make PSU a polymer of almost no biodegradability, increasing its accumulation in the environment when it is incorrectly disposed. The first step in the biodegradation process of polymers is the change in their usually inert surface properties, increasing the surface free energy and the interaction with the environment. In the present work, the surface properties of PSU films were modified by UV-assisted treatments in the presence of an oxidant atmosphere (O₂) or acrylic acid (AA) vapors. The treatments led to changes in the surface properties of the films that were recognized by the microorganisms positively for their development.

The modified samples were characterized by WCA, FTIR–ATR, GPC, TGA, DSC e XRD. After treatments, the films were converted to hydrophilic and oxygenated functional groups were detected on the surface. Entomopathogenic fungi *Metarhizium anisopliae* and simulated soil assay were used to study the PSU biodegradation before and after the UV treatments. SEM, OM, optical profilometry and gravimetric measurements allowed the observation of higher microorganism adhesion and higher fungi development when the irradiation time increased. It is necessary to point out that almost no biodegradation of the PSU was detected in untreated films. The obtained results confirmed that the used methodology for surface modification could be employed to improve the biodegradation rate of PSU films on waste management of polymers residues.

1. INTRODUÇÃO

A grande demanda por materiais duráveis, estáveis, resistentes, de fácil processamento e de possível emprego em diversas áreas, fez com que a indústria dos plásticos chegasse a números milionários de manufatura. A produção mundial de polímeros plásticos foi de 299 milhões de toneladas no ano de 2013, mantendo o crescimento constante de 4% dos últimos anos¹.

Se por um lado a grande quantidade de plásticos produzidos facilita a vida das pessoas, pois é utilizado desde a construção civil à embalagem para alimentos, por outro, o descarte inadequado destes polímeros após sua utilização acarreta em diversos problemas ambientais, como poluição de solos e águas, entupimento das tubulações de esgoto nas cidades, acúmulo em aterros sanitários, morte de animais aquáticos, etc^{2,3}.

Para evitar esses graves problemas o gerenciamento dos resíduos sólidos se faz necessário. Este gerenciamento pode ser efetivado pela reutilização ou reciclagem dos resíduos poliméricos, havendo 3 formas de se reciclar polímeros:

- Reciclagem Mecânica, que se baseia na transformação dos resíduos em grânulos para a fabricação de novos produtos;
- Reciclagem Energética, que se procede à recuperação da energia térmica intrínseca dos resíduos;
- Reciclagem Química, onde se faz a conversão dos resíduos em intermediários químicos, que são reintegrados à cadeia petroquímica.

Recentemente o Brasil criou o Plano Nacional de Resíduos Sólidos⁴, previsto na Lei 12.305/2010, tendo como uma de suas diretrizes metas de redução, reutilização, reciclagem, entre outras, com vistas a reduzir a quantidade de resíduos e rejeitos encaminhados para disposição final ambientalmente adequada. Mesmo com a lei vigente, no ano de 2012 apenas 20,9% dos plásticos pós-consumo foram reciclados mecanicamente no Brasil. Este baixo número se deve ao descarte incorreto desses resíduos e à falta de políticas realmente efetivas de coleta e reciclagem dos materiais, evidenciado pela defasagem de 48% entre a capacidade instalada (em toneladas) de empresas recicladoras em relação à quantidade de plásticos pós-consumo descartados.⁵

Uma vez que a reciclagem de polímeros, mesmo quando possível de ser realizada, não é efetiva no combate ao acúmulo de resíduos sólidos, outras soluções se tornam necessárias, como o desenvolvimento, utilização e substituição dos polímeros tradicionais por biopolímeros ou então a modificação superficial de polímeros sintéticos já existentes, tornando-os suscetíveis à degradação e à biodegradação.

A modificação de superfícies poliméricas, sem alterar suas propriedades físico-químicas vem sendo estudada há muitos anos e ainda é um desafiante campo de estudo para novas aplicações dos materiais modificados, especialmente nos campos da biotecnologia e bioengenharia. As maiores vantagens em se modificar a superfície dos polímeros são deixar inalteradas as características físicas, térmicas e mecânicas de sua matriz e não precisar desenvolver uma nova molécula polimérica, já que são enormes as quantidades de materiais conhecidos, estudados e aplicados⁶⁻⁹.

As técnicas de modificação superficial tradicionalmente estudadas alcançam resultados muito positivos, como implantação iônica¹⁰, plasma^{11,12}, enxertia química^{13,14}, radiação UV¹⁵, VUV¹⁶, mas o conhecimento adquirido nos últimos anos de processos e técnicas fotoquímicas permite a utilização da luz como forma de modificar a região superficial de um material de forma controlada e com a utilização de poucos ou nenhum outro reagente, baseando-se na excitação eletrônica das moléculas da superfície polimérica através da radiação eletromagnética.

A variedade de fontes de radiação eletromagnética mono e policromáticas, o controle dos parâmetros experimentais necessários, como fluxo de gás ou monômero e a não necessidade do uso de solventes ou fotossensibilizadores, faz a técnica de enxerto induzido por radiação eletromagnética ser altamente vantajosa frente às outras técnicas relatadas, obtendo-se superfícies com baixo grau de contaminação e bastante homogêneas¹⁷⁻²⁰. Há de se citar também que o aparato experimental é de baixa complexidade e de baixo custo, sendo o tempo de irradiação (da ordem de minutos) a principal desvantagem da técnica frente à técnica de plasma (da ordem de segundos), por exemplo.

A aplicação da técnica de modificação de superfícies em polímeros sintéticos sem modificar suas propriedades de matriz e, em contato com um ambiente propício para o desenvolvimento de micro-organismos, iniciarem sua biodegradação, é de grande importância ambiental. A técnica de modificação utilizando radiação UV na

presença de gases e vapores reativos tem sua eficiência comprovada por diversos trabalhos já citados, evidenciando-se as mudanças superficiais necessárias para que os processos de degradação ou biodegradação ocorram em polímeros sintéticos e inertes.

Diversos micro-organismos são retratados na literatura como potenciais degradadores de polímeros²¹⁻²⁷, em especial fungos da classe ascomicetos²⁸, da qual faz parte o fungo ambiental e filamentoso *Metarhizium anisopliae*, utilizado no presente trabalho devido sua fácil obtenção e manutenção, além de desenvolver uma estrutura chamada apressório, capaz de exercer pressão mecânica sobre superfícies, facilitando a penetração das hifas e secretando diversas enzimas e gerando metabólitos secundários. Devido a estas características, o *M. anisopliae* é utilizado como pesticida ou acaricida natural, pois penetra a carapaça de quitina dos insetos, promovendo sua morte²⁹.

Este trabalho multidisciplinar tem como objetivo associar a facilidade da modificação UV-assistida e a utilização de um fungo filamentoso *in vitro* e do ensaio de solo simulado na biodegradação de filmes de PSU, podendo ser uma técnica a ser explorada e utilizada na biorremediação dos polímeros, impactando positivamente no meio ambiente.

2. REFERENCIAL BIBLIOGRÁFICO

2.1. MODIFICAÇÃO SUPERFICIAL DE POLÍMEROS

A modificação superficial de polímeros tem como objetivo alterar apenas a superfície do material, deixando inalteradas as suas características físicas, térmicas e mecânicas. Segundo Guillet³⁰, alguns fatores devem ser levados em consideração para que a modificação superficial ocorra:

- É necessário que apenas camadas finas da superfície, na ordem nanométrica, sejam alteradas, a fim de não alterar as propriedades mecânicas do material;
- A criação de ligações covalentes se faz necessária para que a modificação seja efetiva ao longo do tempo;
- Camadas finas de modificações não alteram as propriedades óticas do material, quando assim requerido;
- Há de se considerar a viabilidade dos processos quanto à homogeneidade, reprodutibilidade, estabilidade, velocidade e custo;
- O controle sobre os grupos funcionais deve ser preciso, apesar de muitos deles não poderem ser diferenciados pela técnica no momento em que são enxertados.

As técnicas de modificação superficial tradicionalmente estudadas alcançam resultados muito positivos, porém possuem algumas limitações que podem interferir no produto final. O tratamento com plasma^{11,31} constitui na formação de um conjunto de partículas ionizadas que, em contato com o polímero, promove a formação de radicais e íons na superfície, podendo ser estes as espécies ativas a serem enxertadas na superfície ou, se expostas a algum gás ou monômero, promoverem ligações covalentes³²⁻³⁴. Apesar de haver o controle experimental de potência, pressão de gases, etc., no tratamento com plasma não há como controlar quais as ligações químicas deveriam ser preservadas, ou seja, não há um exato controle da química superficial obtida no final do processo. O tratamento com descarga em corona¹², ou plasma à pressão atmosférica, segue o mesmo princípio da técnica com plasma, mas ocorre em temperatura e pressão ambiente, podendo haver a contaminação do material pelas espécies gasosas presentes no ambiente durante a

descarga^{32,34}. O enxerto por meio químico utiliza compostos químicos para promover a introdução de grupos específicos na superfície polimérica¹³. Mesmo possuindo as vantagens de modificação da superfície através da escolha do monômero e haver controle na introdução desses e a promoção de ligações covalentes, a técnica se dá pela interface polímero/reagente (sólido/líquido), podendo ocorrer a plastificação da matriz polimérica, bem como a possível contaminação pelo uso de solventes¹⁴.

O enxerto induzido por radiação eletromagnética baseia-se na excitação eletrônica das moléculas da superfície polimérica através da radiação ultravioleta (UV)¹⁵, radiação ultravioleta de vácuo (VUV)^{16,35} ou radiação síncrotron (SR)³⁶, levando ao rompimento de ligações e formação de radicais na região superficial. Por sua vez, os radicais, em contato com outro composto ou monômero, podem formar ligações covalentes, enxertando os novos grupos funcionais na superfície. A técnica também se baseia na interface polímero/reagente mas neste caso, o reagente é gasoso, evitando a contaminação da superfície. Contudo, quando se trata da modificação via radiação UV, ou o polímero deve conter em sua estrutura um grupo capaz de absorver fótons e se ativar, promovendo um estado metaestável que irá se ligar ao grupo a ser posteriormente enxertado, ou a espécie a ser enxertada deve conter tal grupo fotorreativo. Caso polímero e enxerto não possuam grupos fotorreativos, há de se utilizar de compostos fotossensibilizadores ou fotoiniciadores³⁷.

2.2. RADIAÇÃO ELETROMAGNÉTICA E SUA INTERAÇÃO COM A MATÉRIA

A radiação eletromagnética é a oscilação em fase dos campos elétrico e magnético, gerando ondas que podem ser classificadas de acordo com suas frequências. Estas frequências podem ser correlacionadas com a energia da onda (Equação 1) e então organizadas em um Espectro Eletromagnético (Figura 1);

$$E = h\nu = hc/\lambda \quad (1)$$

onde E é a energia do fóton, h é a Constante de Planck, ν é a frequência da onda eletromagnética, c é a velocidade da luz e λ é o comprimento de onda. Assim, a

energia de um fóton é inversamente proporcional ao comprimento de onda da radiação emitida.

A radiação eletromagnética emitida na região do UV está situada entre 400 e 200 nm de comprimento de onda, podendo ainda ser subdividida em 3 regiões. A região UV-A (400-315 nm) é a menos energética, seguida da UV-B (315-280 nm), com energia suficiente para causar danos biológicos, sendo responsável por mutações observadas nas células de tumores de pele³⁸. A UV-C (280-200 nm) é completamente absorvida na atmosfera, favorecendo a formação de ozônio através da quebra das ligações O=O, formação de radical e recombinação das moléculas. Essa radiação é comumente encontrada artificialmente sob forma de lâmpadas germicidas³⁹.

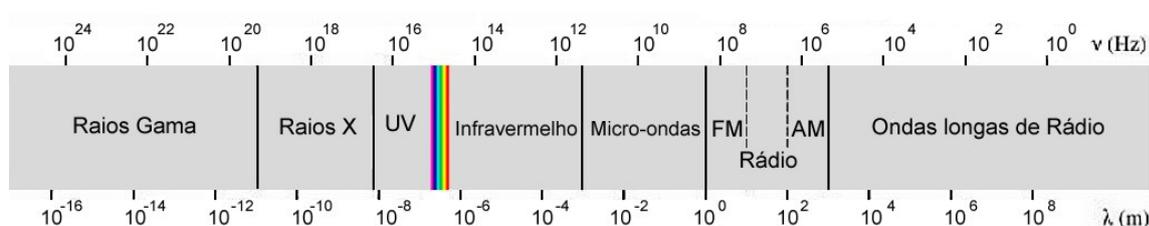


Figura 1. Representação do espectro eletromagnético.

Pela Teoria Quântica é sabido que a energia de um átomo ou de uma molécula somente pode adquirir certos valores de energia (E) alcançando estados que sejam descritos por funções de onda (ψ) correspondentes. Os átomos ou moléculas, quando encontrados em seu estado fundamental, ou seja, em seu nível de mais baixa energia, ao serem irradiados, podem absorver a luz e serem excitados a outros níveis mais altos de energia, sendo sempre a diferença entre os níveis energéticos correspondente à energia da radiação absorvida.

Grotthus e Drapper formularam a primeira lei da fotoquímica ao enunciarem que somente a luz absorvida por uma molécula pode ser efetiva na produção de mudança fotoquímica naquela molécula. Também postularam que a velocidade de uma reação é proporcional à intensidade da luz que a provoca, ou seja, explica que a determinação do espectro de absorção seja a primeira etapa ao se realizar o estudo fotoquímico de uma molécula, pois assim se sabe em qual comprimento de onda há a possibilidade de ocorrer uma reação química. A segunda lei da fotoquímica, desenvolvida por Einstein, diz que cada molécula ativada pela luz somente pode

requerer a absorção de um quantum ($h\nu$) para que possa ocorrer processo fotoquímico, ou seja, o número de moléculas ativadas será igual ao número de quanta absorvidos. A Lei de Lambert-Beer, que estuda a interação da luz com a matéria, trata da absorção de um feixe monocromático de luz por sistemas homogêneos, correlacionando o comprimento de onda, distância percorrida pela luz e a concentração da substância absorvente.³⁰

Levando em conta as três leis descritas, a radiação, ao interagir com a matéria, provoca um desequilíbrio energético na molécula. Esta, por sua vez, atua de forma a distribuir a energia em seus estados quantizados. Para que ocorra a absorção é necessário que a molécula no estado inicial E_m possua um estado n de maior energia E_n , tal que

$$h\nu = E_n - E_m \quad (2)$$

Além disso, deve haver uma interação específica entre a componente elétrica da radiação incidente e o grupo cromóforo, resultando na mudança de momento dipolar da molécula durante a transição, definida como integral de momento de transição

$$R_{mn} = \langle \psi_m | \hat{O} | \psi_n \rangle \quad (3)$$

onde ψ_m e ψ_n são as funções de onda dos estados m e n e \hat{O} é o operador de momento dipolar elétrico.

Ao serem cumpridas essas duas condições, a probabilidade de absorção da luz é proporcional à $|R_{mn}|^2$. Transições eletrônicas com alta probabilidade de absorção são ditas *permitidas*. A transição é *proibida* quando a integral de momento de transição é pequena ou igual a zero.

Pela Teoria dos Orbitais Moleculares (TOM) os orbitais atômicos da camada de valência de dois átomos ligantes deixam de existir quando há a formação da molécula, sendo substituídos por um orbital molecular. Assim como os orbitais atômicos, os estados de energia da molécula são quantizados e expressos por funções de onda que, quando combinadas matematicamente, geram diferentes regiões de probabilidade eletrônica do estado fundamental, como os orbitais moleculares ligante ($\psi_{AB} = \psi_A + \psi_B$) e antiligante ($\psi_{AB}^* = \psi_A - \psi_B$) conforme representado na Figura 2.

Os orbitais ligantes, quando no estado fundamental, encontram-se totalmente ou parcialmente preenchidos, enquanto os orbitais antiligantes encontram-se vazios. Apenas quando há a excitação eletrônica da molécula, ou seja, fornecida o valor da diferença de energia entre estes orbitais, é que os elétrons passam a ocupar estes orbitais antiligantes. As representações dos diagramas de energia se tornam mais complexas conforme o número e tipo de átomos envolvidos em cada molécula^{30,40}.

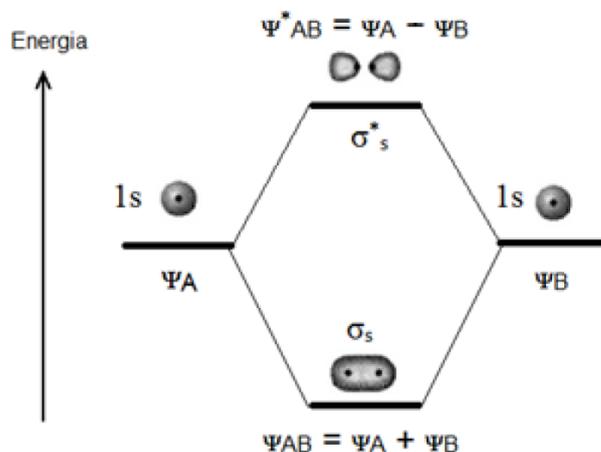


Figura 2. Representação do diagrama de energia dos orbitais moleculares ligantes e antiligantes de uma molécula diatômica homonuclear⁴⁰.

Alguns grupos moleculares, denominados cromóforos, possuem a capacidade de absorver energia na região do visível e UV, promovendo um elétron a um estado de maior energia, ocorrendo a transição do momento de dipolo e fazendo com que a energia do fóton se torne parte da energia total do estado excitado da molécula. Ao absorver um fóton, as moléculas orgânicas podem corresponder a seis tipos de transições eletrônicas, que devem obedecer ao intervalo de energia específico (Figura 3). As transições $\sigma \rightarrow \sigma^*$ e $\sigma \rightarrow \pi^*$ necessitam de elevada energia e só são acessíveis ao UV distante (UV de vácuo). Ligações como $\sigma \rightarrow \pi^*$ e $\pi \rightarrow \sigma^*$ são sobrepostas pela forte absorção $\pi \rightarrow \pi^*$. Compostos orgânicos contendo heteroátomos ou ligações duplas, quando excitados por fótons, observam duas transições principais $\pi \rightarrow \pi^*$ e $n \rightarrow \pi^*$ ^{30,41-43}.

Guillet utiliza da carbonila e do anel aromático para explicar alguns tipos de transições eletrônicas³⁰. Carbonilas de cetonas e aldeídos podem ter transições $n \rightarrow \pi^*$ e $\pi \rightarrow \pi^*$. Ligações do tipo $n \rightarrow \pi^*$ são consideradas proibidas pela regra de simetria.

Compostos aromáticos carbonilados, ao sofrerem uma excitação $n \rightarrow \pi^*$, permitem a deslocalização eletrônica conforme a ressonância da dupla ligação π . O mesmo comportamento é avaliado quando da excitação $\pi \rightarrow \pi^*$ para anéis aromáticos.

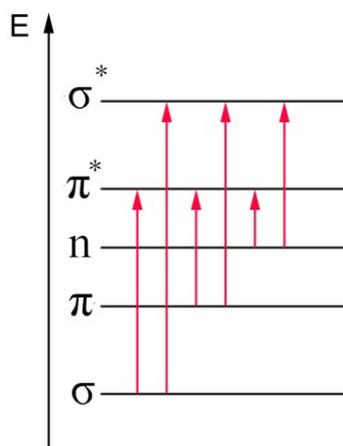


Figura 3. Representação das transições eletrônicas possíveis para moléculas orgânicas.

2.3. RADIAÇÃO UV E SUA INTERAÇÃO COM POLÍMEROS

A modificação superficial de poliuretano (PU) usando radiação UV foi estudada e caracterizada através de análises de FTIR, XPS e NEXAFS^{9,17,44}, mostrando que, quando a modificação se dá na presença de oxigênio, há um aumento na concentração de grupos oxigenados da amostra, enquanto a concentração de carbono diminui em concentrações correspondentes. Este aumento da concentração do oxigênio pode ser correlacionado ao aumento da hidrofiliabilidade do PU. Em modificações de poliestireno (PS), PU, polisulfona (PSU) e polipropileno (PP) na presença de vapores de ácido acrílico (AA), observou-se a formação de um filme de poli(ácido acrílico) (PAA) sobre a amostra do polímero e se confirmou a presença dos grupos carbonil e hidroxil na superfície do mesmo^{17,19}. Os mecanismos de reações de fotoenxerto de grupos funcionais na superfície do PU não são bem definidos na literatura. Os trabalhos referentes à PU e fotoquímica tratam, em sua maioria, da sua fotodegradação⁴⁵ e não de enxerto via fotólise. Sabe-se, contudo, que a excitação por radiação UV de alguns polímeros pode seguir por mecanismos de reação do tipo Norrish I e Norrish II (Figura 4). A reação Norrish I baseia-se na clivagem na posição alfa de carbonilas excitadas de poliésteres, podendo levar à formação de radicais ou

cisões homolíticas. A reação de Norrish II trata da abstração intramolecular de hidrogênio pela carbonila excitada de éster^{20,41}.

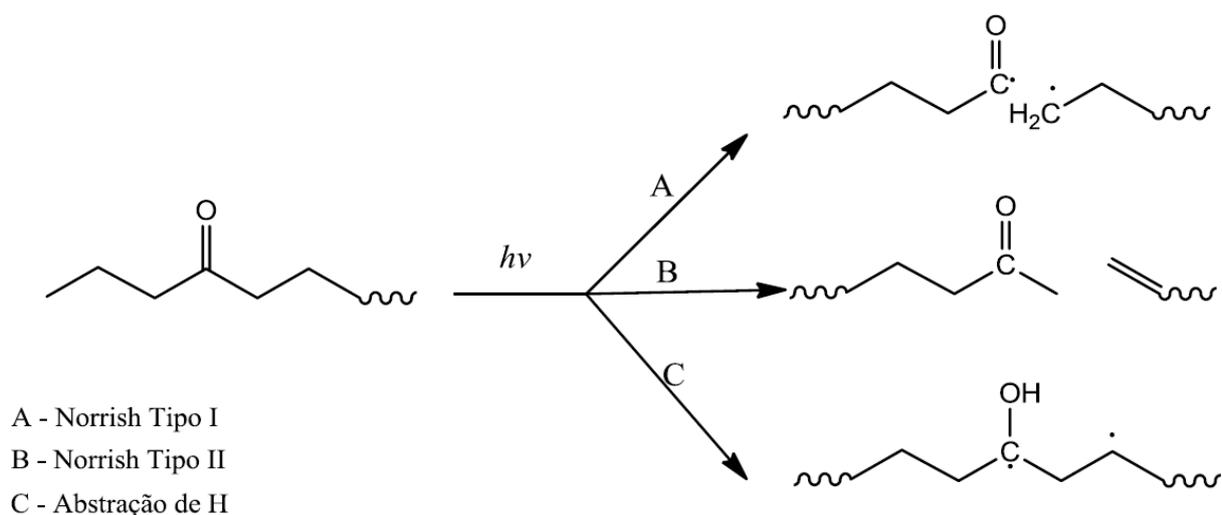


Figura 4. Mecanismos simplificados de iniciação das principais reações fotoquímicas que podem ocorrer em compostos contendo carbonila⁴⁶.

A fotoquímica do AA é bem estudada e estabelecida. A absorção da luz em determinados comprimentos de onda pelas carbonilas, seguindo de sua excitação, pode resultar em clivagens ou formações de radicais, que podem reagir com os outros radicais formados na cisão homolítica do poliéster ou abstrair hidrogênios da cadeia polimérica. Esses radicais são os responsáveis pela eficiente reação de polimerização observada^{9,44}, que formam uma camada de PAA quando se irradia os polímeros na presença de vapores de AA.

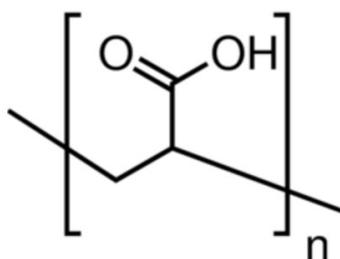


Figura 5. Representação do monômero de PAA

Allmér e colaboradores^{47,48} modificaram superfícies de polietileno (PE) e PS com AA e benzofenona (BP) em fase vapor, irradiadas com luz UV, concluindo que com o PS foi mais fácil de modificar devido aos hidrogênios terciários. Além disso, a acetona é um ótimo solvente por absorver comprimentos de onda abaixo de 320nm e, quando excitados, os polímeros seguem reações do tipo Norrish I e formam radicais metila ou abstraem H.

Filmes de polihidróxibutirato (PHB) foram modificados utilizando radiação UV sob atmosfera de O₂, a fim de aumentar sua molhabilidade e posterior biodegradação. O enxerto de grupamentos oxigenados foi comprovado por diversas técnicas de análise e a superfície atingiu a superhidrofilicidade (ângulo de contato com a água abaixo de 10°) após 120 minutos de fotólise⁴⁹. A mesma técnica foi utilizada para o biopolímero álcool polivinílico (PVA), apenas alterando a radiação eletromagnética para VUV, obtendo-se superfícies superhidrofílicas em 30 minutos de radiação, pois a cadeia polimérica foi facilmente rompida quando irradiada por comprimentos de onda menores de 200 nm, produzindo radicais que foram oxidados em atmosfera ambiente, enxertando grupos oxigenados na superfície do polímero⁵⁰.

2.4. POLISULFONA

O PSU (Figura 6), desenvolvida pela Union Carbide em 1965, foi um dos primeiros polímeros termoplásticos feitos para utilização em altas temperaturas. Sua produção ocorre pela união de monômeros difenilsulfona e bisfenol-A, formando o poliéter pela eliminação de cloreto de sódio. Rígido, transparente, com leve caráter hidrofóbico e amorfo, retém suas propriedades físicas e mecânicas entre -100 °C e 150 °C, tendo sua transição vítrea em torno de 185 °C. Altamente resistente aos ácidos minerais, álcalis e eletrólitos, em pH variando de 2 a 13, e em muitos solventes não-polares, tem resistência à compactação, sendo muito utilizada em meios que necessite altas pressões. Sua grande estabilidade à hidrólise e às altas temperaturas permite o uso em aplicações médicas que exigem autoclave e esterilização à vapor. Muito utilizada também na fabricação de membranas para aplicações em hemodiálises, filtragem de água, separação de gases. Como resina é amplamente utilizada na fabricação de peças e equipamentos eletro-eletrônicos, médico-hospitalares, domésticos e na indústria automobilística. Sua extensa utilização, nas

mais diversas áreas, torna o PSU um polímero difícil de ser descartado ou reutilizado, fazendo-se necessário um manejo correto pós-consumo. As modificações químicas feitas na PSU têm como objetivo aumentar sua hidrofiliabilidade, importante propriedade para ser utilizado como suporte de membranas de purificação da água e aplicações biotecnológicas⁵¹.

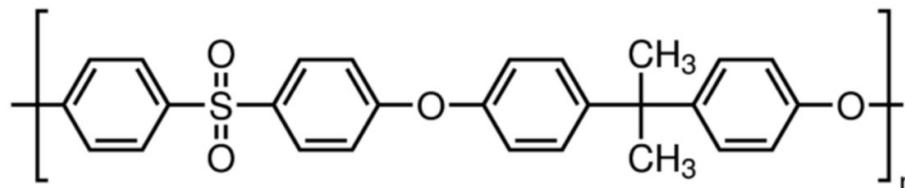


Figura 6. Representação do monômero da PSU.

A irradiação UV de filmes e membranas de PSU e poli(éter)sulfona (PES) há muito é estudada a fim de se entender seus mecanismos de fotodegradação e oxidação. Kuroda e colaboradores⁵²⁻⁵⁵ publicaram diversos artigos sobre a fotodegradação de PSU e PES, mostrando que a degradação inicia com a quebra das ligações C-S, com baixa, e dependente da temperatura, formação de SO₂ e que há de se considerar reações de reticulação (crosslinking) competindo com a quebra das cadeias. Yamashita e colaboradores⁵⁶ concluíram que as reticulações e quebras de cadeia ocorrem simultaneamente na fotodegradação de PES abaixo da temperatura de transição vítrea (T_g) do polímero, mas acima da T_g predominam as reações de reticulações para o PES e quebra da cadeia para a PSU, indicando que as metilas promovem a cisão da cadeia como um hidrogênio doador.

As mais conhecidas aplicações de filmes e membranas de PSU necessitam que o material possua certa hidrofiliabilidade, ao contrário do seu caráter hidrofóbico. Membranas de PSU e PES podem ser tratadas sem a presença de fotoiniciadores, pois são intrinsecamente fotossensíveis, possuindo grupos cromóforos capazes de absorver irradiação UV, sendo apenas necessária a seleção correta do comprimento de onda da radiação. O mecanismo de fotoenxerto induzido por UV em PES é representado na Figura 7⁵⁷. O primeiro passo é a absorção da radiação pelos cromóforos fenila, resultando na clivagem da ligação C-S do grupo sulfônico, gerando dois radicais reativos no final de cada nova cadeia. O radical sulfonila pode perder seu grupo sulfônico, resultando em outro radical arila.

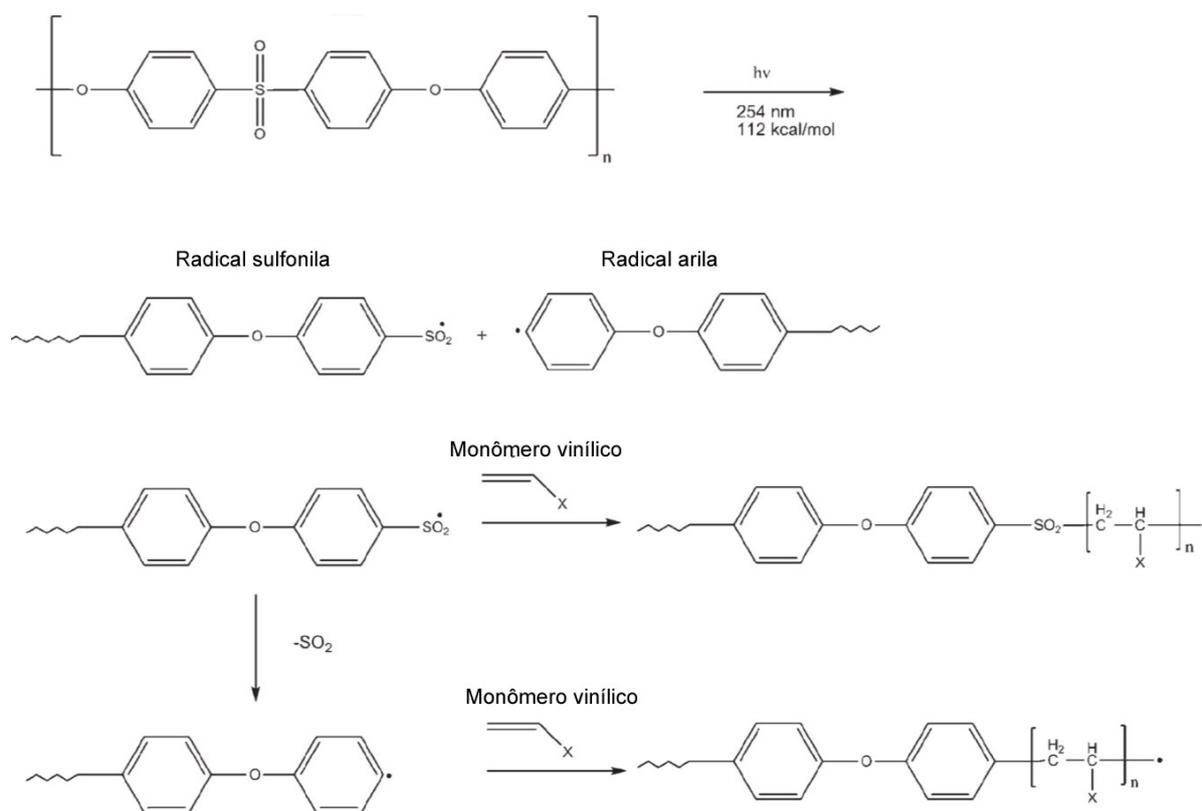


Figura 7. Adaptação da representação do mecanismo de fotoenxerto em PES⁵⁷.

A irradiação UV pode ocorrer na presença de monômeros solúveis em água ou metanol, através da técnica de imersão, que consiste em submergir a membrana em uma solução contendo monômeros vinílicos, por exemplo. Radicais são formados também na solução e, contendo o polímero seus radicais livres, ocorre a ligação covalente entre o monômero e a cadeia polimérica. Yamagishi e colaboradores usaram 1-hidróxietilmetacrilato (HEMA), glicidilmetacrilato (GMA) e ácido metacrílico (MAA) como monômeros⁵⁷. Ulbricht e Riedel⁵⁸ e Béquet e colaboradores⁵⁹ utilizaram AA para polimerizar sobre membranas e fibras de PSU, respectivamente, sendo que o primeiro grupo observou um aumento na modificação proporcional ao tempo de irradiação UV ou concentração do monômero. Para evitar o acúmulo de material orgânico natural, Kilduff e colaboradores⁶⁰ enxertaram N-vinil-2-pirrolidona em membranas de PES, promovendo um aumento na hidrofiliabilidade do material.

Além de poder ocorrer em meio úmido, ou seja, utilizando a técnica de imersão previamente citada, o enxerto de monômeros pode se dar em via seca, com estes em estado vapor ou gasoso. Membranas de PSU foram modificadas com o enxerto de

PAA, utilizando lâmpada de média pressão de mercúrio de 450W, tornando o material sensível ao pH e com diferente permeabilidade à riboflavina⁶¹. A hidrofiliabilidade adquirida pelos filmes finos de PSU após irradiação UV por 120 minutos na presença de vapores de AA foi mantida por um período observável de 65 dias, mostrando que o enxerto do PAA sobre sua superfície ocorre de forma efetiva e com a formação de ligações covalentes¹⁷. Em trabalho posterior, Kessler e colaboradores provaram por análises de FTIR-ATR, XPS e NEXAFS a incorporação de grupos oxigenados na superfície de filmes de PSU após a irradiação UV de 120 minutos, obtendo ângulo de contato em água de 6°. A modificação assistida utilizando vapores reativos foi comparada com a técnica de modificação via plasma, sugerindo que a primeira atinge resultados efetivos na obtenção e controle da hidrofiliabilidade de superfícies poliméricas¹⁸.

2.5. METARHIZIUM ANISOPLIAE

A biodegradação, como será definida posteriormente, pode ocorrer utilizando diversos tipos de micro-organismos, como bactérias e fungos^{23,62-64}. Estes, especialmente, são capazes de secretar diversas enzimas capazes de se fixar e atacar diversas superfícies poliméricas⁶⁵.

Para o estudo da biodegradação de PSU nesse trabalho, o fungo escolhido foi da espécie *Metarhizium anisopliae*, linhagem CG97, com característica hipervirulenta, ou seja, desenvolvimento exacerbado frente à outras linhagens. Caracterizado por fungo filamentosos, é isolado a partir de solos ou carapaça de artrópodes e pode ser um potencial micro-organismo capaz de degradar polímeros, pois secreta uma diversa gama de enzimas lipolíticas e hidrolíticas (proteases, lipases, esterases e chitinases), além de secretar metabólitos como ácido cítrico e oxálico, que podem auxiliar no processo degradativo⁶⁶. Este micro-organismo oferece vantagens como a facilidade de manipulação e manutenção em laboratório, capacidade de suportar amplas faixas de pH (2,0 a 8,5) e não oferece riscos aos seres humanos durante o seu processo de manipulação. O seu uso já é amplamente estudado e conhecido como pesticida natural, por ser um fungo classificado como entomopatogênico e atacar mais de 300 espécies de insetos^{67,68}. Seu crescimento se dá em forma de hifas, o que pode facilitar o processo de degradação e crescimento interno ao polímero pois, uma vez havendo

qualquer fissura na superfície do material, as hifas conseguem penetrar até a matriz. Outra vantagem e característica importante desse fungo é o desenvolvimento de uma estrutura chamada apressório (Figura 8), que ocorre na extremidade da hifa e exerce pressão mecânica sobre a superfície no qual está aderido, secretando enzimas que são exploradas na indústria catalítica^{29,66,69}.

A utilização de duas linhagens de *Metarhizium anisopliae* foi avaliada na biodegradação de alguns polímeros, sendo comprovado seu crescimento e desenvolvimento na superfície de PHB, PU e PSU e a degradação dos mesmos observada através de diversas análises, incluindo Tof-SIMS^{46,49,70}.

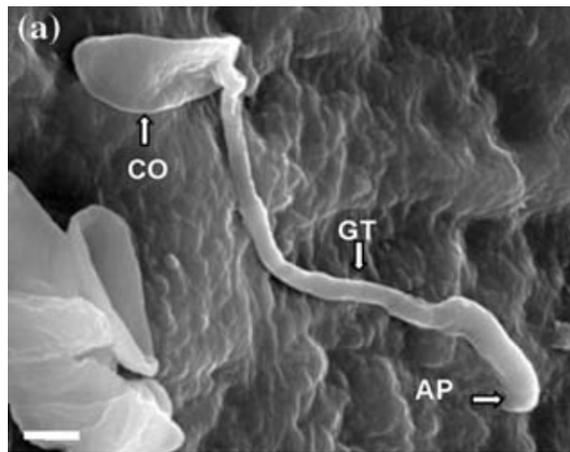


Figura 8. Imagem de microscopia eletrônica de varredura do esporo do *Metharizium anisopliae* em desenvolvimento. CO: esporo (conídica), GT: hifa, AP: apressório⁶⁹.

2.6. BIOPOLÍMEROS E BIODEGRADAÇÃO

De acordo com Rieger⁷¹, biopolímeros são classificados como macromoléculas principalmente derivadas de fontes renováveis, que podem ser degradadas enzimaticamente ou hidroliticamente em produtos de menor peso molecular. Estas partes podem ser reabsorvidas por microorganismos, que idealmente as convertem em CO₂ e água. Uma das maiores vantagens dos biopolímeros, frente aos polímeros sintéticos, é, sem dúvida, a sua rápida degradação quando em ambiente propício. Apesar disso, sua aplicação ainda é restrita a poucas áreas e seu valor ainda muito elevado. O exemplo mais comum de biopolímero é o PHB (Figura 9), que provém da superalimentação de bactérias, que armazenam energia sob a forma de poliéster, podendo ser citados outros, como o poliácido láctico (PLA), PVA e poli(ε-caprolactona)

(PCL).⁷² O PHB, por ser um polímero sabidamente biodegradável, será utilizado no presente trabalho como amostra padrão de biodegradação do ensaio em solo simulado.

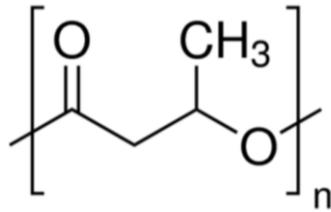


Figura 9. Representação do monômero do PHB.

Para Chandra e Rustgi a biodegradação é um processo natural em que materiais químicos orgânicos, no meio ambiente, são convertidos em compostos simples, mineralizados e redistribuídos através de ciclos elementares, como os ciclos do carbono, nitrogênio e enxofre. A biodegradação pode apenas ocorrer na biosfera, com micro-organismos atuando de forma central no processo²⁵. Diversas definições sobre o que é biodegradação polimérica e plásticos biodegradáveis são encontradas na literatura. De acordo com a ISO (International Organization for Standardization) 472:1988, é um plástico desenhado para sofrer uma mudança significativa em sua estrutura química sob condições ambientais específicas, resultando na perda de diversas propriedades que podem ser medidas por métodos padrões de testes apropriados aos plásticos e aplicação num período determinado de tempo que determina sua classificação. A mudança na estrutura química é resultante da ação natural de micro-organismos⁷³. Na norma D883-12 da ASTM (American Society for Testing and Materials), temos a definição de plástico degradável, que é exatamente a mesma definição da ISO 472:1988, acrescida da definição de plástico biodegradável, determinando que este é um plástico degradável em que a degradação resulta da ação natural de micro-organismos, como bactérias, fungos e algas⁷⁴. A ISO 472:1988 foi atualizada e a sua mais recente versão, ISO 472:2013, define biodegradação como degradação causada por atividade biológica, especialmente por ação enzimática, levando a uma mudança significativa na estrutura química do material. Além disso, define como reciclagem biológica o tratamento aeróbico (compostagem) ou anaeróbico (digestão) de restos de plásticos biodegradáveis sobre condições controladas, usando micro-organismos para produzir, na presença de oxigênio,

resíduos orgânicos estáveis, dióxido de carbono e água ou, na falta de oxigênio, resíduos orgânicos estáveis, metano, dióxido de carbono e água⁷⁵.

Segundo Mueller, a degradação dos polímeros ocorre quando os micro-organismos conseguem encontrar um substrato adequado, excretando diversas proteínas capazes de interagir com o substrato, que clivam as cadeias poliméricas, gerando uma erosão na superfície do polímero, o que está exemplificado na Figura 10⁷⁶.

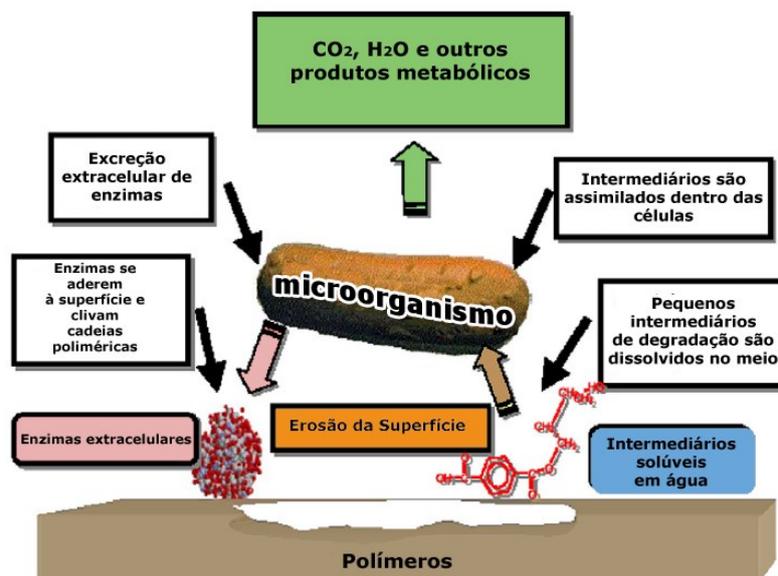


Figura 10. Representação da ação de micro-organismos na degradação de polímeros⁷⁶.

Muitas são as técnicas utilizadas para avaliar a biodegradação de polímeros, sendo a degradação em solo a mais utilizada e recomendada por normas internacionais⁷⁷⁻⁷⁹. É um método complexo que permite o estudo de um consórcio de micro-organismos e um maior entendimento da biodegradação em situações reais de compostagem, como acontece em aterros sanitários, porém há um grande número de variáveis a serem controladas, como tempo de contato com o solo, tipo e composição do solo, umidade, quantidade de ácidos húmicos, quantidade e tipos de micro-organismos, bem como quais enzimas estes secretam e quais realmente estão atuando na biodegradação⁸⁰⁻⁸⁴. Para evitar a grande quantidade de interferências que a biodegradação em solo simulado pode apresentar, outra técnica reconhecida e muito utilizada é a *plate test*, teste em petri ou teste *in vitro*⁸⁵, onde há o controle dos

micro-organismos inoculados, temperatura e umidade, mas pode não representar exatamente a secreção de enzimas que os mesmos fungos ou bactérias teriam num ambiente real⁸⁶.

Estudos de modificação superficial de PHB foram realizados e indicaram um aumento na sua biodegradação^{82,87,88}. Amostras injetadas de PHB foram expostas a biodegradação em ensaio de solo simulado por 5 meses, obtendo resultados que sugerem uma degradação camada-por-camada, com perda de massa significativa e aumento da rugosidade⁸⁹. Amostras de PHB, poli(hidroxi-butarato-co-valerato) (PHBV) e PCL foram cultivadas em reatores microbiológicos e simulação de aterro, obtendo degradação após 30, 122 e 200 dias, respectivamente⁹⁰. Diferentes embalagens de PLA foram colocadas em compostagem em ambiente externo, onde se concluiu que pH, umidade e temperatura do solo apresentam papel fundamental na biodegradação deste polímero biodegradável, obtendo total degradação em 30 dias⁹¹. A biodegradação de blenda de PP e amido foi avaliada em solo ao relento e em laboratório, onde se comprovou a dependência da absorção de água e das condições ambientais para ocorrer a perda de massa⁹². Filmes de poliésteres aromáticos e alifáticos foram submetidos à degradação por 40 semanas em solo com simulação solar e, após a oitava semana, houve uma degradação significativa, avaliada pelas suas propriedades mecânicas⁹³. Darby e Kaplan demonstraram que poli(uretano-éster)s podem sofrer ataques fúngicos, mas poli(uretano-éter)s são resistentes a estes ataques⁹⁴. Vários pesquisadores sugeriram que o ataque microbiano ao PU se deve à ação enzimática de hidrolases, como ureases, proteases e esterases^{95,96}. Huang e Roby observaram que a degradação do PU procede de maneira seletiva, com as regiões amorfas sendo degradadas prioritariamente frente às regiões cristalinas⁹⁷. O estudo de Bentham mostra a influência do estresse mecânico no aumento da degradação em relação ao polímero não estressado, comprovando visualmente e por medidas físicas²². Russell e colaboradores estabeleceram uma alta atividade de degradação do PU sob condições anaeróbicas, onde o polímero serviu como única fonte de carbono para o fungo se desenvolver. O trabalho foi o primeiro a demonstrar que fungos endofíticos podem ser potencialmente aplicados em biorremediações⁹⁸. O *Metarhizium anisopliae* foi utilizado para estudar a biodegradação de filmes de PU modificados com irradiação UV na presença de ácido acrílico, demonstrando que o PAA foi utilizado pelo micro-organismo como substrato inicial de alimentação e, após desenvolvimento, conseguir adentrar na matriz polimérica, biodegradando-a⁹⁹. Filmes

de PSU foram modificados com irradiação UV na presença de oxigênio e incubadas com *Metarhizium anisopliae* por 30 e 60 dias, obtendo-se mudanças significativas na química superficial do polímero, avaliada por FTIR e uma queda na massa molecular média das amostras após os cultivos, indicando a possibilidade do micro-organismo degradar um polímero sintético modificado⁴⁶.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

Ativação superficial de filmes de PSU por radiação UV na presença de atmosferas reativas, que permitam induzir mecanismos naturais de biodegradação pela ação de fungos e outros micro-organismos.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterização das superfícies antes e após os tratamentos fotoquímicos;
- Avaliação da influência da modificação da superfície de filmes do polímero sintético PSU em condições de biodegradação fúngica *in vitro*, utilizando a linhagem CG97 do fungo filamentosso *Metarhizium anisopliae*;
 - Caracterização por FTIR-ATR, SEM, Perfilometria óptica, Microscopia óptica, TGA, GPC e Gravimetria dos filmes antes e após os períodos de incubação fúngica;
 - Avaliação da influência da modificação da superfície de filme de PSU em condições de biodegradação em solo simulado;
 - Caracterização por. FTIR-ATR, SEM, Perfilometria óptica, Microscopia óptica, TGA, GPC e Gravimetria dos filmes antes e após os períodos de biodegradação em solo simulado;
 - Identificação morfológica dos micro-organismos presentes no solo.

4. METODOLOGIA

4.1. PREPARO DOS FILMES

Para evitar contaminações, todos os instrumentos e materiais utilizados foram lavados com uma sequência de três solventes, em ordem crescente de suas polaridades: Heptano (Synth) 99,0%, Clorofórmio (Fmaia) 99,8% e Álcool Isopropílico (Synth) 99,5%.

Os polímeros utilizados foram PHB (Sigma Aldrich, UK) e PSU Mw ~35000 e Mn ~16000 (Sigma Aldrich, USA). Para as soluções de PSU e PHB utilizou-se Clorofórmio FMaia (99,8%). Os gases, Oxigênio 99,99% e Nitrogênio 99,99% (Air Liquide Brazil Ltda.), foram utilizados como recebidos. Utilizou-se, também, Ácido Acrílico (Merck S.A.) >99%.

As amostras foram preparadas pela técnica de *casting* (evaporação do solvente) em placas de petri, utilizando-se soluções 4% (m/v) em clorofórmio de PSU, obtendo-se filmes de espessura média de 100 μm . As amostras de PHB, utilizadas como padrão de biodegradação no solo simulado, foram preparadas a partir de soluções 2% (m/v) de PHB em clorofórmio, obtendo-se filmes de espessura média de 50 μm .

4.2. FOTOFUNCIONALIZAÇÕES

As irradiações com luz UV foram realizadas em um reator de bancada, composto por uma caixa retangular em alumínio, com controles de entrada e saída dos gases e 5 lâmpadas germicidas de 6 W. Para as amostras de PSU tratadas com Ácido Acrílico, o sistema foi adaptado com um segundo reator interno (Figura 11), com janela de quartzo e fluxo de N_2 de 1 cm^3/s , utilizado para introduzir os vapores do AA.

Os tempos de irradiação das amostras de PSU com AA foram de 0, 10 e 30 minutos. As fotólises em atmosfera de O_2 , com um fluxo de 3 cm^3/s , ocorreram nos tempos 0, 30 e 120 minutos.

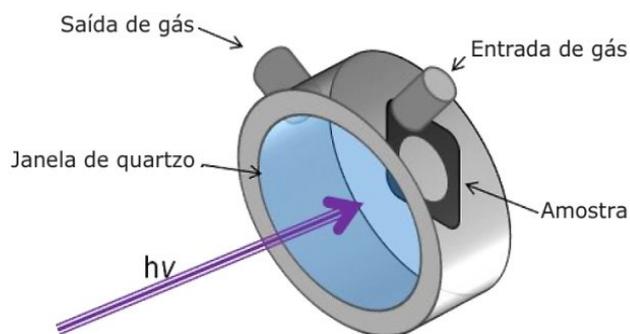


Figura 11. Esquema do reator utilizado nas fotólises com atmosfera de vapor de AA.

4.2.1. Caracterização dos Filmes

- **Ângulo de Contato em Água (WCA – *Water Contact Angle*):** Técnica utilizada para determinar o grau de molhabilidade de uma superfície, caracterizando-a como hidrofóbica ou hidrofílica. O WCA de amostras não tratadas e tratadas foram medidos à temperatura ambiente usando o método da gota sésil, que consiste em depositar gotas de água deionizada sobre as amostras. Para cada amostra foram depositadas três gotas, em diferentes posições da amostra, para avaliar homogeneidade do filme. As imagens foram digitalizadas utilizando o equipamento Krüss DSA 30 e software “Drop Shape Analysis System” e analisadas três vezes cada gota pelo software SurfTens v 4.5.
- **Microscopia Eletrônica de Varredura (SEM – *Scanning Electron Microscopy*):** A análise consiste na incidência de um feixe de elétrons de alta energia sobre a superfície da amostra, em sistema sob vácuo. Uma parte desses elétrons é refletida e coletada por um detector, que converte o sinal em imagens de elétrons retro espalhados. Outros elétrons interagem com a amostra, gerando emissão de elétrons secundários, que também são detectados e produzem imagens de elétrons secundários. As amostras sem tratamento e fotolisadas, após metalização com ouro, foram analisadas no Centro de Microscopia Eletrônica da UFRGS (CME), utilizando o microscópio JEOL – JSM 6060, e no Centro de Nanociência e Nanotecnologia (CNANO), utilizando o microscópio EVO CARL ZEISS, ambos com tensão de 5 kV e ampliações entre 1000 e 25000 vezes.

- **Perfilometria Óptica:** O perfil da superfície polimérica antes e após as fotólise foi avaliado com esta técnica, capaz de criar imagens a partir da interferência da luz com a amostra. O equipamento utilizado foi o perfilômetro óptico Contour GT-K da Bruker e as análises de rugosidade e topografia foram obtidas utilizando software Vision 64. A rugosidade, ou perfil linear, é definida por Hutchings como irregularidades de pequena escala em uma superfície, representado em escalas distintas para as direções vertical e horizontal. A rugosidade média (R_a) é expressa como a média dos valores absolutos das ordenadas de afastamento, dos pontos do perfil de rugosidade em relação à linha média, dentro do percurso de medição, sendo a rugosidade média quadrática (R_q) o desvio médio quadrático correspondente ao R_a^{100} .
- **Espectroscopia Vibracional no Infravermelho por Transformada de Fourier – Refletância Total Atenuada (FTIR-ATR – *Fourier Transformed Infrared Spectroscopy – Attenuated Total Reflectance*):** Esta técnica permite a identificação de funcionalidades orgânicas presentes em uma superfície. As análises de FTIR-ATR foram realizadas utilizando um aparelho modelo Alpha-P (Bruker) com um prisma de diamante, a 45° e uma resolução espectral de 4 cm^{-1} e 24 varreduras para cada amostra.
- **Difração de Raios X (XRD – X-Ray Diffraction):** Técnica que, indiretamente, pode ser utilizada para identificar o grau de cristalinidade de um polímero, consiste na incidência de raios X na amostra, variando-se o ângulo desta incidência e, a partir da interação da radiação com os átomos da matéria, estes são difratados e detectados. Utilizando da Lei de Bragg, é possível calcular a distância interplanar e determinar a cristalinidade do material analisado. As análises foram realizadas utilizando um difratômetro Siemens D-500, no modo reflexão com ângulo incidente de $1,54\text{Å}$, radiação de $\text{Cu K}\alpha$ e ângulo 2θ variando de 0° à 50° .
- **Calorimetria Diferencial Exploratória (DSC - Differential Scanning Calorimetry):** A cristalinidade ou ausência da mesma, bem como os efeitos que a fotólise poderia ocasionar nos filmes poliméricos pode ser explorada por esta técnica, que se baseia na variação da entalpia das variações químicas e/ou físicas do material, fornecendo os valores de transição vítrea (T_g), temperatura de fusão (T_m) e

crystalinidade (T_c), quando for o caso. Foi utilizado o DSC Q20, da TA Instruments, onde as amostras foram aquecidas da temperatura ambiente até 350°C numa taxa de 10°C/min, mantidas por 5 minutos à 350°C, resfriadas na mesma taxa anterior até 25°C, novamente mantidas por 5 minutos nessa temperatura e, após, um novo aquecimento até 300°C numa taxa de 20°C/min.

- **Análise Termogravimétrica (TGA - Thermogravimetric Analysis):** Técnica que permite a determinação de variações da massa das amostras em função da temperatura, indicando a faixa de temperatura em que a composição química fica fixa e constante, temperatura de início de decomposição do material e reações de oxidação, desidratação, etc. Para esta análise se utilizou o Q50, da TA Instruments, submetendo as amostras à uma isoterma de 5 minutos em 25°C e um aquecimento de 20°C/min até 900°C.

- **Cromatografia de Permeação em Gel (GPC - Gel Permeation Chromatography):** Este tipo de cromatografia é utilizado para a determinação de características estruturais das cadeias poliméricas como a massa molecular média, o número médio de monômeros, etc. A avaliação da massa molecular ponderal média (M_w), massa molar numérica média (M_n) e o índice de polidispersividade (PDI) foi realizada por cromatografia de permeação em gel com um cromatógrafo da Central Analítica do Instituto de Química da UFRGS, modelo Viscotek VE 2001 com detector triplo (Índice de Refração, Viscosimétrico e por Espalhamento de Luz) Viscotek TDA 302, e uso de THF como eluente, a um fluxo de 1 mL.min⁻¹ e colunas de PS/DVB à 45°C. A M_n é definida como a massa molar de todas as cadeias, dividida pelo número total de cadeias presentes na amostra polimérica, indicando o número médio de cadeias presentes. M_w é outra forma de se calcular a massa molar média, onde a massa das cadeias poliméricas é o mais importante. A distribuição ponderal dessas massas, obtidas pelo GPC, são representadas em uma curva de distribuição de massa molar. Quanto mais estreita a curva, mais similares são os tamanhos das cadeias poliméricas. Quanto mais larga é esta distribuição, maior o valor do PDI e maior a quantidade de fragmentos de tamanhos diferentes de cadeias de polímeros estão presentes na amostra¹⁰¹.

4.3. ENSAIO DE BIODEGRADAÇÃO FÚNGICA

Todos os ensaios biológicos foram realizados no Laboratório de Fungos de Importância Médica e Biotecnológica, do Departamento de Biologia Molecular, localizado no Centro de Biotecnologia da UFRGS, sob orientação e colaboração da Profa. Dra. Marilene Henning Vainstein.

4.3.1. Linhagem do Fungo

Neste trabalho foi utilizada a linhagem CG97 do fungo filamentososo da espécie *Metarhizium anisopliae*, disponibilizado pelo Laboratório de Fungos de Importância Médica e Biotecnológica. A linhagem foi isolada de *Coleopteros* oriundos de Brasília e mantida em meio Cove Completo (MCC) (glicose 1%; NaNO₃ 0,6%; peptona 0,2%; extrato de levedura 0,05%; triptona 0,15% e ágar 1,5% (m/v)). Após esterilização em autoclave foram adicionados ao meio, também esterilizado, 2% de solução salina (KCl 2,6%; MgSO₄.7H₂O 2,6%; KH₂PO₄ 7,6% (m/v)) e 0,04% de solução de elementos traços (Na₂B₄O₇ 0,004%; CuSO₄ 0,04%; FeSO₄ 0,001%; MgSO₄ 0,08% e ZnSO₄ 0,08% (m/v)). As culturas foram incubadas em estufa a 28°C por sete dias e após armazenadas a 4°C.

4.3.2. Suspensão de Esporos do *M. anisopliae*

Para a preparação da suspensão de esporos, a linhagem CG97 foi repicada a partir de colônias de estoque do fungo e cultivadas em frascos falcon (Figura 12), contendo MCC, por aproximadamente 10 dias, à 28°C. Após a incubação, os esporos foram ressuspensos em solução estéril de Tween 80 0.01%, com o auxílio de alça de Drigalsky. A suspensão foi centrifugada por 5 minutos a 7000 rpm, o centrifugado lavado com água destilada estéril e novamente centrifugada. Após, os esporos foram novamente ressuspensos em 5mL de água destilada estéril e contados em câmara de Neubauer.

4.3.3. Condições de Cultivo do Fungo

O meio mínimo de cultura (MMC) foi utilizado para avaliar o comportamento de crescimento do fungo em todas as amostras, contendo, em massa por volume, glicose 1%, NaNO_3 0,6% e ágar 1,5%. A esse meio estéril foram adicionados solução salina e elementos traço, também esterilizados, conforme descrito anteriormente no item 4.3.1. As amostras de PSU, tratadas e não tratadas, foram lavadas com etanol 70% e colocadas em placas de petri contendo o MMC. O teste de biodegradação foi realizado em triplicata, com a adição de solução contendo 10^7 esporos ressuspensos do fungo, inoculados nos filmes e incubados à 28°C por 10 e 30 dias. Após o tempo de incubação, os filmes foram novamente lavados com etanol 70% para cessar a atividade do fungo na superfície polimérica. As amostras foram submersas em água destilada e lavadas com auxílio de ultrassom por 15 minutos. Placas não inoculadas foram consideradas como controle da experiência.



Figura 12. Cultivo do *Metarhizium anisopliae* em frasco falcon.

4.4. ENSAIO DE BIODEGRADAÇÃO EM SOLO SIMULADO

4.4.1. Condições Gerais do Ensaio

O solo simulado consiste em fertilizante orgânico composto de lodo de estação de tratamento de efluentes de indústria de celulose e substrato de casca de eucalipto fermentada. Adquirido em comércio local, possui as seguintes informações em rótulo:

- Capacidade de retenção de água = 45%
- Condutividade elétrica = $2,10 \pm 0,3$ mS/cm
- Densidade seca = 500 Kg/m³
- Umidade máxima = 50%
- pH = $7,2 \pm 0,5$

Os filmes poliméricos foram enterrados em 100g de solo e avaliados durante 1, 2, 4 e 10 semanas, mantidos em temperatura constante de 28°C com o auxílio de um banho termostático, protegidos da luz e com monitoramento da umidade relativa. Após os períodos de estudo, foram desenterrados, lavados com etanol 70% e água destilada e deixados em dessecador para posteriores análises.

4.4.2. Isolamento e Identificação dos micro-organismos presentes no Solo Simulado

Para a identificação dos micro-organismos presentes do solo simulado placas foram preparadas para o crescimento das bactérias com o meio de cultivo Caldo LB (peptona 1%, NaCl 1%, levedura 0,5%, ágar 1,5% (m/V)), e, para o cultivo de fungos, placas com o meio de cultivo SB (glicose 2%, peptona 1%, ágar 1,5%, clorofenicol 0,005% (m/V)).

Aproximadamente 5 gramas do solo foram solubilizados em 30 mL de solução 0,9% NaCl. Desta solução foi retirada uma alíquota de 0,1 mL e adicionada em um eppendorf contendo 0,9 mL da solução de NaCl, repetindo-se essa solubilização por 6 vezes, a fim de se obter soluções com diferentes concentrações. De cada eppendorf retirou-se 50 µL e, com auxílio de alça de Drigalsky, a solução foi espalhada nas

placas contendo os meios LB e SB. As placas com meio LB foram mantidas à 28°C por 24 horas para o desenvolvimento das bactérias e as placas com meio SB mantidas na mesma temperatura por 7 dias para o crescimento dos fungos¹⁰².

Para isolar os micro-organismos que cresceram nas placas, pegou-se uma porção de cada colônia com o auxílio de uma alça plástica e, através da técnica de esgotamento, espalhou-se as porções em placas com os meios de cultivo correspondentes para fungos e bactérias.

Após a técnica de espalhamento, conseguiu-se isolar sete micro-organismos, sem nenhuma contaminação das placas de cultivo. Para a análise das placas contendo bactérias foi realizado o teste de Coloração de Gram, que consiste na pigmentação da parede celular dos micro-organismos com soluções de Cristal-Violeta (cristal-violeta 10g/L, álcool etílico absoluto 100ml/L, oxalato de amônio 8 g/L, água purificada q.s.p. 1000 mL), Lugol 1% (lugol forte 500 mL/L e água purificada q.s.p. 1000 mL), Descolorante para Gram (acetona PA 300 mL/L e álcool etílico absoluto 700 mL/L) e Fucsina fenicada (fucsina básica 1 g/L, fenol 5 ml/L, álcool etílico 10 ml/L e água purificada q.s.p. 1000 mL). Esta análise caracteriza as bactérias como positivas ou negativas, tendo as primeiras uma camada celular extra, rica em peptidoglicano¹⁰³.

4.5. CARACTERIZAÇÃO DOS FILMES PÓS-ENSAIOS DE BIODEGRADAÇÃO

- **Gravimetria:** A gravimetria consiste em analisar perdas ou ganhos de massa das amostras após as inoculações com o fungo. Foi utilizada balança com precisão analítica (0.0001g) para essa determinação, após as amostras serem lavadas em ultrassom com água destilada e armazenadas em dessecadores até a retirada completa da umidade residual. A porcentagem de perda de massa foi calculada ao utilizar as massas iniciais e finais de cada amostra.
- **Microscopia Óptica:** As análises foram realizadas com uma magnificação de 40 vezes em microscópio óptico Zeiss – modelo Axioskop 40.
- **SEM, Perfilometria Óptica, FTIR-ATR, TGA e GPC:** idem ao tópico em 4.2.1.

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1. CARACTERIZAÇÃO DOS FILMES

Os ângulos de contato de todas amostras de PSU foram medidos antes e depois das fotólises, a fim de monitorar as mudanças na hidrofobicidade da superfície. Os dados foram obtidos em triplicatas sobre cada amostra e, cada réplica submetida à 3 medidas de ângulo. Os valores médios encontrados são mostrados na Figura 13.

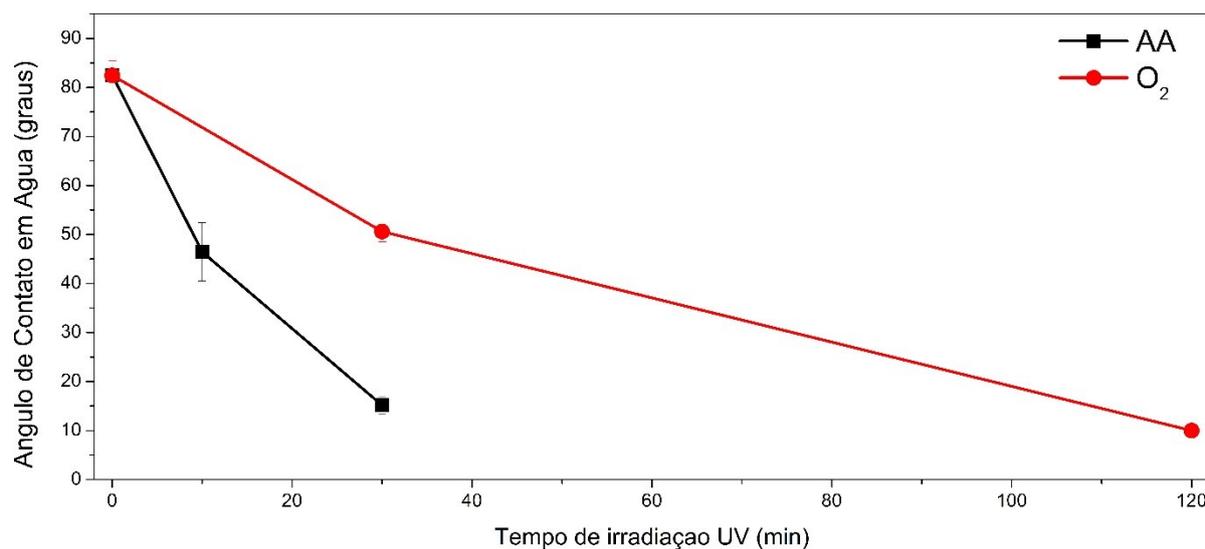


Figura 13. Ângulo de contato em água das amostras de PSU tratadas com AA e O₂, em função do tempo de irradiação UV.

O PSU, polímero inicialmente com características pouco hidrofílicas ($82 \pm 3^\circ$), adquire molhabilidade em função do tempo de exposição à luz UV. A exposição com vapor de AA por 30 minutos de UV dos filmes chega a um ângulo mínimo de $15 \pm 2^\circ$, enquanto a exposição por 120 minutos de UV e O₂ garante aos filmes um caráter superhidrofílico, caracterizado por ângulos menores que 10° . Tais valores encontrados estão de acordo com a literatura^{17,18}.

As análises de FTIR-ATR foram realizadas após a lavagem das amostras e depois de serem deixadas em dessecador para retirar qualquer vestígio de água remanescente. O espectro de infravermelho do PSU sem tratamento (Figura 14) apresenta bandas características de deformações simétricas e assimétricas das ligações C-H de cadeias alifáticas e de anéis aromáticos entre 3100 e 2800 cm^{-1} . As

ligações C=C de aromáticos aparecem em 1582, 1503 e 1484 cm^{-1} , assim como as deformações características dos substituintes dos anéis (δ (C-H)) são localizados em 872 e 852 cm^{-1} . As ligações C-O-C encontram-se no pico intenso em 1234 cm^{-1} , com uma banda simétrica em 1120-1060 cm^{-1} . Grupos sulfônicos são representados pelos picos 1322 e 1293 cm^{-1} ($\nu_{\text{asy}} \text{O}=\text{S}=\text{O}$) e 1167 e 1147 cm^{-1} ($\nu_{\text{sym}} \text{O}=\text{S}=\text{O}$)¹⁰⁴⁻¹⁰⁶.

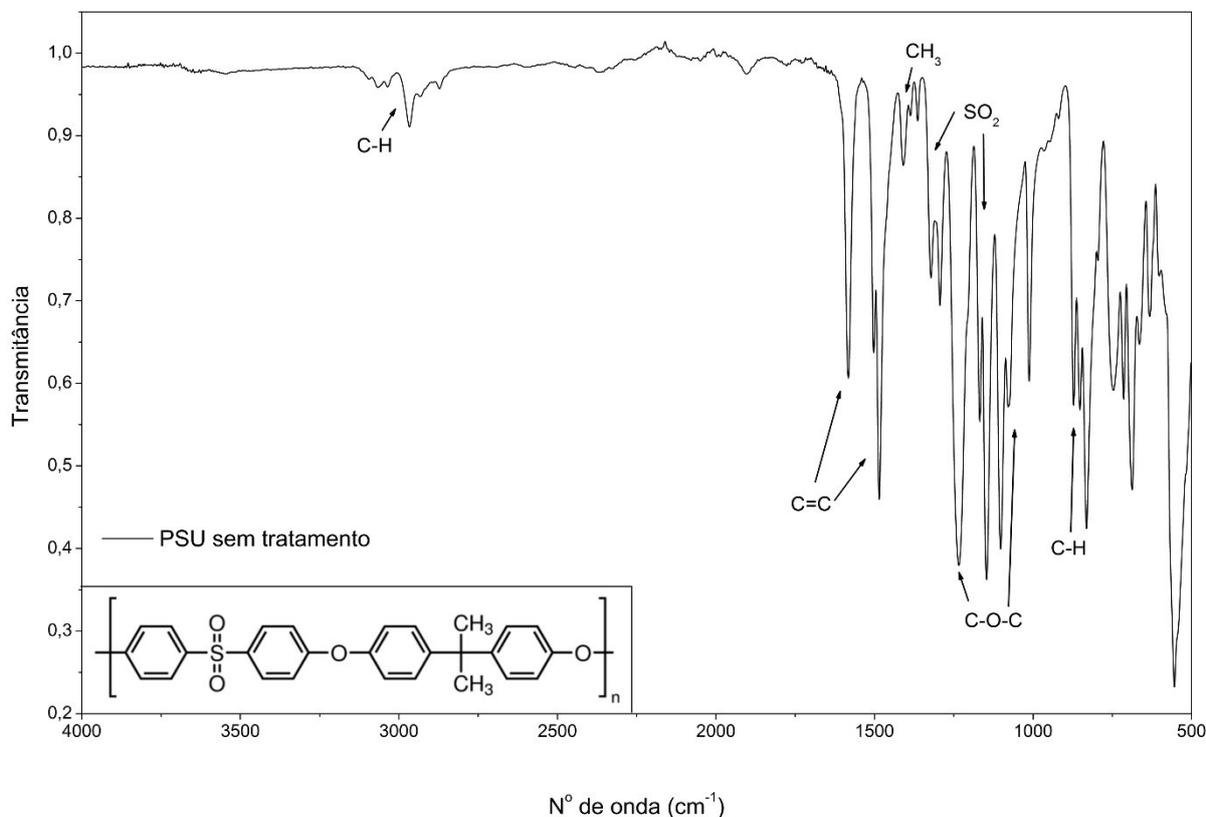


Figura 14. Espectro de FTIR de um filme de PSU.

O filme de PAA, fotopolimerizado sobre lamínula de vidro no mesmo sistema utilizado para as amostras, também foi caracterizado por FTIR. Suas bandas principais estão descritas na Tabela 1^{104,107-109} e o espectro representado na Figura 15.

Após as fotólises, as amostras foram analisadas novamente por FTIR-ATR a fim de identificar se ocorreu o enxerto de novos grupamentos na superfície das mesmas. A Figura 16 mostra os espectros de FTIR-ATR das amostras de PSU sem tratamento e tratadas com O₂ em presença de radiação UV durante 30 e 120 minutos. Pode-se observar o surgimento de uma banda na região de 3700-3100 cm^{-1} ,

característica de estiramento de grupos OH. Além disso, um pico localizado em 1722 cm^{-1} , característico de ν C=O, começa a surgir com 30 minutos de fotólise, mas sua presença é maior em 120 minutos de tratamento. Os picos em 1409 e 1364 cm^{-1} , que podem ser atribuídos às deformações simétricas e assimétricas δ (CH_3)¹⁰⁴ do PSU, começam a ser sobrepostos aos picos relacionados às ligações C-O e O-H, que, assim como o surgimento da carbonila, aumentam em função do tempo da fotólise. Há também aumento na intensidade dos sinais dos grupos éter e nos picos entre em 990 e 700 cm^{-1} , normalmente indicando modificações nas substituições dos anéis aromáticos¹¹⁰. Observa-se, então, que quanto maior o tempo de tratamento, maior é a funcionalização superficial.

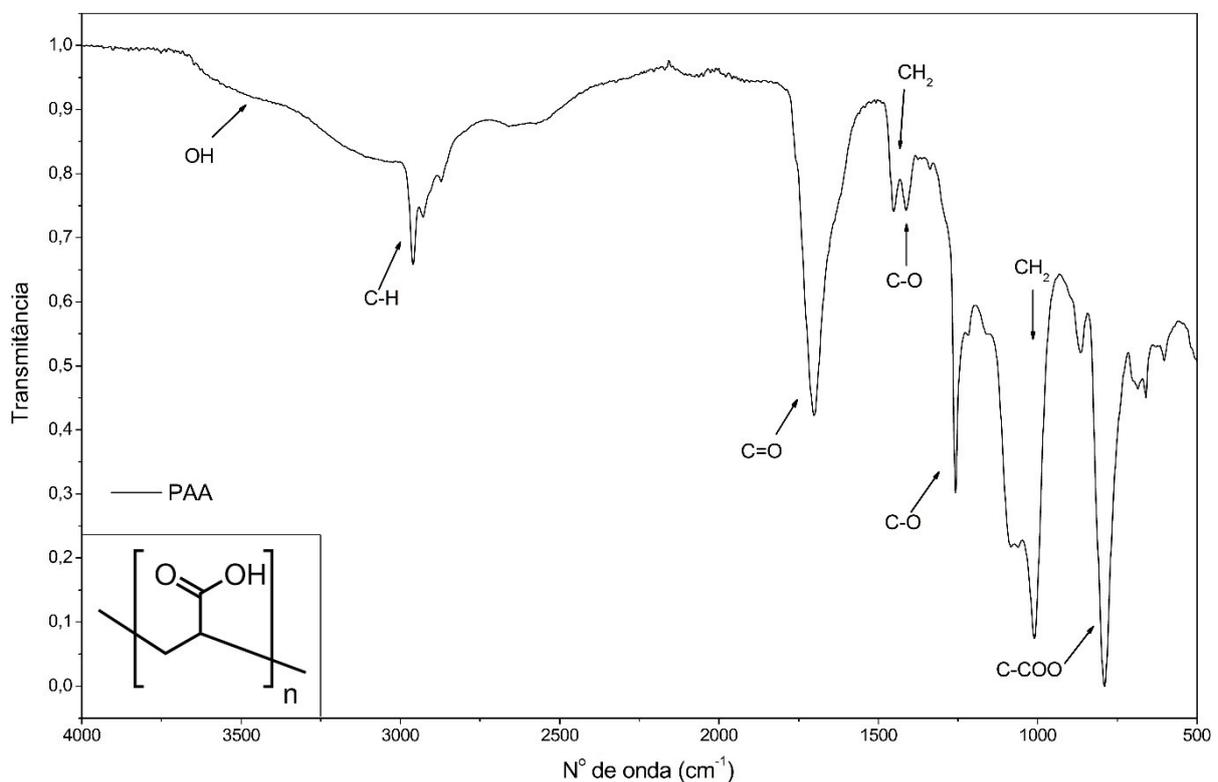


Figura 15. Espectro de FTIR de um filme de PAA.

Tabela 1. Bandas de um espectro de infravermelho do filme de PAA

Nº de onda (cm ⁻¹)	Atribuições
3687 – 2717	ν (O-H)
2959 – 2870	ν (C-H)
1702	ν (C=O) ou ν_{ass} (COO ⁻)
1450	δ (C-H)
1413	ν (C-O) + δ (O-H)
1258	ν (C-O) + δ (O-H)
1010	ρ (CH ₂)
789	ν (C-COO)

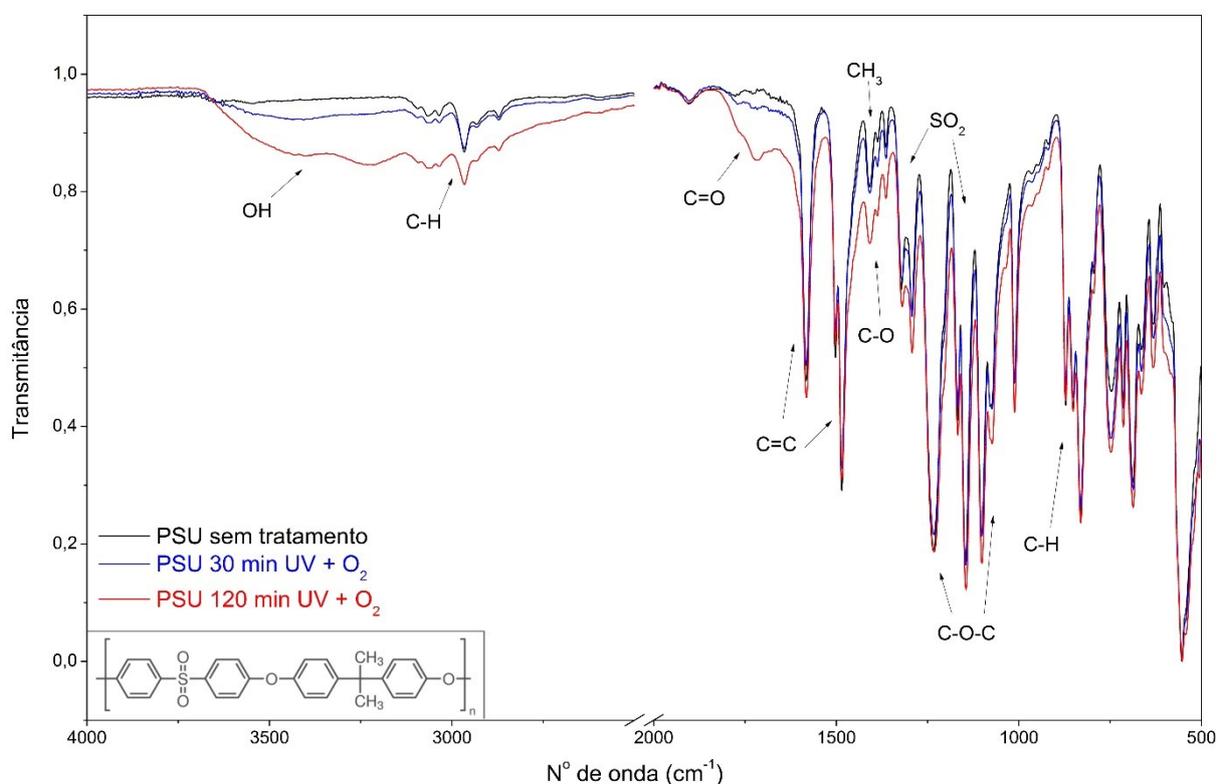


Figura 16. Espectro de infravermelho comparando o filme de PSU original com os filmes tratados com O₂, por 30 minutos e por 120 minutos.

Os espectros da Figura 17 se referem ao PSU sem tratamento e às amostras fotolisadas com AA. Assim como as amostras tratadas em atmosfera oxidante, há o surgimento de uma banda entre 3700 e 3100 cm^{-1} , indicando a presença de grupamentos oxigenados. Também surge, em função do tempo de irradiação, um pico na região característica das carbonilas (1720 cm^{-1}) e de ligações C-O (1408 cm^{-1} e 1362 cm^{-1}). Ambos sinais estão presentes no espectro do PAA puro, indicando que há o recobrimento do filme de PSU com o filme de PAA. Todos os sinais compreendidos na região de 1630 a 776 cm^{-1} diminuíram após as fotólises. Tal comportamento é relatado na literatura, mostrando que, conforme o aumento no tempo da fotólise e o aumento da espessura do filme de PAA sobre o PSU, os sinais característicos deste polímero diminuem, até que apenas o PAA seja identificado pela técnica de FTIR-ATR³¹.

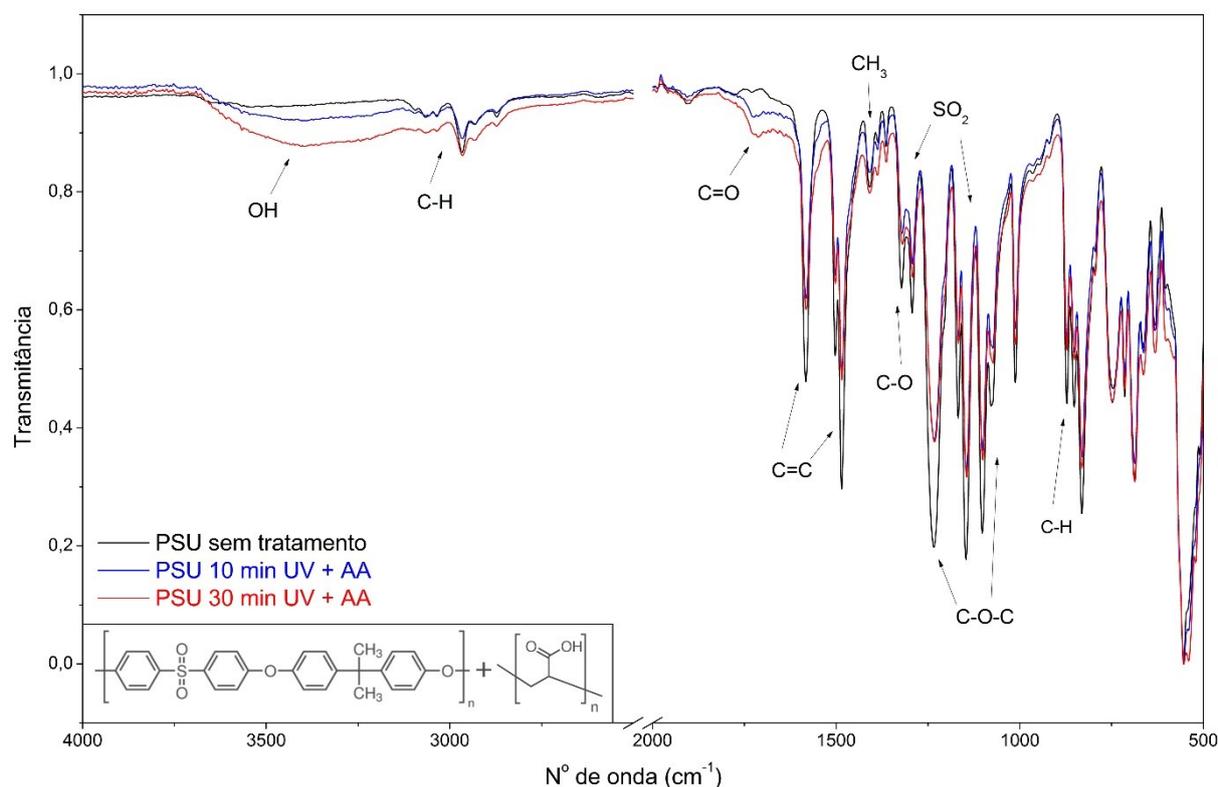


Figura 17. Espectro de infravermelho comparando o filme de PSU original com os filmes tratados com AA, por 10 minutos e por 30 minutos.

Os resultados obtidos através da técnica de FTIR-ATR corroboram com a diminuição do ângulo de contato em água encontrado nas análises de WCA. Para os dois métodos de modificação superficial, quanto maior o tempo de fotólise, mais

grupos oxigenados são enxertados nos filmes de PSU e maior é o caráter hidrofílico adquirido pela superfície das amostras.

Imagens de SEM (Figura 18) foram realizadas nos filmes de PSU antes e após cada um dos tratamentos. Para amostras sem tratamento e tratadas com AA não foram detectadas mudanças em sua morfologia, mas as imagens das amostras tratadas com O₂, principalmente transcorridos 120 minutos de fotólise, apresentam poros em sua superfície. Tal mudança também foi encontrada nas análises de perfilometria óptica (Figura 19).

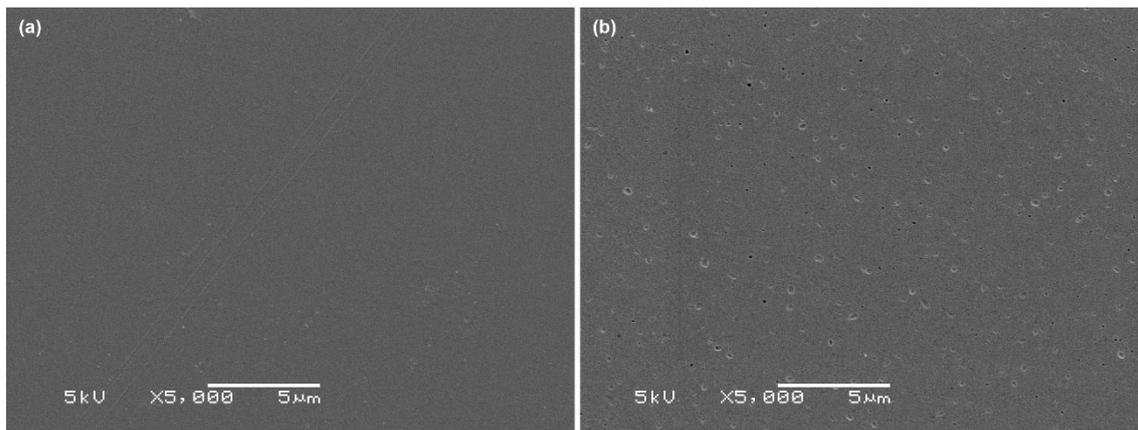


Figura 18. (a) Imagem de SEM do filme de PSU sem tratamento e (b) Imagem de SEM do filme de PSU após 120 minutos de fotólise na presença de O₂.

A rugosidade média e rugosidade média quadrática (Tabela 2) aumentaram quando o filme de PSU foi tratado por 120 minutos com O₂ e UV, em comparação aos valores obtidos para o filme sem tratamento. Isso se deve à presença dos poros visualizados tanto nas imagens de perfilometria óptica, quanto nas imagens de microscopia eletrônica. Este aumento da rugosidade e surgimento de poros de dimensão nanométrica podem ser explicados pela foto-oxidação da superfície do polímero. Outro fator a ser levado em consideração na oxidação do PSU é o aspecto amarelado que este adquire após o longo tempo de fotólise, devido à recombinação dos radicais fenila após a quebra das cadeias, iniciada pela incidência da radiação UV¹⁰⁵. A amostra tratada com AA apresenta uma diminuição na rugosidade em comparação ao PSU não tratado. Tal fato se dá pela fotopolimerização do monômero na superfície, criando um recobrimento de PAA sobre este, sendo este comportamento o esperado e citado na literatura^{9,13,17,44,111}.

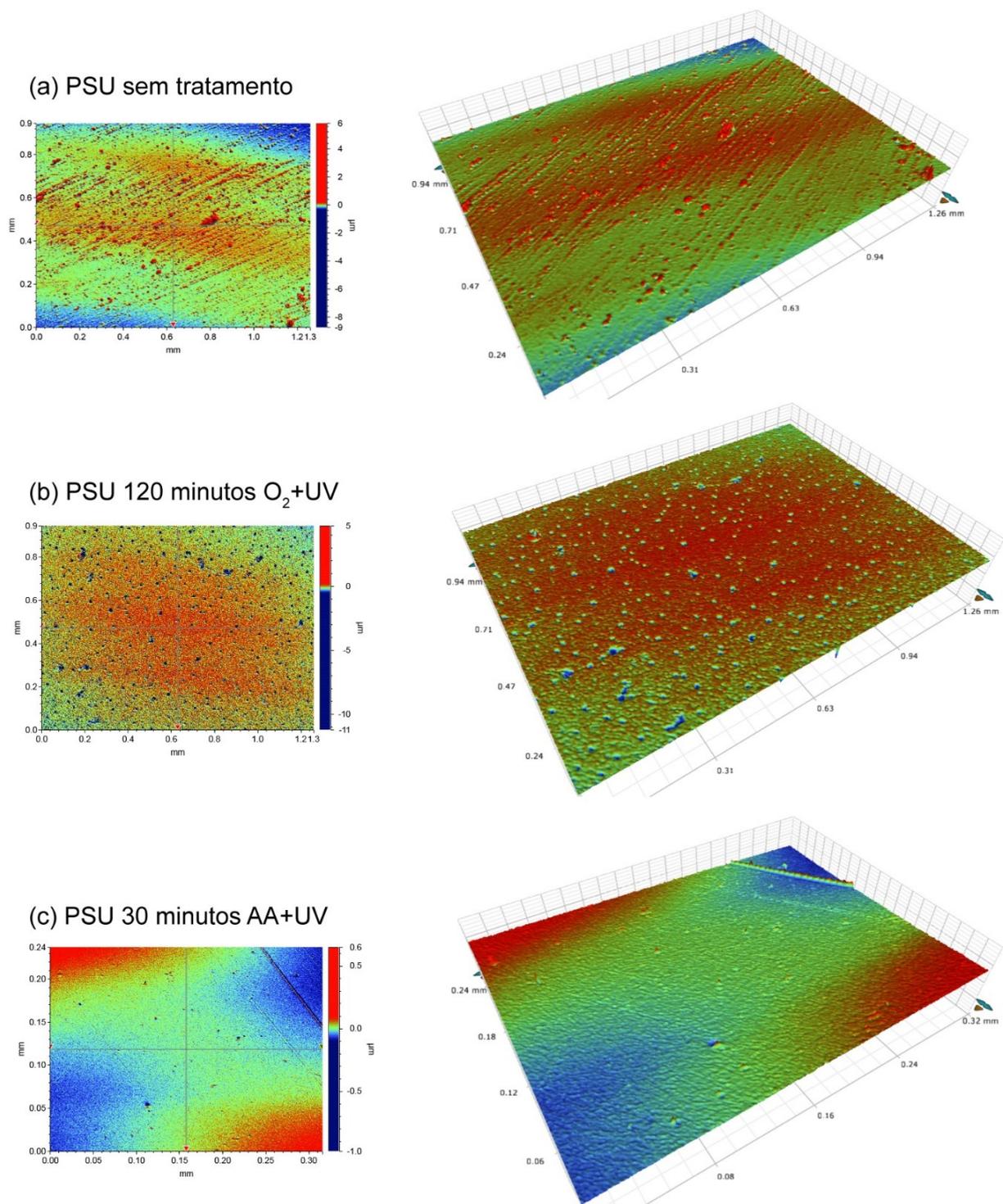


Figura 19. Imagens 2D (esquerda) e 3D (direita) dos filmes de PSU (a) sem tratamento, (b) após 120 minutos de fotólise com O₂ e (c) após 30 minutos de fotólise com AA.

Tabela 2. Medidas de rugosidade e da área superficial dos filmes de PSU antes e depois dos tratamentos, obtida por perfilometria óptica

Amostra	Rugosidade média – Ra (µm)	Rugosidade média quadrática – Rq (µm)
PSU ST	0,088 ± 0,009	0,135 ± 0,003
PSU 120 min O ₂ + UV	0,120 ± 0,004	0,193 ± 0,005
PSU 30 min AA + UV	0,031 ± 0,002	0,040 ± 0,001

Análises de XRD foram realizadas a fim de averiguar a cristalinidade, ou ausência dela, nos filmes de PSU. Sabe-se que a polisulfona é um polímero amorfo com banda característica próximo à $2\theta = 18^\circ$ ¹¹²⁻¹¹⁴. A Figura 20 mostra os difratogramas das amostras sem tratamento e as fotolisadas por 120 minutos com O₂ e 30 minutos na presença de AA. Não houve deslocamento da banda amorfa, mas sim um estreitamento da banda com relação ao polímero não modificado, indicando que ocorreu uma certa ordenação dos planos. Os tratamentos não modificam a amorficidade do material, que continua 100% amorfo.

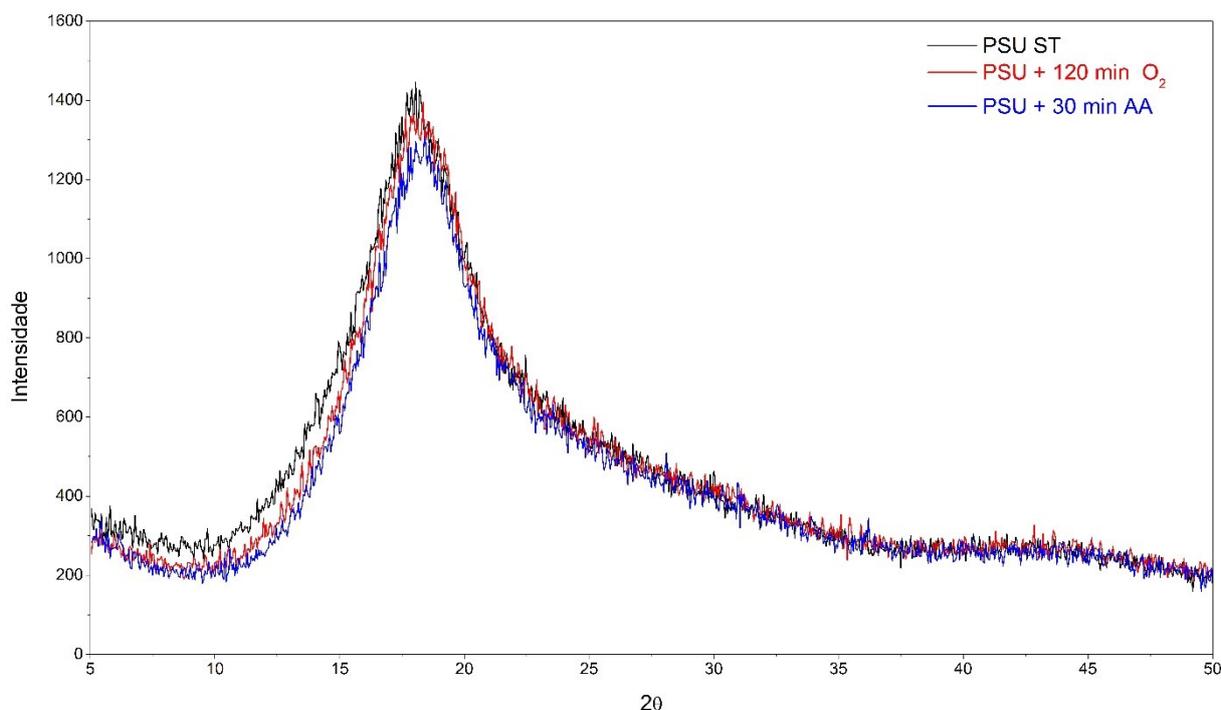


Figura 20. Difratogramas dos filmes de PSU sem tratamento, após 120 minutos de fotólise com O₂ e após 30 minutos de fotólise com AA.

Para avaliar se ocorreram mudanças além da superfície polimérica, análises das propriedades térmicas foram realizadas. A Figura 21 mostra as curvas obtidas por DSC, de onde não se pode retirar informações sobre a temperatura de fusão das amostras, por serem totalmente amorfas¹⁰¹. A informação útil a ser retirada desta análise é a temperatura de transição vítrea, que trata de uma transição termodinâmica de segunda ordem, a partir da qual as cadeias da fase amorfa do polímero adquirem mobilidade e energia suficiente para realizarem mudanças conformacionais^{101,115}. A T_g para o filme de PSU sem tratamento foi de 189,6°C, estando de acordo com a literatura¹¹⁶⁻¹¹⁸. O filme irradiado por 120 minutos na presença de oxigênio apresentou T_g de 189,2°C. Houve uma pequena variação na temperatura (188,5°C) e na taxa de calor necessária para alcançar a transição para a amostra fotolisada com AA, podendo ser atribuída à camada de PAA enxertada na superfície do polímero. A variação não é significativa, concluindo-se, mais uma vez, que não ocorreu modificação no bulk do material após o tratamento.

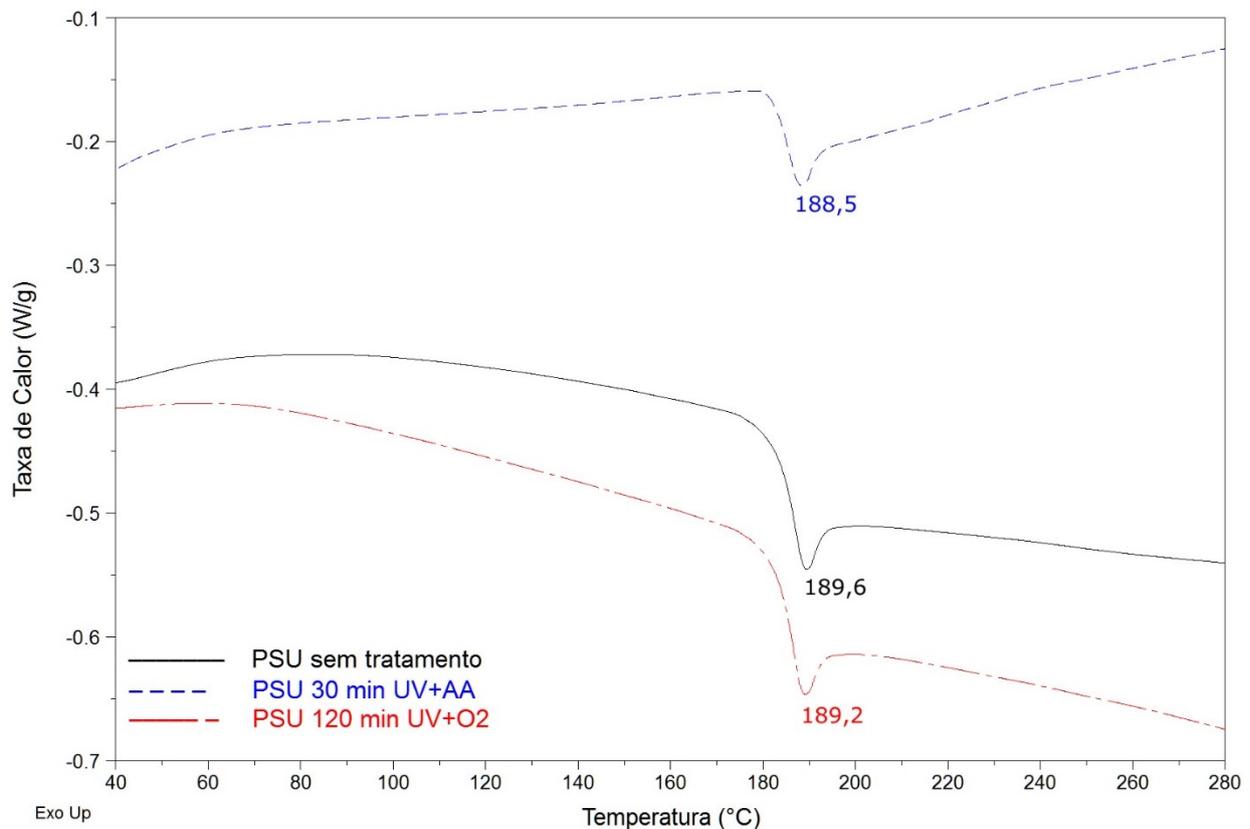


Figura 21. Gráficos de DSC dos filmes de PSU sem tratamento, após 120 minutos de fotólise com O₂ e após 30 minutos de fotólise com AA.

Análises de TGA foram realizadas para avaliar a estabilidade térmica das amostras de PSU antes e após os tratamentos fotoquímicos. A Figura 22 apresenta o termograma comparativo entre a amostra de PSU e a amostra tratada com radiação UV e oxigênio por 30 minutos. A degradação térmica do PSU sem tratamento se dá em duas etapas. A primeira, entre 150°C e 280°C, com perda de aproximadamente 11% de massa, pode ser atribuída à decomposição dos grupos sulfônicos^{114,119}. A cadeia principal do polímero começa a se decompor próximo de 540°C (transição ~543°C-585°C), resultando em um resíduo de 28% em massa, sendo este valor reportado na literatura^{116,117,120-122}. A amostra fotolisada por 30 minutos com O₂ apresenta comportamento similar ao polímero original, mas a sua primeira decomposição começa em temperatura levemente superior, variando também a quantidade de resíduo após a última etapa de decomposição térmica (17%). Foi possível observar que a etapa de decomposição do *bulk* polimérico ocorreu no mesmo intervalo de temperatura que o polímero original, levando à conclusão que o tratamento fotoquímico sob atmosfera oxidante não modifica o interior do material.

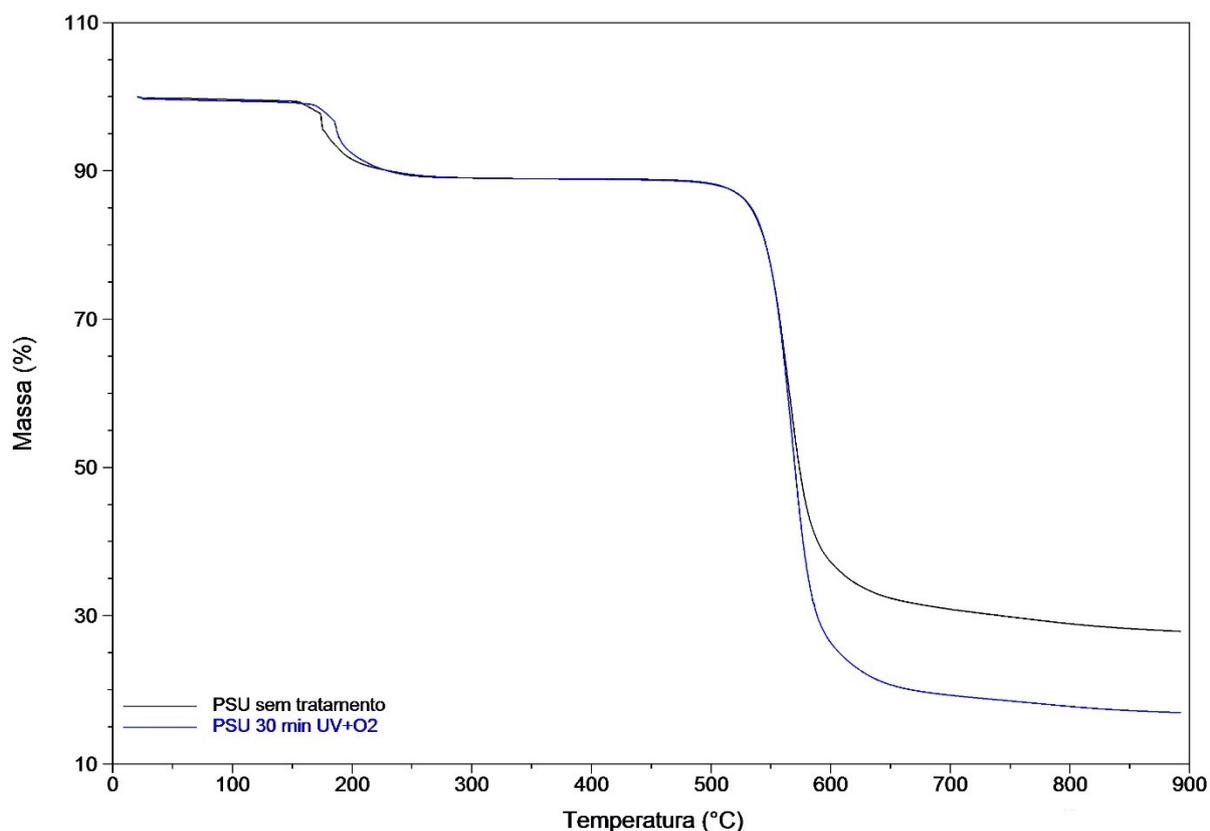


Figura 22. Termogramas dos filmes de PSU sem tratamento e após 30 de fotólise com O₂.

As amostras tratadas com AA também foram analisadas por TGA (Figura 23), possuindo duas etapas de decomposição. Em comparação com o PSU sem tratamento, as amostras tratadas com o AA obtiveram uma perda menor de massa na primeira transição, assim como um deslocamento para temperaturas ligeiramente superiores, indicando uma maior estabilidade térmica para a etapa de dessulfonação do PSU, que pode estar relacionada com a camada de PAA presente na superfície do material. Grover, Singh e Grupta analisaram o PAA por TGA, mostrando que há uma etapa de desidratação do polímero e outra de descarboxilação, entre 200°C e 350°C¹²³, podendo então serem estas etapas responsáveis por esse leve deslocamento observado. Assim como as amostras tratadas com O₂, as amostras tratadas com AA obtiveram uma modificação superficial, não alterando de forma significativa as propriedades térmicas do filme PSU.

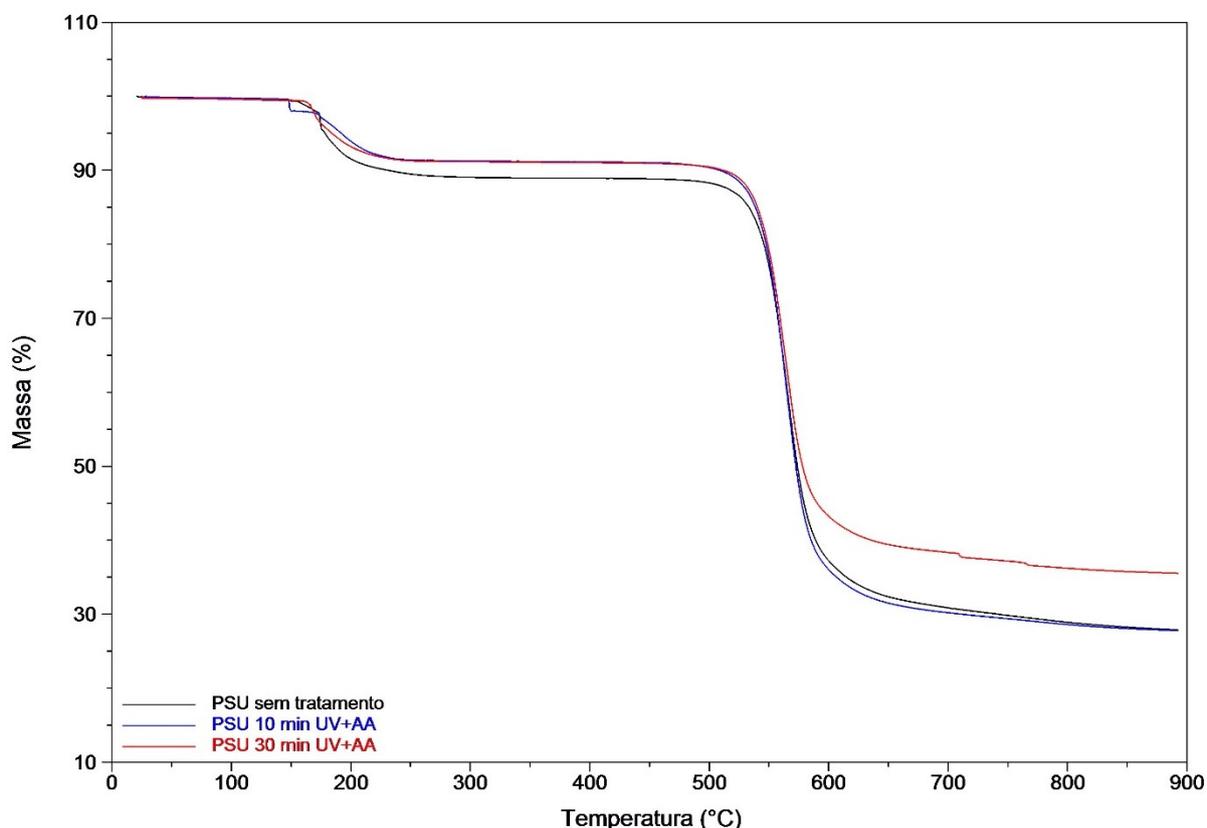


Figura 23. Termogramas dos filmes de PSU sem tratamento e após 10 e 30 minutos de fotólise com AA.

A Tabela 3 traz as análises de GPC para as amostras não tratadas e tratadas de PSU. Para PSU irradiado por 120 minutos em presença de O₂ podemos avaliar que há um acréscimo no Mw e decréscimo para o índice de polidispersividade (PDI), podendo indicar um comportamento de reticulação do polímero. Trabalhos envolvendo PU sugerem que a inserção de oxigênio na cadeia polimérica e a formação de radicais pode levar a formação de ligações entre cadeias, elevando o Mw¹²⁴. Murakami também chega a essa conclusão ao irradiar PSU com raios γ . O aumento em Mw e Mn conforme a dose de radiação indica que o polímero sofre reticulação (crosslinking), predominando esse rearranjo frente à cisão da cadeia¹²⁵.

Tabela 3. Massa molar média (Mw), número médio de unidade de massa molar (Mn) e o índice de polidispersividade (PDI) para amostras não tratadas e após os tratamentos com radiação UV em presença de O₂ e AA.

Amostra	Mw (g.mol⁻¹)	Mn (g.mol⁻¹)	PDI (Mw/Mn)
PSU ST	39000 ± 600	14500 ± 2000	2,7 ± 0,2
PSU 30 O ₂	39000 ± 600	11000 ± 1500	3,4 ± 0,3
PSU 120 O ₂	45000 ± 700	20000 ± 3000	2,2 ± 0,2
PSU 10 AA	39000 ± 600	12500 ± 1800	3,1 ± 0,3
PSU 30 AA	37500 ± 550	15000 ± 2000	2,5 ± 0,2

As análises realizadas nos filmes de PSU mostram que a modificação superficial foi efetiva ao serem enxertados novos grupos oxigenados, tornando as amostras com maior caráter hidrofílico e, no caso do tratamento com O₂ por 120 minutos, superhidrofílico. Esta informação é comprovada através da diminuição do ângulo de contato em água e pelo aparecimento de picos referentes aos grupos contendo oxigênio nos espectros de FTIR-ATR, podendo também ser avaliado que a modificação é dependente do tempo de irradiação que as amostras foram submetidas.

O mecanismo de fotopolimerização de PAA sobre os filmes de PSU sugerido é o mesmo proposto por Kessler²⁰ e por Gancarz³¹, que consiste na ativação da

superfície polimérica pela abstração de um H, grupos ésteres e peróxidos são ligados aos radicais formados e os monômeros de AA são enxertados, polimerizando-se sob forma de PAA (Figura 24).

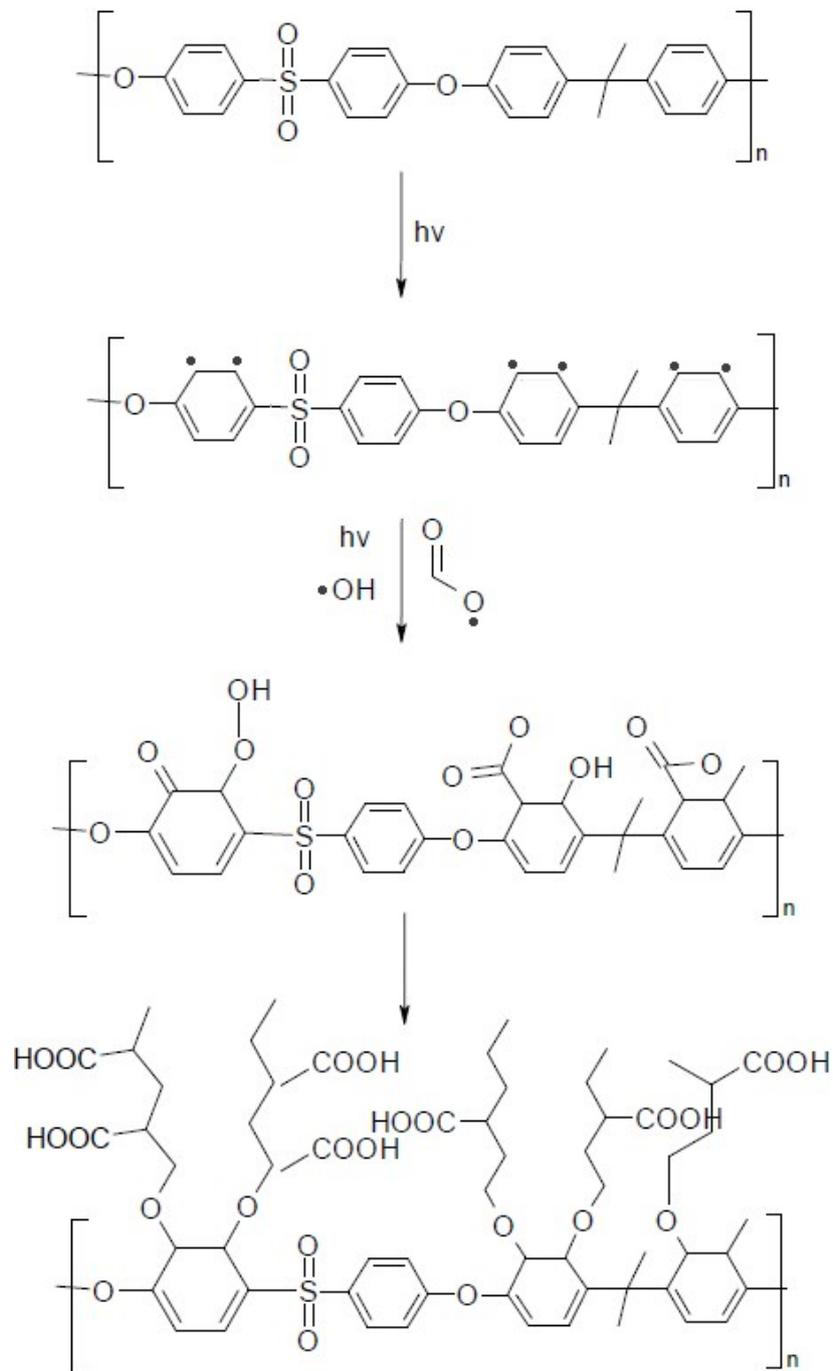


Figura 24. Proposta de mecanismo de fotopolimerização do PAA sobre o filme de PSU, durante e após a irradiação de UV na presença de vapores de AA.

A funcionalização na presença da radiação UV e atmosfera de oxigênio segue um mecanismo similar, com a formação de grupos peróxido, seguindo o enxerto dos grupos oxigenados na superfície ativada. Tal mecanismo proposto no presente trabalho (Figura 25) também foi sugerido por Kessler²⁰, após análises de FTIR-ATR, XPS e NEXAFS.

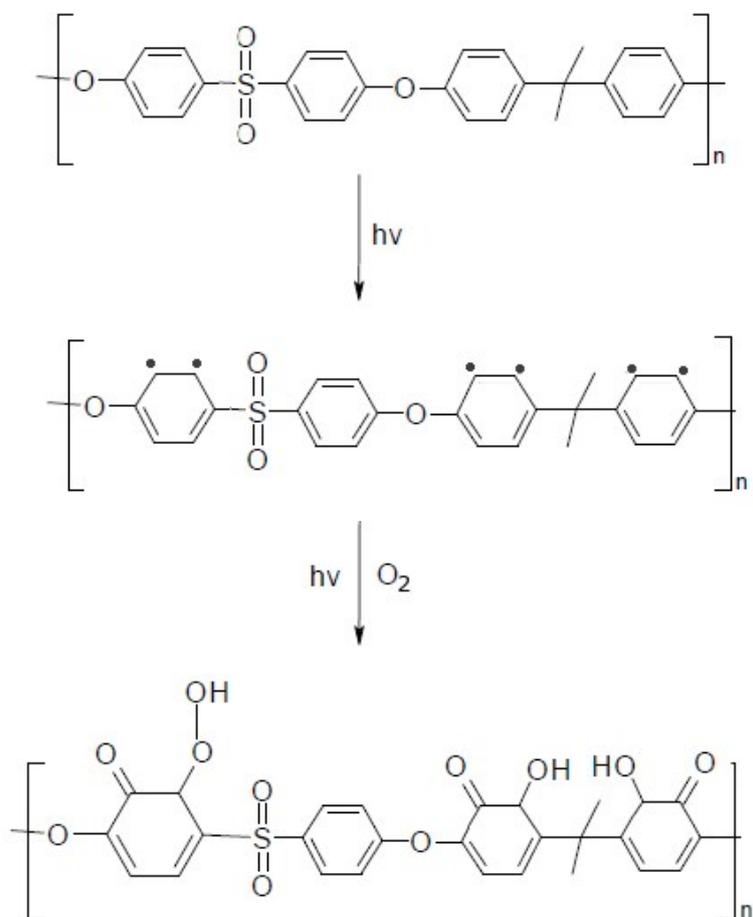


Figura 25. Proposta de mecanismo simplificado do enxerto de grupos oxigenados sobre o filme de PSU, durante e após a irradiação de UV na presença de atmosfera oxidante.

As imagens de SEM e de perfilometria óptica indicam que há uma discreta modificação na morfologia dos filmes após os tratamentos. Quando irradiados sob atmosfera oxidante durante 120 minutos há a formação de poros de dimensão nanométrica, enquanto quando irradiados na presença de AA a superfície se torna mais homogênea, devido ao recobrimento do PAA sobre o filme.

As análises de GPC mostram um rearranjo das cadeias poliméricas, indicando uma possível reticulação entre as mesmas, mas os dados obtidos por XRD, TGA e

DSC sugerem que não ocorrem alterações das propriedades ópticas e térmicas no bulk polimérico após a irradiação UV.

5.2. CARACTERIZAÇÃO DOS FILMES PÓS-ENSAIOS DE BIODEGRADAÇÃO FÚNGICA

De acordo com Shah et al., a perda de massa é um dos testes padrão utilizados para verificar a degradação polimérica mas, mesmo sendo altamente utilizada em testes com filmes ou barras de polímeros, a perda de massa, por si só, não é uma prova da sua degradação, apenas um indicativo de polímero residual presente na amostra após os ensaios de biodegradação¹²⁶.

As amostras foram pesadas antes de serem inoculadas e, após o tempo de incubação, foram lavadas em banho de ultrassom com água destilada, a fim de remover o excesso de fungos sobre a superfície, deixando-a mais disponível para as análises. Logo depois, as amostras foram guardadas em dessecador e pesadas diversas vezes, até atingir a estabilidade. As amostras ditas controles, indicadas com a letra C, são aquelas deixadas em meio MMC, mas que não foram inoculadas com o fungo e nem replicadas. A Figura 26(a) apresenta os dados de perda de massa das amostras tratadas com AA e incubadas por 30 dias.

As amostras incubadas por 10 dias, não representadas aqui, não apresentaram nenhuma linearidade ou tendência entre suas replicatas, sendo impossível obter alguma conclusão sobre as mesmas. As amostras tratadas com AA e incubadas por 30 dias perderam porcentagens semelhantes de massa que suas amostras controle, mas é necessário observar que, mesmo após a lavagem dos filmes, há a presença de fungo aderido na superfície polimérica. Uma maior quantidade de resíduo fúngico foi encontrada nas amostras tratadas por 30 minutos, conforme é possível observar na Figura 26(b). A massa fúngica aderida influencia nos resultados da gravimetria, sendo então os valores encontrados e representados graficamente uma média entre perda de massa do filme após incubação e ganho de massa pela presença do fungo, ou seja, as amostras tratadas podem ter perdido mais massa que a amostra sem tratamento, mas os valores ficaram mascarados pelo ganho de massa em função do fungo aderido.

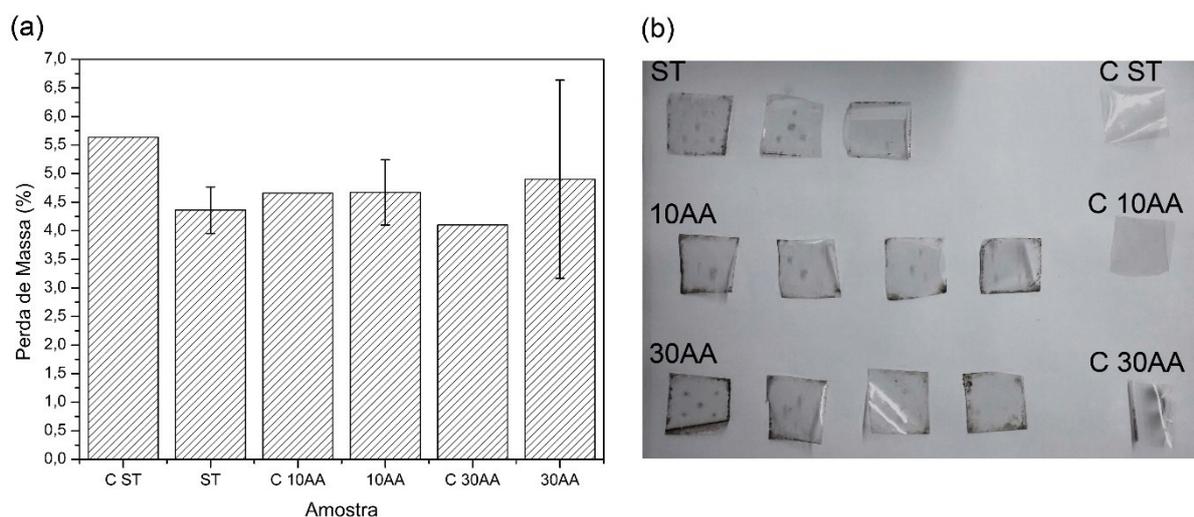


Figura 26. (a) Dados de perda de massa dos filmes PSU incubados durante 30 dias. (b) Foto dos filmes de PSU lavados após incubação por 30 dias. O tempo de tratamento está indicado no nome da amostra, sendo ST para polímeros não tratados, 10AA para polímeros tratados com radiação UV em presença de AA por 10 min e 30AA para amostras tratadas por 30 min com AA e UV. As amostras controle são indicadas pela letra C na frente do nome.

A gravimetria das amostras fotolisadas com O_2 foram retratadas em trabalho anterior⁴⁶ e mostraram exatamente o mesmo comportamento não linear que o apresentado aqui, com perda de aproximadamente 3% e 7% para 30 e 60 dias de cultivo em MMC, respectivamente, nas amostras irradiadas por 120 minutos em oxigênio. Os meios de cultura e tempos de incubação foram diferentes deste presente trabalho, mas foi observado que o meio de cultura tem influência direta no crescimento e desenvolvimento do fungo, bem como na sua adesão após a lavagem das amostras.

Cabe salientar que não foram encontrados na literatura estudos sobre biodegradação de PSU, a não ser o próprio trabalho realizado pelo nosso grupo de pesquisa. Esse polímero é mais estudado quanto à degradação térmica e foto-oxidativa, porém, apesar da grande estabilidade térmica e química do PSU, uma redução de aproximadamente 5% em massa em 30 dias de cultivo fúngico é um valor significativo, frente ao desconhecimento do tempo total necessário para que ocorra a sua degradação em aterros. Um polímero de estrutura molecular semelhante ao PSU é o policarbonato (PC), sendo o primeiro utilizado como material de substituição do segundo por ter um custo menor. Artham e Doble trataram PC com radiação UV por

10 dias, e em seguida submeteram este polímero ao processo de biodegradação por fungos filamentosos em meio de sal mineral, juntamente com o polímero não tratado e outro polímero tratado termicamente a 100° C. Ao final de 12 meses de ensaio a perda de massa detectada foi de 5,5% para o polímero tratado com UV²¹. Assim, as perdas de massa encontradas nos filmes de PSU são significativas, levando em conta o curto espaço de tempo de cultivo e o uso de somente um fungo, não de um consórcio de micro-organismos.

Imagens de OM foram realizadas nas amostras de PSU após o cultivo do fungo e após lavagem das mesmas. As imagens aqui retratadas para as amostras tratadas com oxigênio fazem parte de um trabalho anterior do nosso grupo de pesquisa, onde os tempos de incubação com o *Metarhizium anisopliae* CG97 foram de 30 e 60 dias⁴⁶. As imagens das amostras sem tratamento (Figura 27 (a) e 27(d)) mostram pouco ou nenhum desenvolvimento do fungo, apenas a presença dos esporos inoculados. Observa-se um leve aumento no crescimento de hifas para os filmes tratados por 30 minutos (Figura 27 (b) e 27(e)), mas nas amostras irradiadas por 120 minutos sob atmosfera oxidante, o crescimento das hifas é massivo (Figura 27 (c) e 27(f)).

As imagens dos filmes sem tratamento, incubados por 10 e 30 dias (Figuras 28(a) e 28(d)) novamente mostram a presença dos esporos do fungo e nenhum crescimento de hifas. Já nas amostras tratadas com AA é possível observar o desenvolvimento do fungo, passando pelo crescimento das hifas e liberação de novos esporos (Figura 28(b) e 28(e)). Este comportamento aumenta conforme maior é o tempo de tratamento e tempo de cultivo (Figura 28(c) e 28(f)). O maior desenvolvimento e reprodução do fungo, notado conforme o aumento no tempo de tratamento que a amostra recebeu, pode ser relacionado com a inserção de grupos oxigenados na superfície do polímero.

As imagens de SEM corroboram com as análises das imagens de OM. As amostras sem tratamento não apresentam indícios de crescimento de hifas, apenas adesão dos esporos na superfície polimérica. Considerando as imagens de SEM da PSU ST (Figura 29(a) e 29(d)) os esporos não aparentam desenvolvimento. Os filmes de PSU, conforme Figura 18, apresentam superfície bem homogênea. Mudanças na superfície foram observadas para PSU 30 O₂ cultivada por 60 dias (Figura 29(e)) e

PSU 120 O₂ cultivada por 60 dias (Figura 29(f)), onde se pode notar formação de marcas mais escuras na imagem, que lembram a disposição das hifas na superfície. Há também formação de buracos, crateras e granulações, provavelmente provenientes da atividade do microrganismo na superfície do polímero, indicando um processo degradativo.

Já as imagens de SEM do filme de PSU tratado por 10 minutos com AA (Figura 30(b)) mostram um leve crescimento do fungo, que aumenta consideravelmente quando as amostras ficaram incubadas por 30 dias (30(e)). O desenvolvimento do fungo é pleno quando é possível notar o crescimento vasto de hifas e novas esporulações, significando que o micro-organismo encontrou um ambiente propício para sua reprodução, o que ocorre na Figura 30(c) e 30(f), amostras tratadas com AA por 30 minutos e incubadas por 10 e 30 dias, respectivamente.

O desenvolvimento do fungo sobre a superfície do filme tratado com AA também foi possível de ser observado através da técnica de perfilometria óptica (Figura 31). Quanto maior o tempo de tratamento, maior a quantidade de hifas e novos esporos, ou seja, o ambiente mais hidrofílico é reconhecido pelo micro-organismo como sendo propício para sua adesão e crescimento.

As análises de OM e SEM são condizentes entre si, apontando para o maior desenvolvimento do *M. anisopliae* nas superfícies tratadas. Não é possível quantificar a quantidade de fungo presente em cada amostra, mas através das imagens é possível supor que há um maior crescimento do fungo nas amostras tratadas com AA, ao compararmos com as amostras fotolisadas em O₂ e incubadas pelo mesmo período de 30 dias. É possível também verificar que o tempo de fotólise está relacionado com o desenvolvimento fúngico. Quanto maior o tempo de tratamento, mais desenvolvido se encontra o micro-organismo, crescendo hifas na superfície dos filmes e liberando novos esporos. As amostras sem tratamento não são reconhecidas pelo fungo como um substrato propício para sua fixação e reprodução, portanto nada além de esporos são encontrados nas imagens de microscopia óptica e eletrônica e perfilometria.

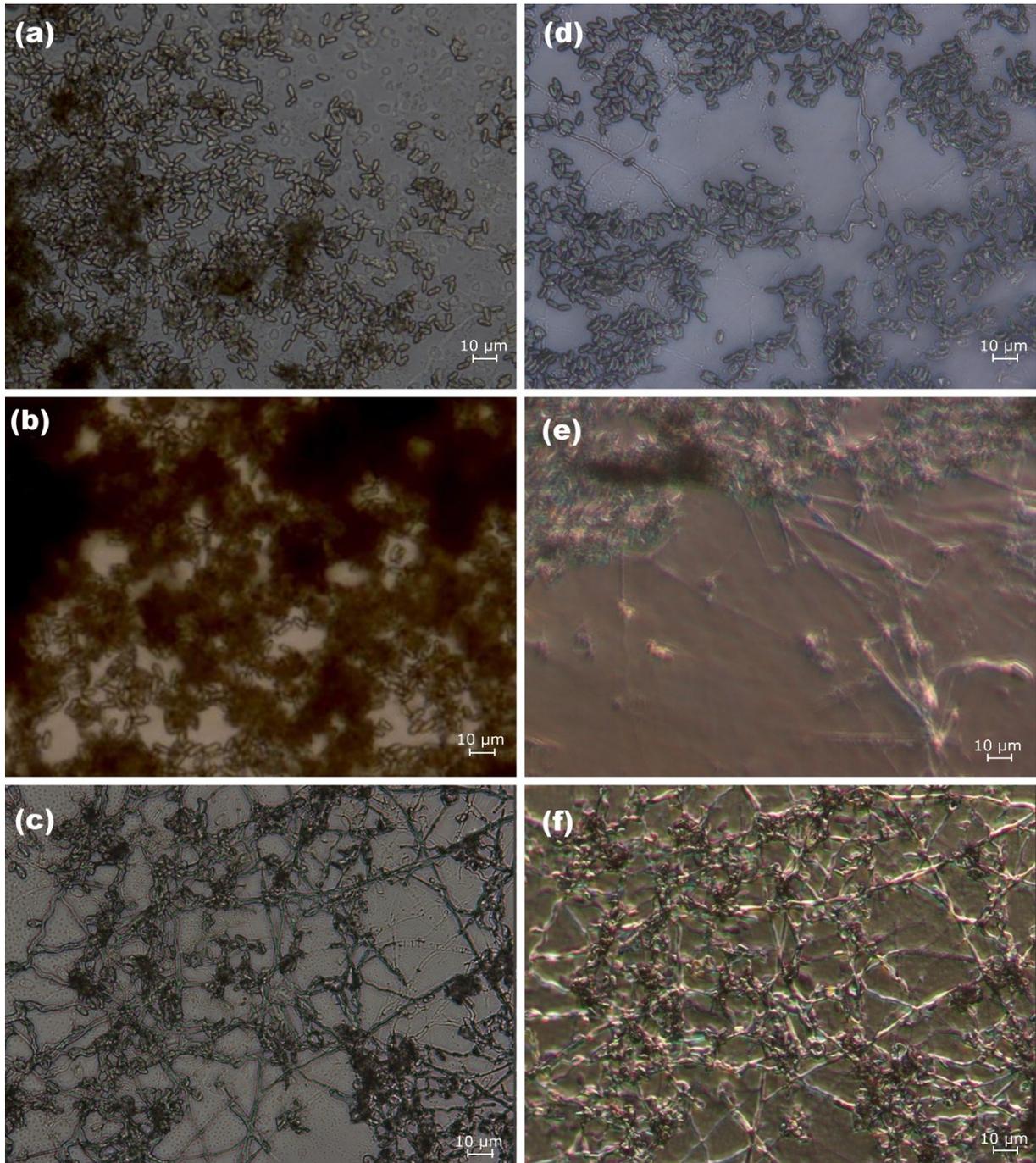


Figura 27. Imagens de MO do crescimento do fungo sobre os filmes de PSU. PSU ST após 30 dias de incubação (a) e após 60 dias de incubação (d); PSU 30 O₂ após 30 dias de incubação (b) e após 60 dias de incubação (e); PSU 120 O₂ após 30 dias de incubação (c) e após 60 dias de incubação (f).

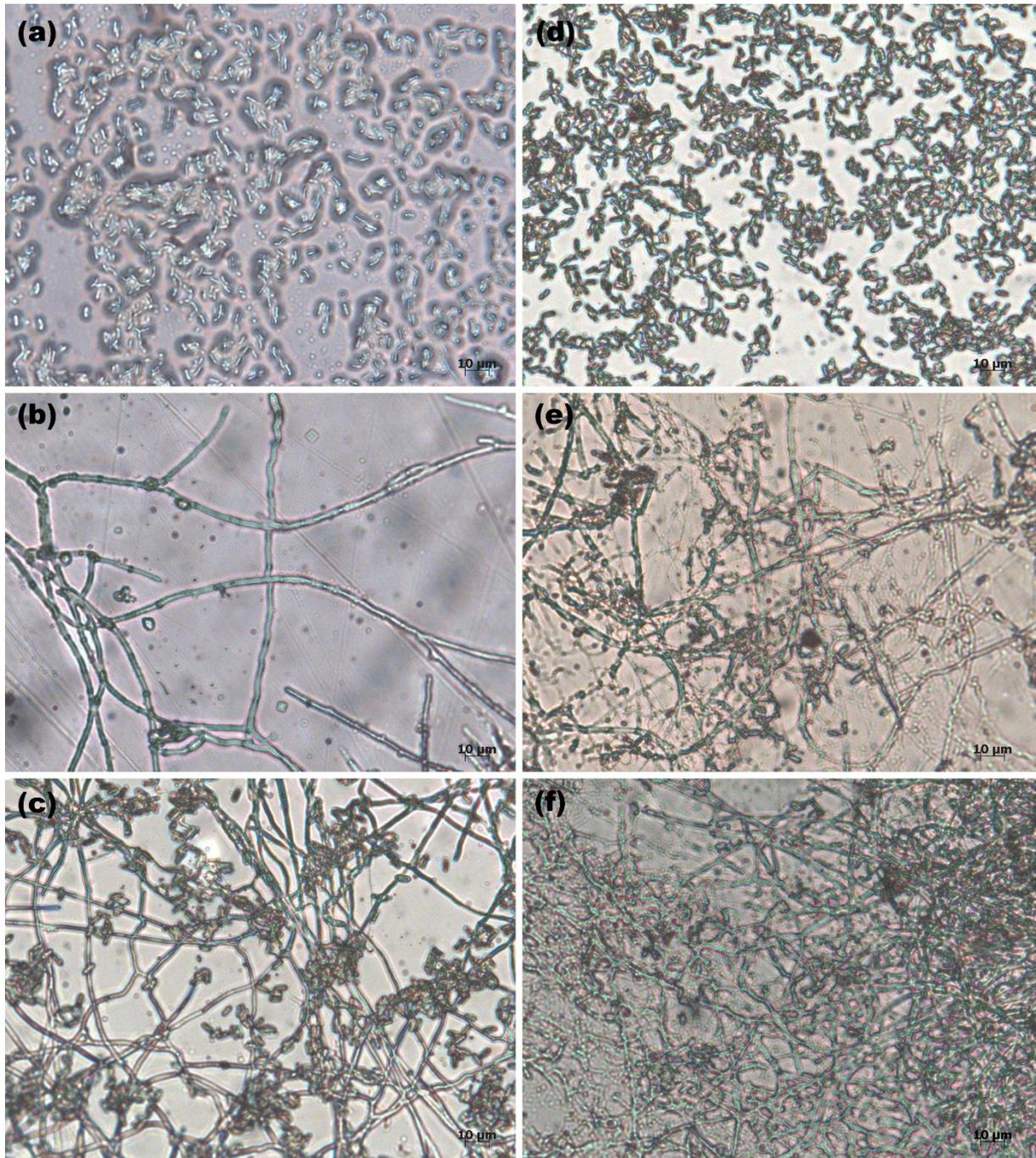


Figura 28. Imagens de MO do crescimento do fungo sobre os filmes de PSU. PSU ST após 10 dias de incubação (a) e após 30 dias de incubação (d); PSU 10 AA após 10 dias de incubação (b) e após 30 dias de incubação (e); PSU 30 AA após 10 dias de incubação (c) e após 30 dias de incubação (f).

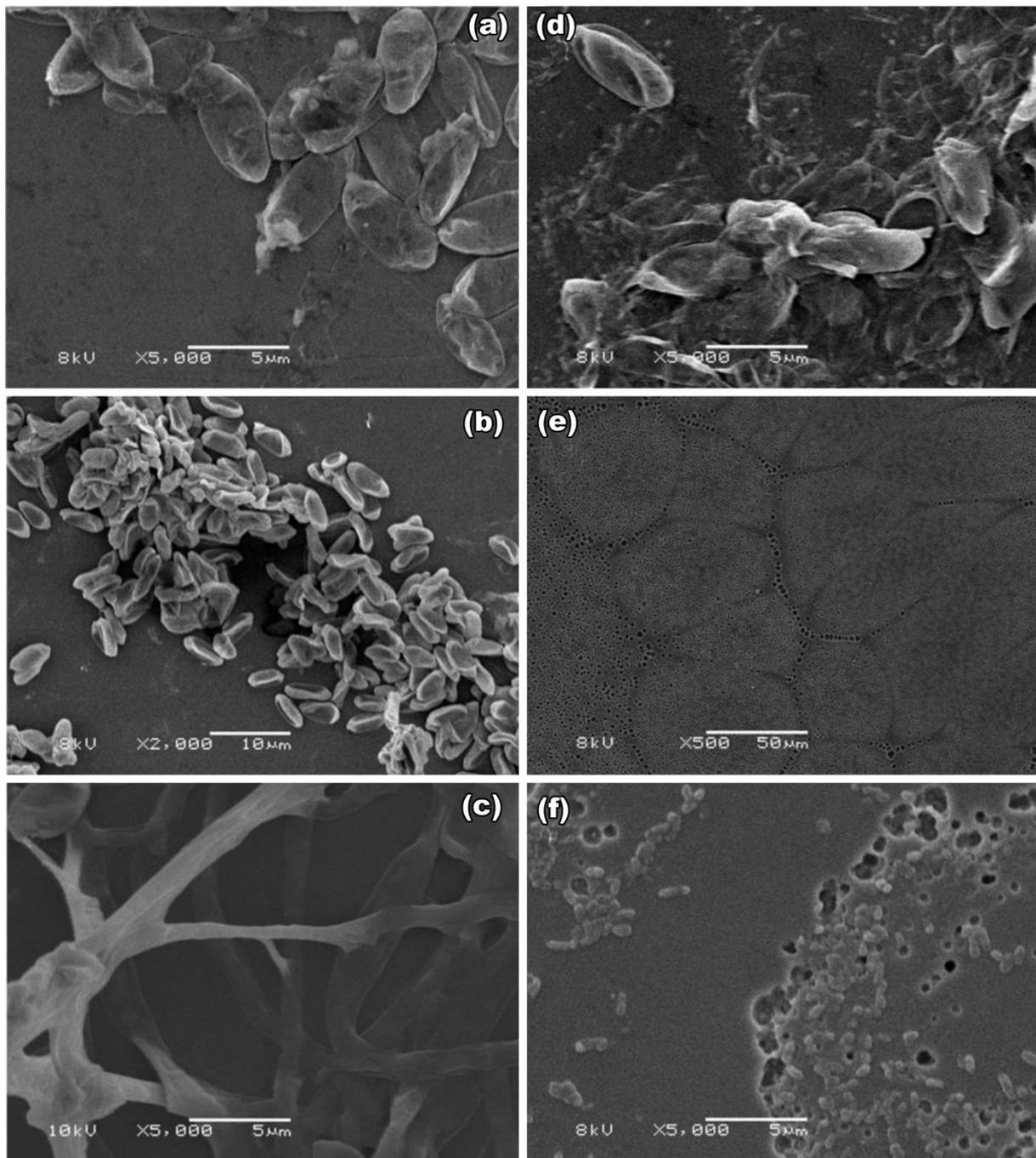


Figura 29. Imagens de SEM das superfícies dos filmes de PSU após o cultivo do fungo. PSU ST após 30 dias de incubação (a) e após 60 dias de incubação (d); PSU 30 O₂ após 30 dias de incubação (b) e após 60 dias de incubação (e); e PSU 120 O₂ após 30 dias de incubação (c) e após 60 dias de incubação (f).

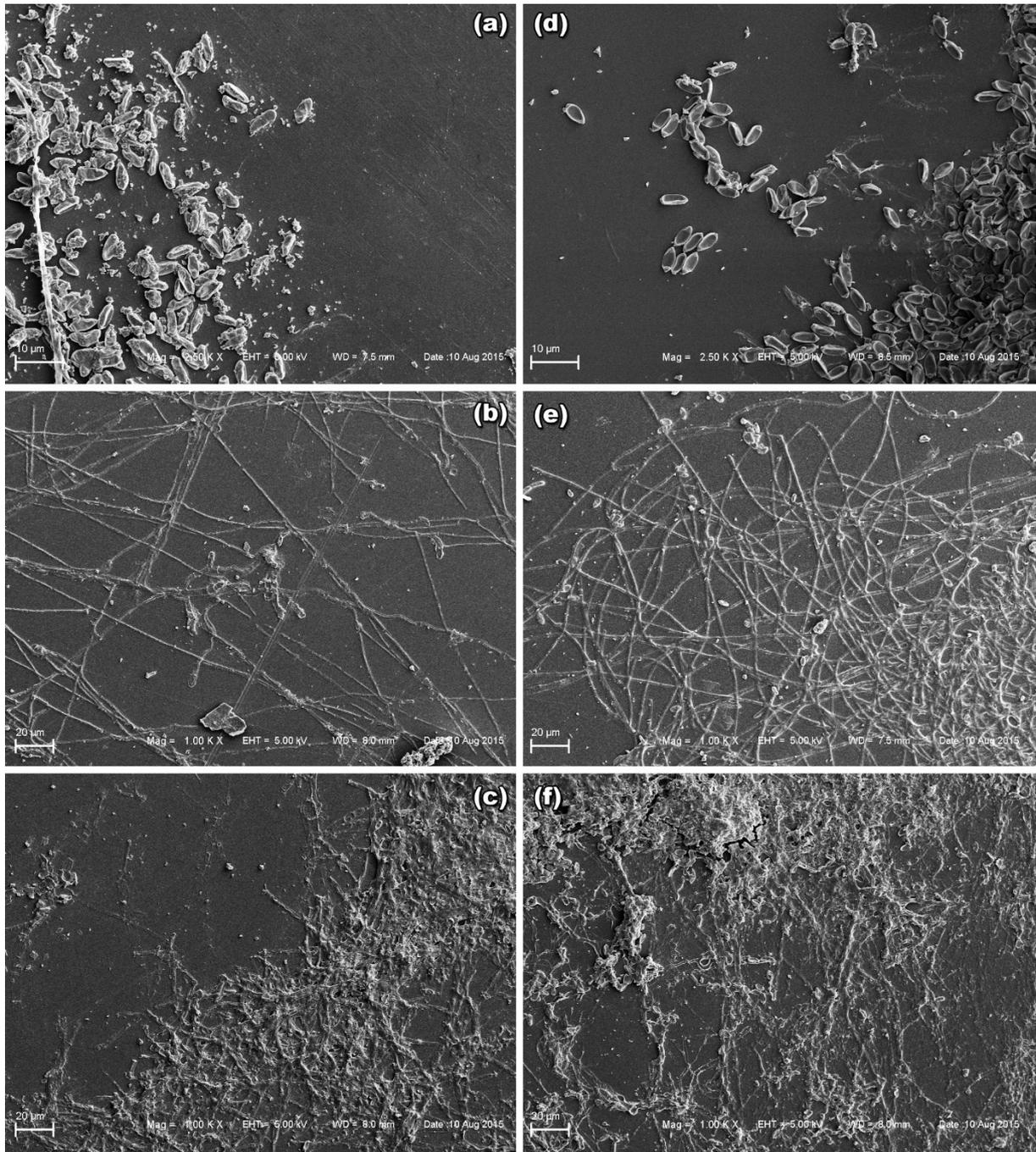


Figura 30. Imagens de SEM das superfícies dos filmes de PSU após o cultivo do fungo. PSU ST após 10 dias de incubação (a) e após 30 dias de incubação (d); PSU 10 AA após 10 dias de incubação (b) e após 30 dias de incubação (e); e PSU 30 AA após 10 dias de incubação (c) e após 30 dias de incubação (f).

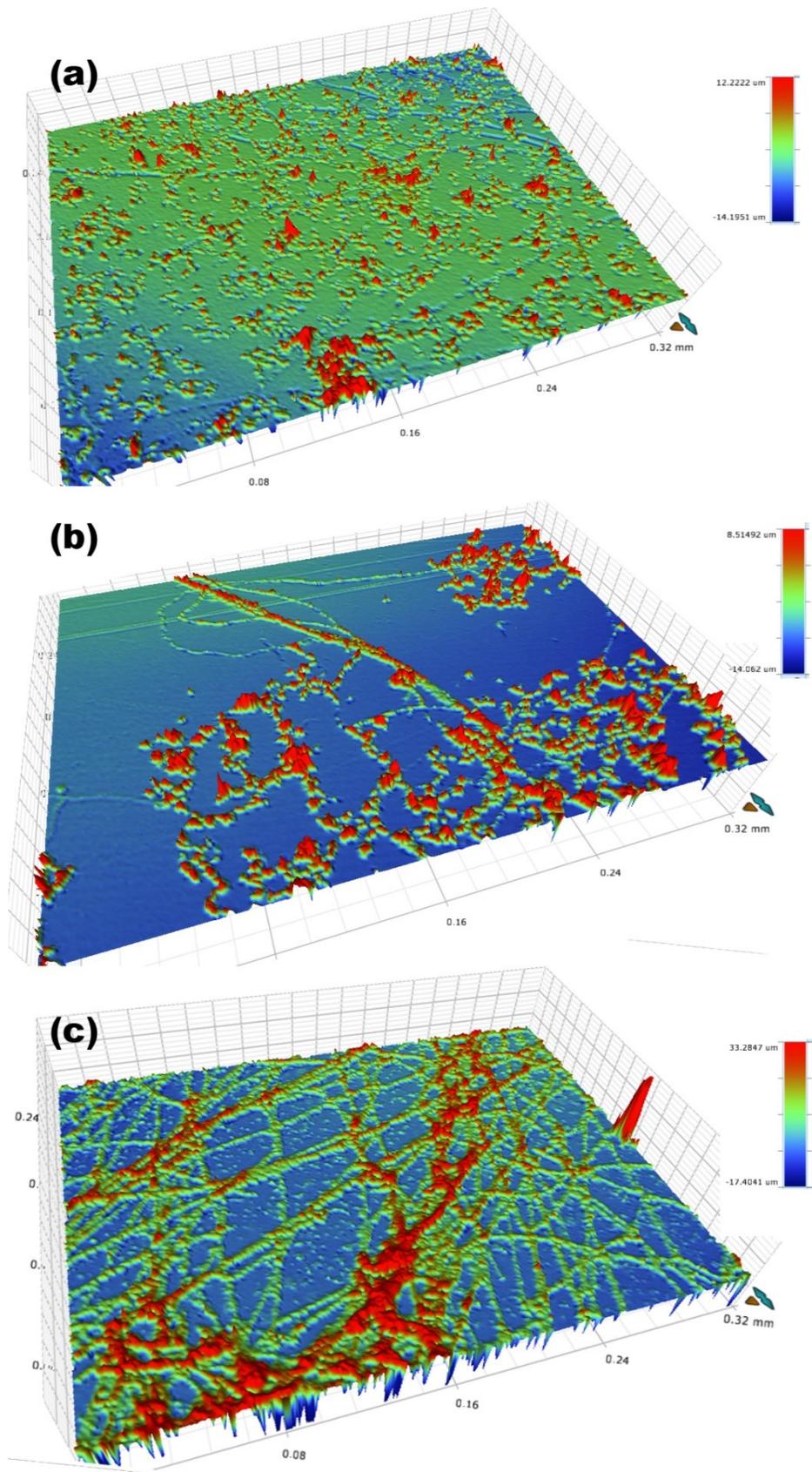


Figura 31. Perfilometria óptica dos filmes de PSU incubados por 10 dias, (a) sem tratamento, (b) tratado com AA por 10 minutos, e (c) tratado com AA por 30 minutos.

O espectro de infravermelho do extrato seco do fungo (Figura 32) apresenta uma larga banda em 3600 - 2500 cm^{-1} (ν O-H) sobrepondo-se à banda referente à deformação axial do grupo N-H (3400-3250 cm^{-1}). Os picos em 2959 e 2925 cm^{-1} podem ser atribuídos às deformações axiais assimétrica e simétrica, respectivamente, do grupo CH_2 (ν C-H). De acordo com Stuart e colaboradores células microbianas podem conter a sobreposição de centenas de modos de infravermelho, mas para bactérias e fungos, o espectro apresenta predominantemente a sua parte proteica. Assim, o pico em 1633 cm^{-1} seria composto por cerca de 80% de deformação axial C=O, 10% de deformação axial C-N e 10% de deformação angular de N-H e o pico em 1548 cm^{-1} é formado 60% por ρ (N-H) e 40% por ν (C-N)¹⁰⁹. A região de 920 – 400 cm^{-1} apresenta uma banda intensa característica de deformação angular simétrica fora do plano ω (N-H).

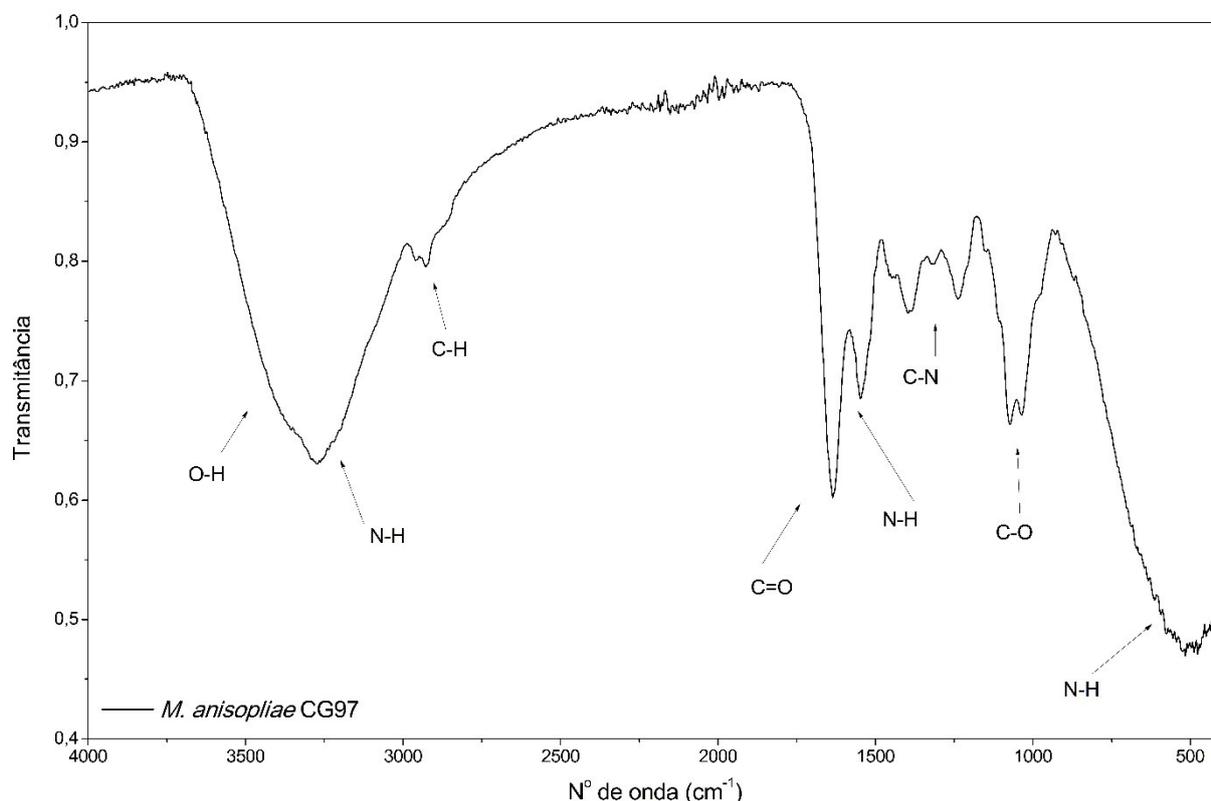


Figura 32. Espectro de infravermelho do fungo *M. anisopliae* seco.

Mesmo após a lavagem dos filmes é possível encontrar resíduos do fungo sobre a superfície dos mesmos, seus esporos que aderiram, mas não conseguiram se desenvolver. Isto é percebido pela foto dos filmes (Figura 26(b)), bem como nas análises de OM e SEM (Figura 28(a), 28(d), 30(a) e 30(d)). A Figura 33 traz os espectros dos filmes de PSU sem tratamento e incubados por 10 e 30 dias, onde é

possível identificar picos referentes ao fungo, como N-H ($3600-3000\text{cm}^{-1}$ e 1542cm^{-1}) e C=O (1640cm^{-1}).

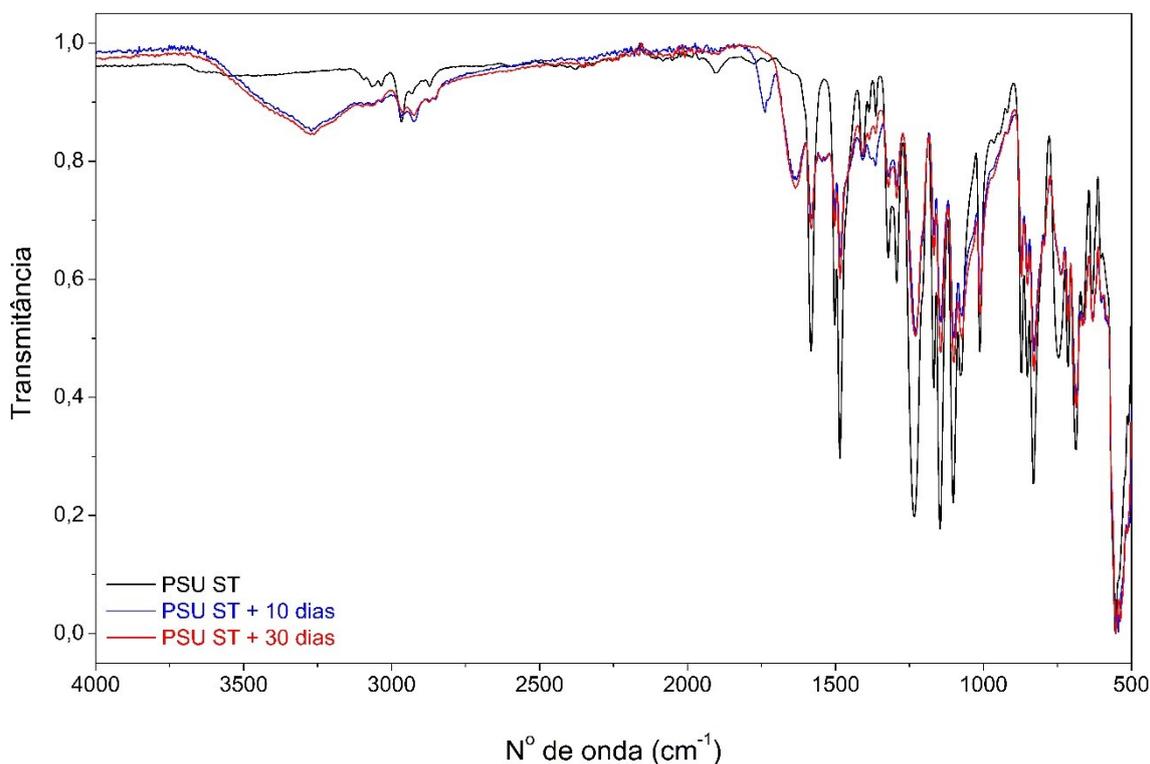


Figura 33. Espectros de FTIR-ATR de PSU sem tratamento e incubados por 10 e 30 dias.

As amostras fotolisadas com AA e incubadas (Figura 34 e 35) apresentam uma maior banda de O-H e de N-H ($3600-3000\text{cm}^{-1}$), quando comparada às amostras sem tratamento. Há o surgimento de uma banda em 1738cm^{-1} em todas as amostras incubadas por 10 dias, podendo indicar algum metabólito do fungo que atua neste período de cultivo. Ocorre também o aparecimento de uma banda entre 1405 e 1337cm^{-1} e o alargamento da banda próximo a 500cm^{-1} , que se referem a grupamentos nitrogenados (C-N e N-H). Há também modificação dos picos entre em 990 e em 700cm^{-1} , que normalmente indicam modificações nas substituições dos anéis aromáticos¹¹⁰

Tanto os polímeros tratados com AA, como os tratados com O_2 , não representados aqui, apresentam um decréscimo na região $1720-1680\text{cm}^{-1}$, que também foi descrita por Zahra e colaboradores durante a degradação de polietileno de baixa densidade, que afirma que essa diminuição se deve a utilização do grupamento carbonila como substrato pelo fungo¹²⁷.

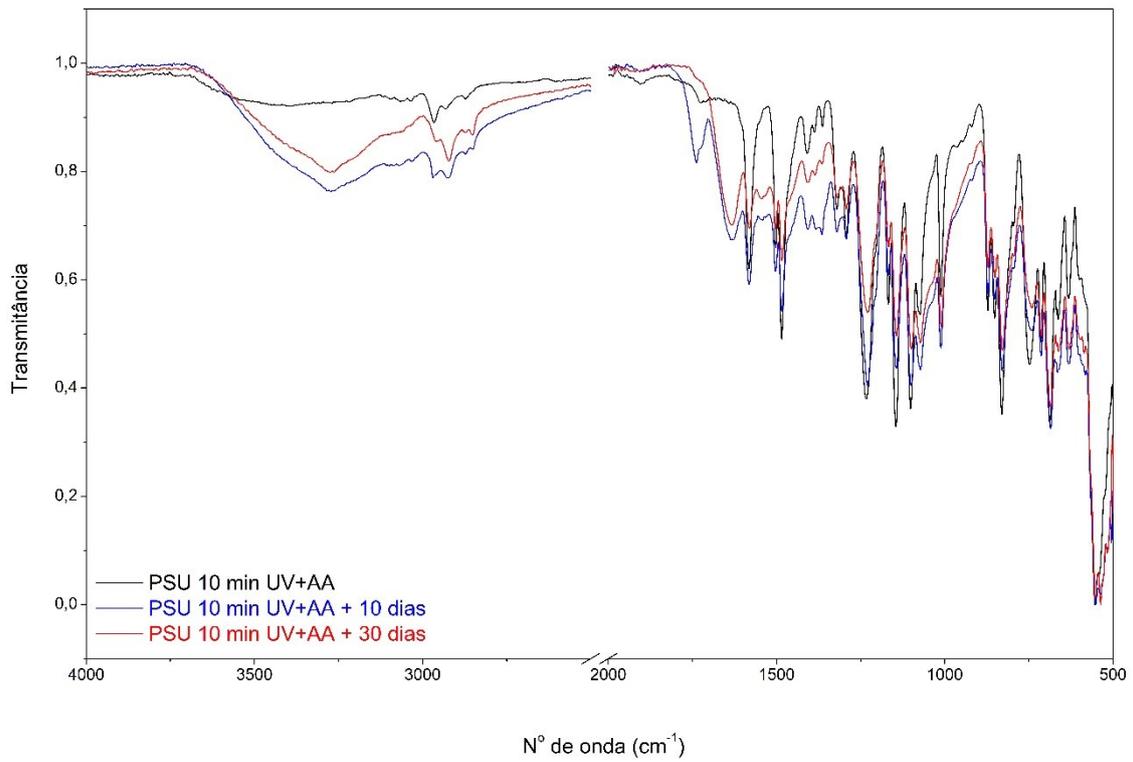


Figura 34. Espectros de FTIR-ATR de PSU tratado por 10 minutos com AA e incubados por 10 e 30 dias.

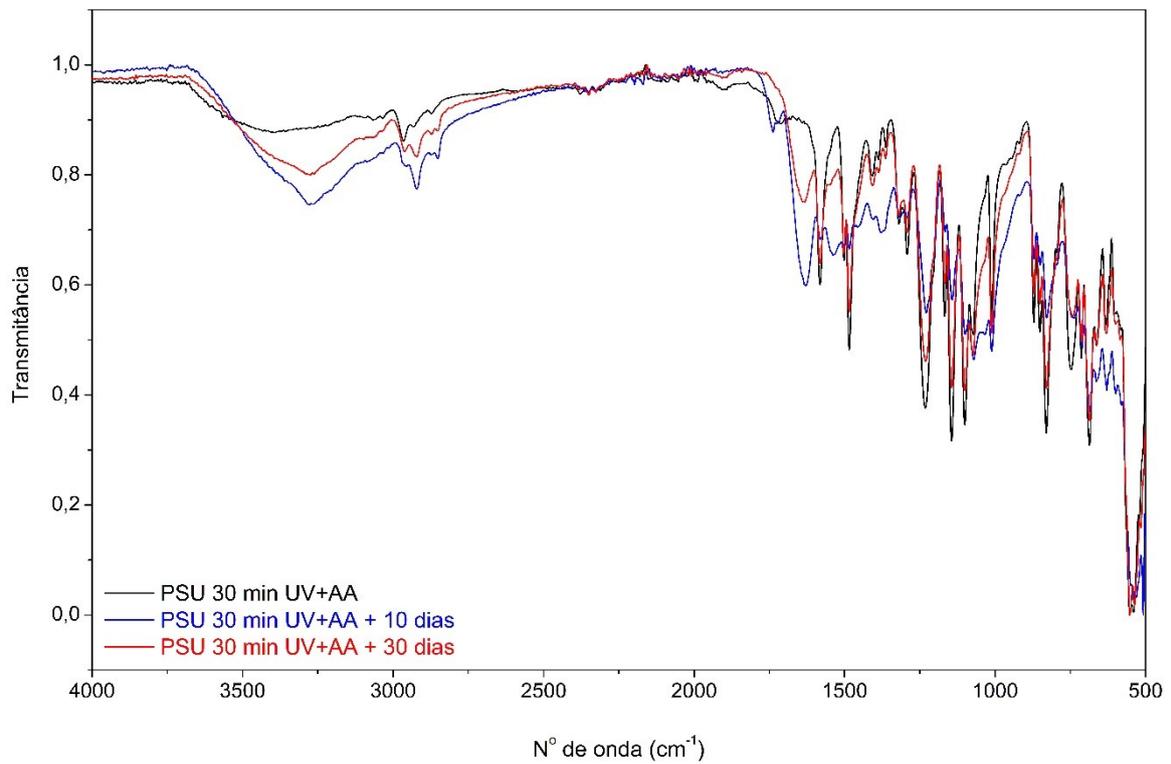


Figura 35. Espectros de FTIR-ATR de PSU tratado por 30 minutos com AA e incubados por 10 e 30 dias.

As análises de FTIR-ATR apresentam sinais de degradação das superfícies poliméricas nas amostras estudadas, pois há a redução de intensidade de grupos oxigenados, inversamente proporcional ao tempo de incubação, surgimento de novas bandas e o acréscimo de bandas de O-H, que podem estar relacionadas diretamente com o mecanismo de hidrólise, principal meio de ataque de microrganismos em amostras poliméricas. Os dados apresentam uma certa proporcionalidade de degradação que é dependente do tempo de incubação, quando analisado o pico referente à carbonila, um dos principais sítios de ataque fúngico^{127,128}.

Análises térmicas foram realizadas nas amostras após estas serem incubadas. As Figuras 36 a 38 mostram que as amostras incubadas são termicamente menos estáveis que as amostras sem tratamento ou que as tratadas com AA, pois a degradação da cadeia principal do polímero ocorre em temperaturas menores que a amostra fotolisada ou que o filme de PSU não tratado. Esse aumento na instabilidade indica um processo de degradação na cadeia polimérica após o contato com o meio de cultura e com os esporos do fungo, mas não se pode afirmar com base nesses dados que ocorre a biodegradação do polímero. Não houve diferença na temperatura de degradação entre as amostras com períodos de cultivo diferentes (520°C – 555°C), indicando que a diferença realmente ocorre após a incubação.

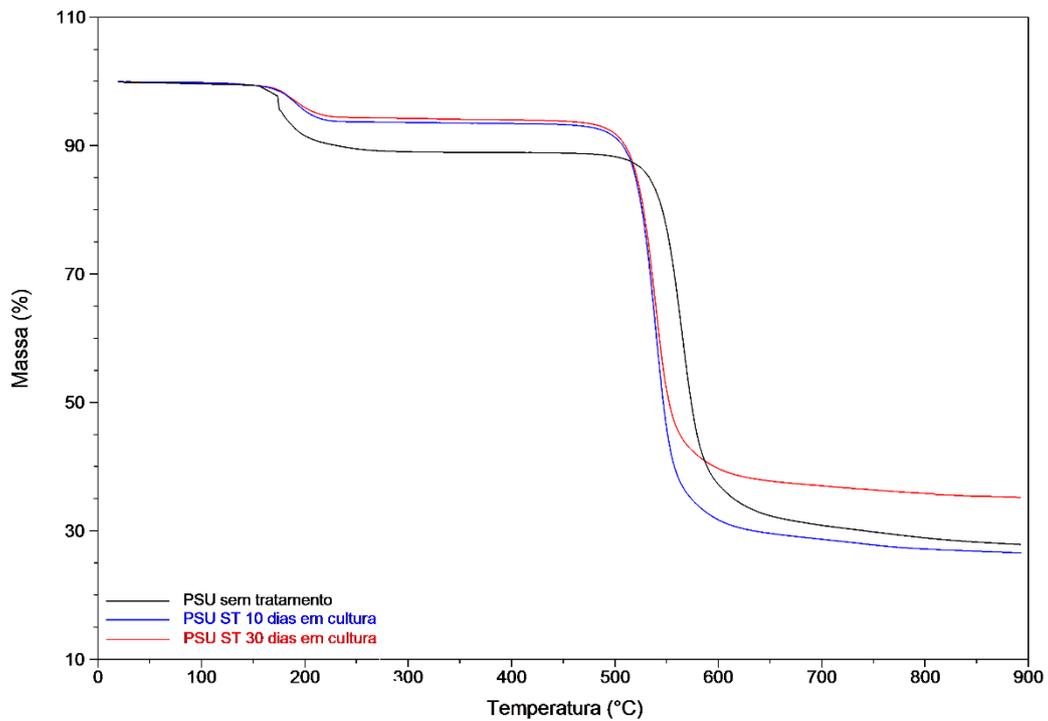


Figura 36. Termogramas dos filmes de PSU sem tratamento antes e após incubação com *M. anisopliae*.

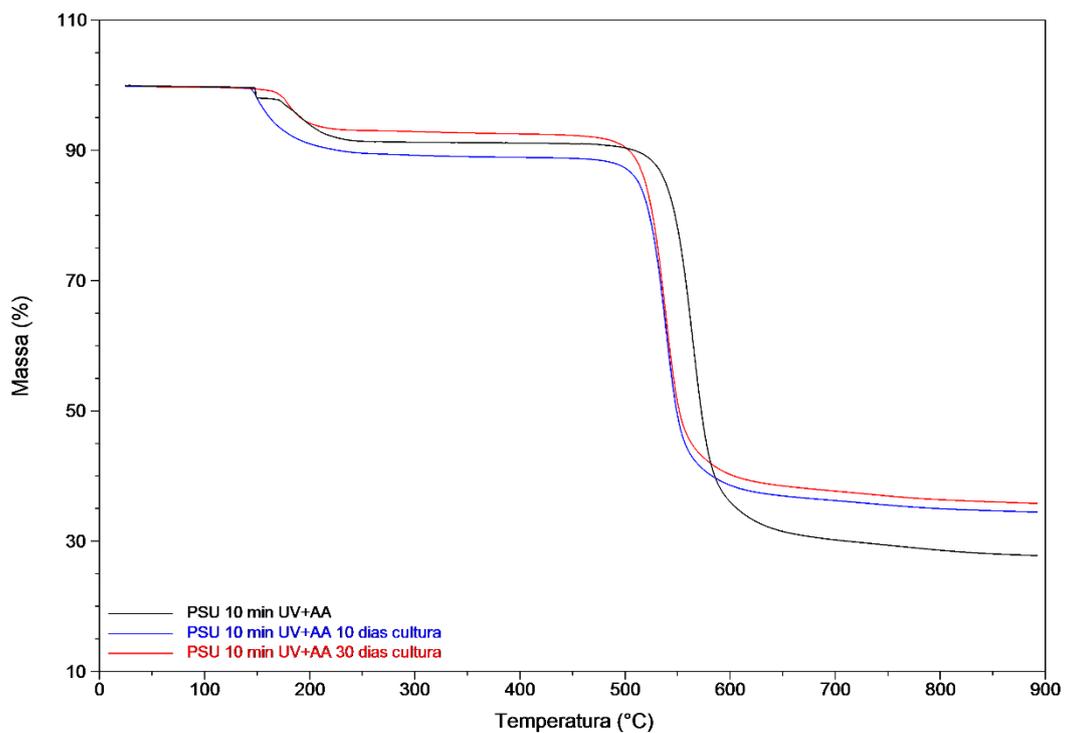


Figura 37. Termogramas dos filmes de PSU fotolisados por 10 minutos com AA, antes e após incubação com *M. anisopliae*.

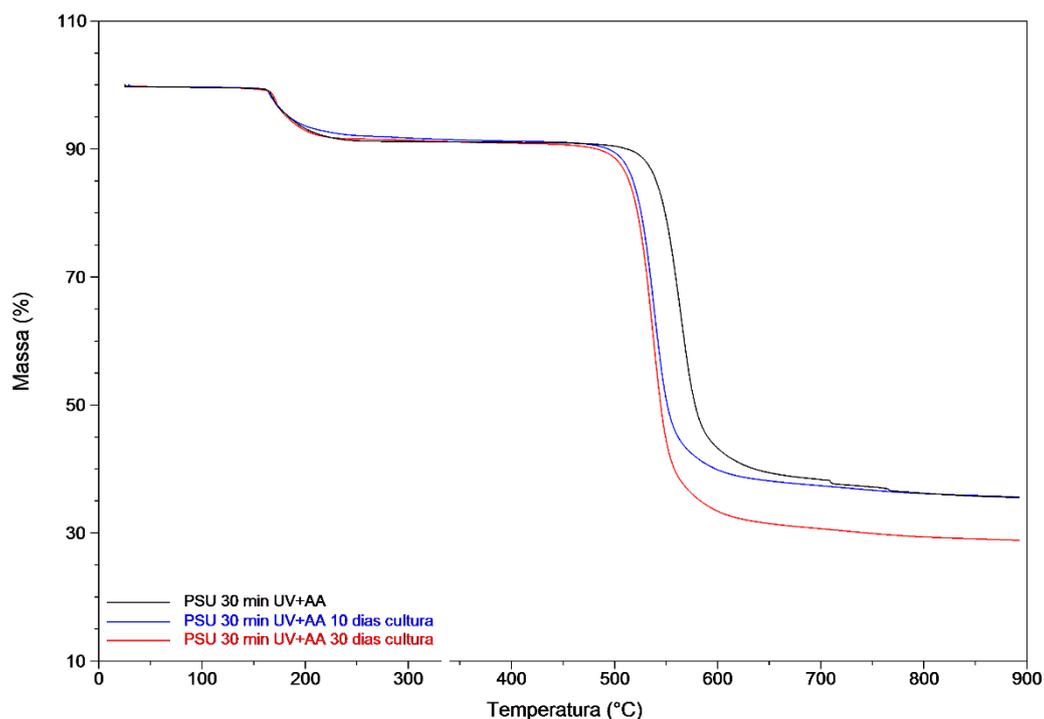


Figura 38. Termogramas dos filmes de PSU fotolisados por 30 minutos com AA, antes e após incubação com *M. anisopliae*.

As análises de GPC das amostras que foram incubadas com o fungo mostram discreto decréscimo nos valores de M_n e acréscimo nos valores de PDI, com relação à amostra sem tratamento (Tabela 4). O maior PDI significa uma maior dispersão da massa molecular do polímero, sendo calculado pela razão entre M_w e M_n . A diminuição dos valores de M_n pode significar que as cadeias poliméricas se fragmentaram em massas moleculares menores que o polímero original. Essa fragmentação ocorreu após o cultivo, possivelmente indicando que o fungo encontrou no polímero um substrato adequado para o seu desenvolvimento, secretando diversas enzimas capazes de interagir com o polímero, clivando as cadeias poliméricas, sendo este o início da biodegradação.

Tabela 4. Massa molar média (Mw), número médio de unidade de massa molar (Mn) e o índice de polidispersividade (PDI) para os filmes não tratados e tratados com AA, antes e após incubações de 10 e 30 dias com *M. anisopliae*.

Amostra	Mw (g.mol⁻¹)	Mn (g.mol⁻¹)	PDI (M_w/M_n)
PSU ST	39000 ± 600	14500 ± 2000	2,7 ± 0,2
PSU ST 10 dias	38000 ± 1200	11500 ± 2200	3,3 ± 0,7
PSU ST 30 dias	38500 ± 500	10700 ± 2000	3,7 ± 0,7
PSU 10AA	39000 ± 600	12500 ± 1800	3,1 ± 0,3
PSU 10 AA 10 dias	38000 ± 500	10700 ± 900	3,6 ± 0,3
PSU 10AA 30 dias	38000 ± 800	10700 ± 1550	3,6 ± 0,5
PSU 30 AA	37500 ± 550	15000 ± 2000	2,5 ± 0,2
PSU 30 AA 10 dias	39000 ± 800	11500 ± 1000	3,4 ± 0,4
PSU 30 AA 30 dias	38000 ± 700	11000 ± 1000	3,5 ± 0,3

As análises de GPC corroboram com os resultados encontrados nas análises de TGA, mostrando que após o contato com o meio de cultura e com o fungo ocorrem mudanças na estrutura polimérica. Estas mudanças eram esperadas devido às características do cultivo, onde é fornecida temperatura constante (28°C) e umidade, que são, para amostras poliméricas, fatores que podem facilmente levar a mecanismos de reticulação¹²⁹.

Por não ser possível controlar o crescimento do fungo e nem retirar totalmente seus resíduos das superfícies após o ensaio, as análises aqui realizadas não são quantitativas. Porém, as análises de FTIR-ATR são condizentes com os resultados encontrados por SEM e OM. Quanto maior o tempo de tratamento com AA e maior o tempo de cultivo, maior é o desenvolvimento do *Metarhizium anisopliae*. Tal comportamento não é observado nos filmes de PSU sem tratamento, sugerindo que tal material não é um ambiente favorável ao ataque fúngico. Possivelmente o

recobrimento de PAA sobre as amostras serve de alimento para o fungo, que assim consegue se desenvolver e reproduzir. Este mesmo comportamento foi observado em trabalho anterior, onde amostras de PU irradiadas com UV em atmosfera de vapor de AA serviram como ambiente propício para o fungo aderir e secretar enzimas capazes de degradar o polímero, que originalmente foi desenhado para resistir ao ataque microbiológico⁹⁹. A adesão celular e biocompatibilidade de filmes de PSU foi previamente estudada, mostrando que esta melhora significativamente conforme aumenta modificação superficial, realizada através de irradiação UV na presença de oxigênio¹³⁰. Tal comportamento também é visto neste trabalho, ao lidarmos com o *Metarhizium anisopliae*. Quanto mais modificado o polímero, quanto mais hidrofílico, maior a quantidade de fungo aderido na superfície, além de maior desenvolvimento do mesmo.

As análises de FTIR-ATR indicam algumas mudanças nos filmes poliméricos, pois há a redução dos picos dos grupamentos oxigenados e também dos grupos substituintes dos anéis aromáticos. Estas alterações podem ser a razão das mudanças observadas por TGA e GPC, que indicam uma maior instabilidade térmica e uma maior quebra da cadeia polimérica após as incubações com o fungo.

5.3. CARACTERIZAÇÃO DOS FILMES PÓS-ENSAIOS DE BIODEGRADAÇÃO EM SOLO SIMULADO

O solo utilizado foi analisado por CHN, a fim de saber a porcentagem total de carbono, hidrogênio e nitrogênio, pois estes elementos podem ser utilizados como alimento para os micro-organismos se desenvolverem. Os valores encontrados estão dispostos na Tabela 5.

A umidade relativa externa aos frascos contendo a terra e as amostras foi monitorada, obtendo-se valor máximo de 80% e mínima de 48%. Não foi adicionada água na terra, apenas os frascos deixados abertos dentro do banho termostatizado.

A gravimetria foi avaliada para todas as amostras após cada período de ensaio em solo simulado (Figura 39). Como os dados de perda de massa para os polímeros

degradados *in vitro*, não é possível encontrar uma linearidade nos resultados. Observa-se, porém, que há um certo aumento na perda de massa conforme o tempo de contato com o solo. Da 1ª semana para a 10ª semana as amostras fotolisadas em meio oxidante perderam de 2,5% para 4,4%, aproximadamente. As amostras tratadas com AA também perderam mais massa conforme o tempo de ensaio, apenas na 4ª semana um dos valores ultrapassou o esperado, perdendo 5,2%.

Tabela 5. Concentração elementar no solo simulado

% C	% H	% N
10,33	5,80	0,79

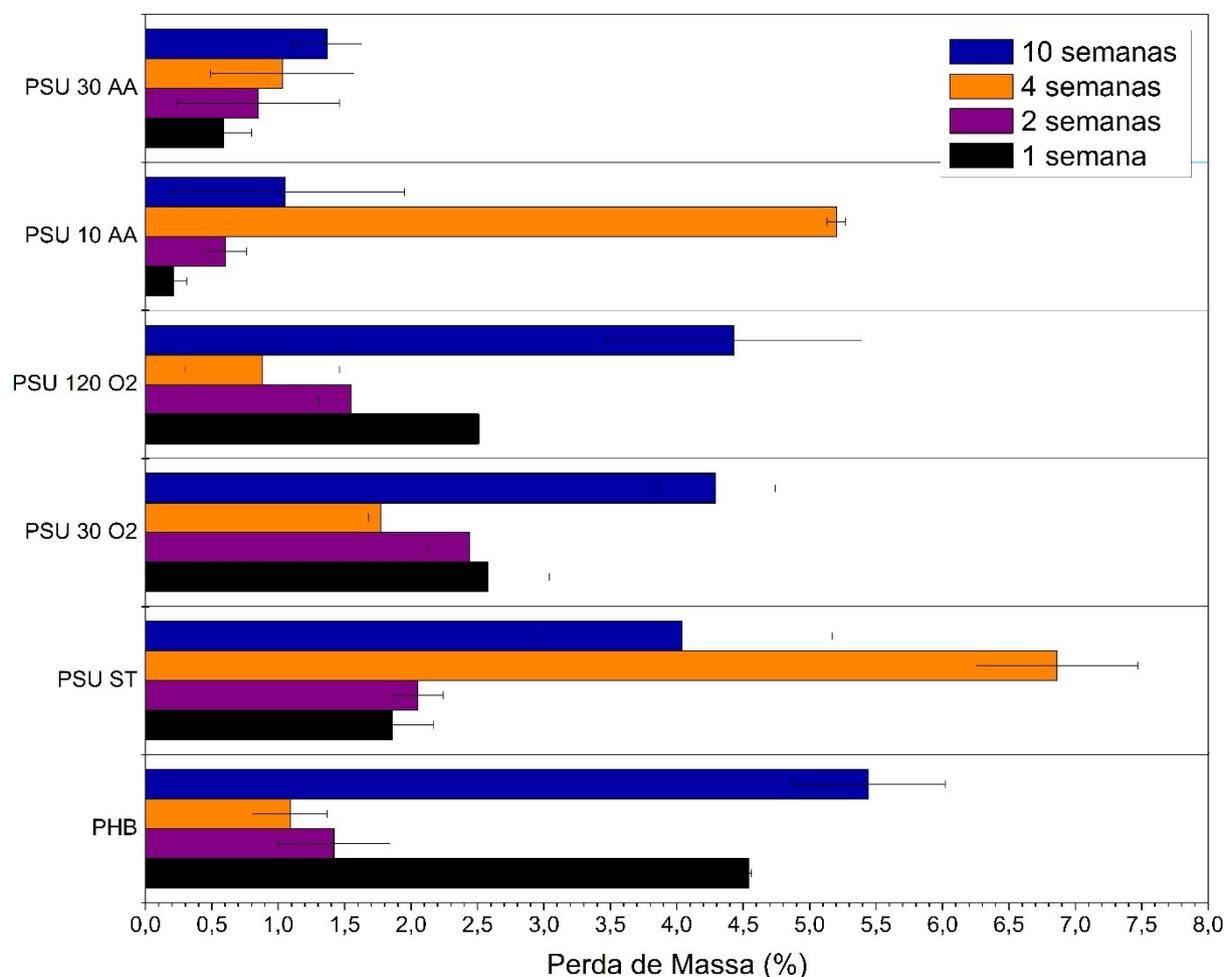


Figura 39. Dados de perda de massa das amostras de PHB e PSU não tratado (ST) e tratado (30 O₂, 120 O₂, 10AA, 30AA,) após ensaio de solo simulado.

Uma possível explicação para a não linearidade dos dados de gravimetria é a falta de umidade do solo. A umidade foi controlada externamente aos frascos contendo o solo e as amostras, não sendo observada se a terra estava com água o suficiente para a sobrevivência e proliferação dos micro-organismos. As amostras de 1 semana e 10 semanas foram colocadas em ensaio no mesmo dia, portanto a terra estava nas mesmas condições de umidade.

Filmes de PHB foram submetidos ao ensaio de solo simulado como amostras padrão, pois este é um polímero sabidamente biodegradável em ambiente favorável. As imagens de SEM das amostras de PHB apresentaram leves mudanças em sua morfologia a partir de 4 semanas de ensaio. Há um aumento na rugosidade da superfície, bem como o aparecimento de alguns poros, não existentes anteriormente. Pode-se observar alguns micro-organismos nas imagens, como é o caso da Figura 40(b), que mostra um fragmento de estreptobacilo, ou seja, bactérias em forma de bastonetes e ligadas, formando uma corrente.

A alteração na morfologia já era esperada, conforme apresentado por Corrêa e colaboradores⁸⁹. Após o período de 1 mês, com umidade do solo próxima à 40%, as barras de PHB começaram a apresentar rugosidades em sua superfície e a perda de massa para este período foi de aproximadamente 1%, sendo a maior perda analisada de aproximadamente 2,5%, após 5 meses em contato com o solo simulado. Em um estudo de biodegradação de filmes de PHB em diversos tipos de solo, obteve-se uma perda de 5,8% de massa após 25 dias de contato da amostra com um solo de características semelhantes ao utilizado no presente trabalho²⁷. Nosso grupo realizou trabalho anterior envolvendo PHB e o fungo filamentosso *Metarhizium anisopliae*, no qual se chegou à conclusão de que modificações superficiais no polímero aumentam a biodegradação do mesmo ao serem enxertados grupamentos oxigenados. A perda de massa das amostras não tratadas foi insignificante, mesmo quando incubadas por 20 dias em meio de cultura próprio para o desenvolvimento do fungo, aumentando para até 32,5% quando o filme foi irradiado por 180 minutos e incubado por 20 dias. A morfologia do filme também foi alterada ao longo do estudo, apresentando esferulitas e depressões, um indicativo do processo de biodegradação⁴⁹.

Não foi possível identificar mudanças na morfologia dos filmes de PSU fotolisados com oxigênio após o período de cultivo em solo simulado, embora em algumas imagens foram encontrados micro-organismos aderidos, mesmo após a lavagem com álcool 70% e água destilada. Já para as amostras tratadas com AA foi encontrada grande presença de micro-organismos, percebendo-se um aumento na aderência dos mesmos em função do tempo de tratamento e do tempo de cultivo. A Figura 41 representa as amostras de PSU tratado com AA por 30 minutos após (a) 1, (b) 4 e (c) 10 semanas de cultivo. Nota-se a presença massiva de bacilos na imagem do meio e crescimentos de hifas na imagem da amostra enterrada pelo maior período de ensaio. As imagens das amostras de PSU sem tratamento não mostraram mudanças na superfície das mesmas, mas na amostra enterrada por 10 semanas (Figura 42(d)) foi possível visualizar pequenos agrupamentos de micro-organismos, possivelmente cocobacilos.

Pelas imagens de SEM é possível observar uma maior aderência de micro-organismos nos filmes de PSU tratados com AA do que nos filmes de PHB, comportamento que não era esperado, visto que o segundo é um polímero biodegradável, enquanto o PSU, sintético, seria resistente ao ataque microbiológico.

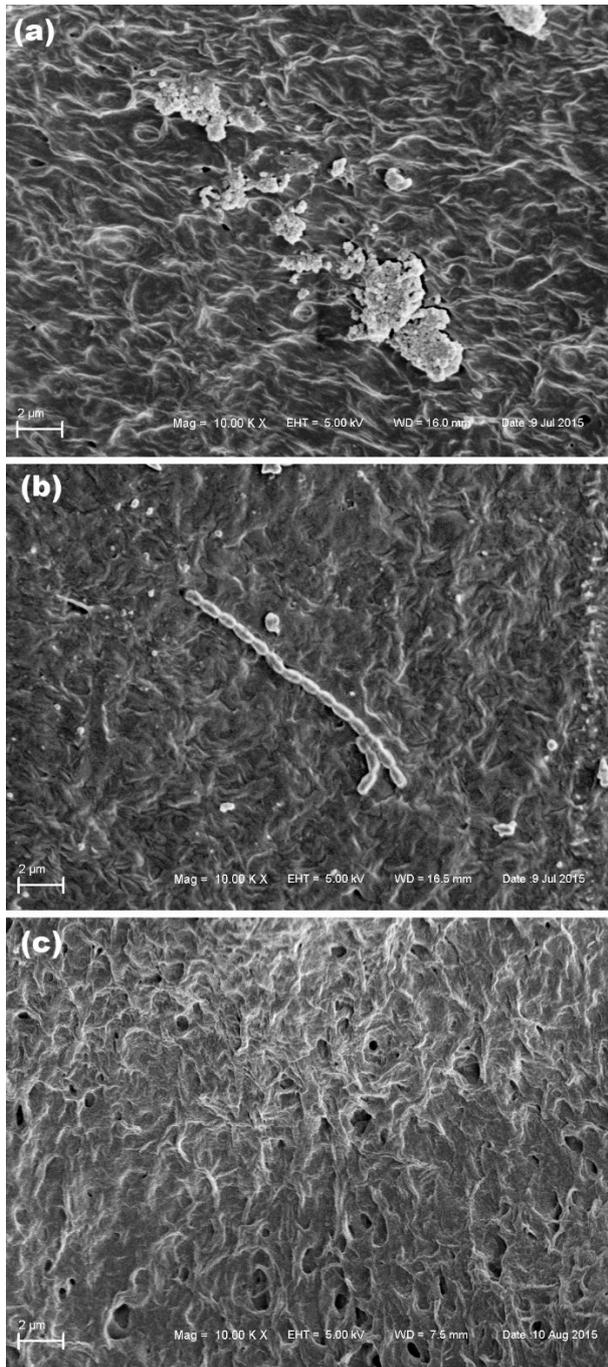


Figura 40. Imagem de SEM das amostras de PHB após (a) 1 semana, (b) 4 semanas e (c) 10 semanas em contato com solo simulado.

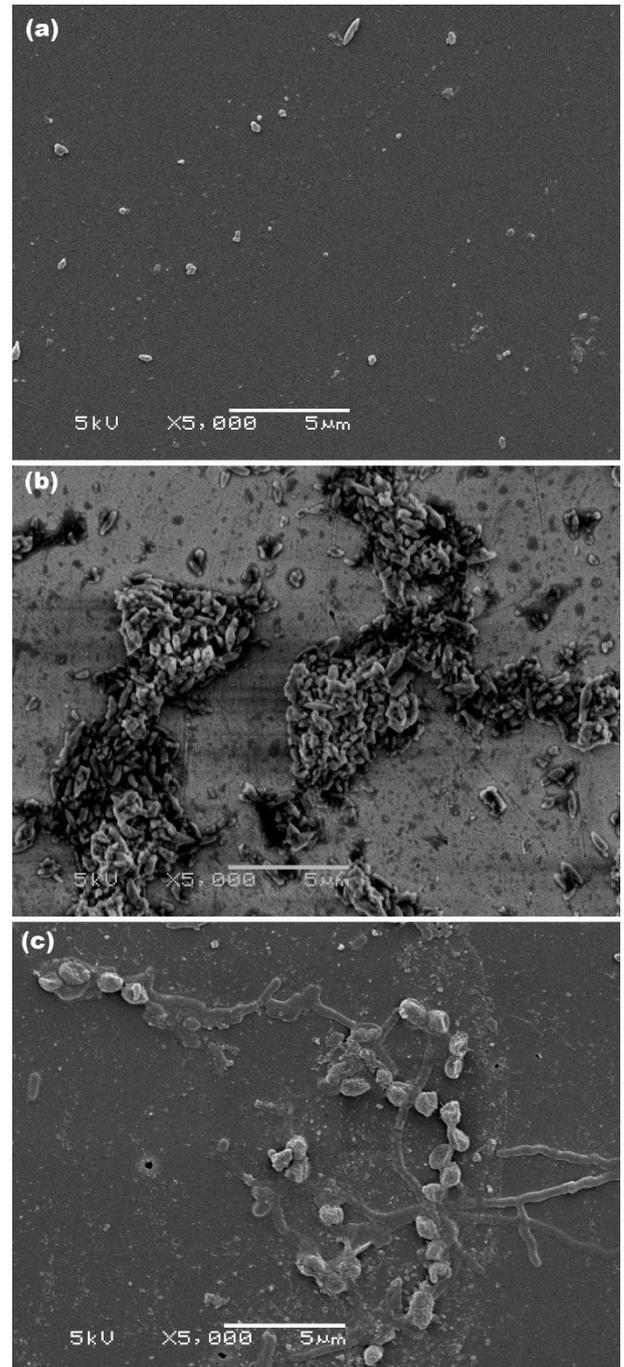


Figura 41. Imagem de SEM das amostras de PSU 30min UV+AA após (a) 1, (b) 4 e (c) 10 semanas em contato com solo simulado.

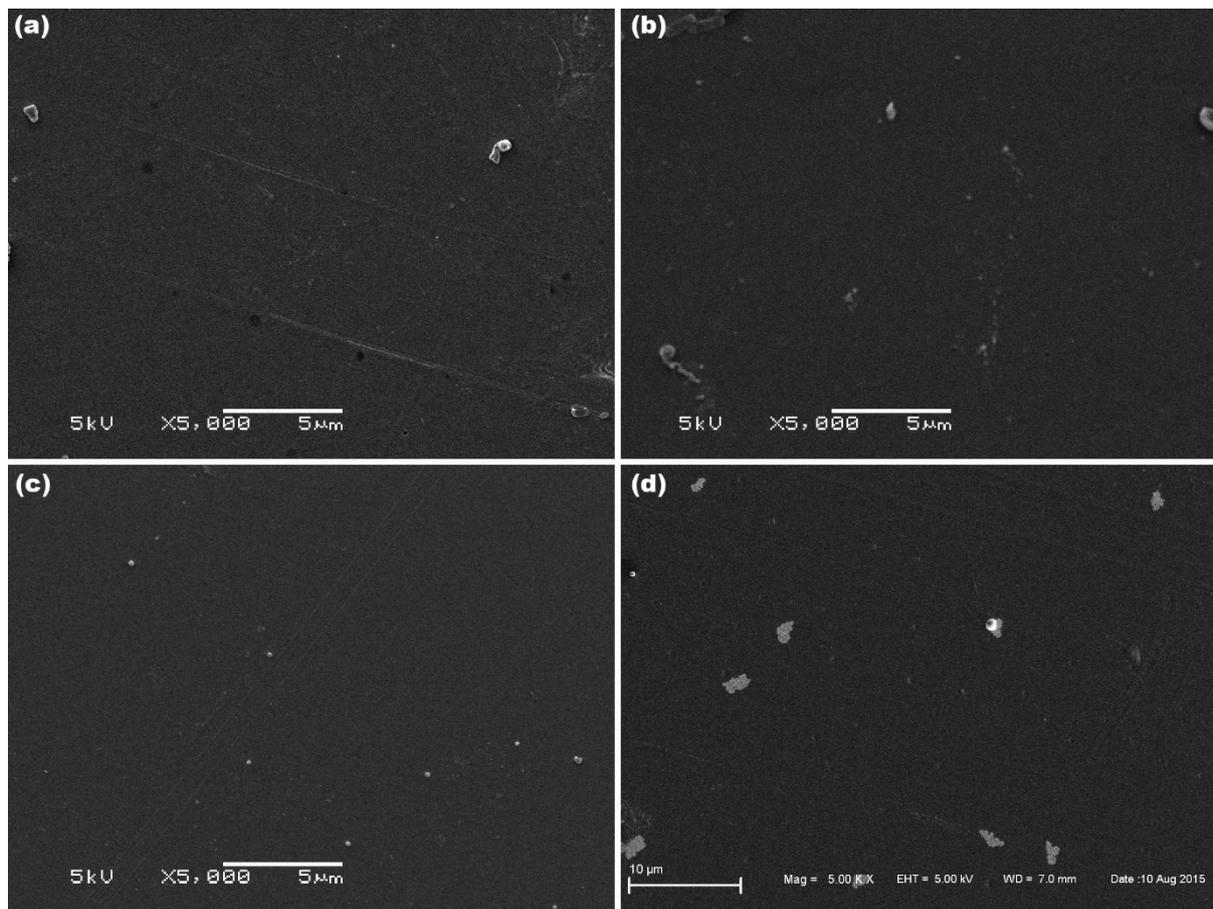


Figura 42. Imagem de SEM dos filmes de PSU ST após (a) 1, (b) 2, (c) 4 e (d) 10 semanas em contato com solo simulado.

As amostras submetidas ao ensaio de solo simulado foram analisadas por FTIR-ATR. As bandas dos filmes de PHB (Figura 43) apresentaram aumento de suas intensidades após o contato com o solo, com modificação em 1453 cm^{-1} , característico do estiramento de CH_3 no plano, e em 1275 cm^{-1} . Tais mudanças são reportadas na literatura e indicam o início da degradação da cadeia polimérica¹³¹.

As amostras de PSU sem tratamento não apresentaram mudanças significativas nos picos e bandas no espectro de FTIR-ATR, apenas em 743 cm^{-1} , característico de adições no anel aromático, onde há uma diminuição do sinal após o contato com o solo simulado (Figura 44).

Maiores mudanças são percebidas nos espectros de FTIR-ATR dos filmes tratados com O_2 (Figuras 45-47). Os picos referentes à carbonila, que surgem após a fotólise, desaparecem depois das amostras terem contato com o solo simulado. Para as amostras tratadas por 120 minutos há a diminuição da banda referente à ligação

O-H e todas as bandas características do polímero sofrem redução após o ensaio de biodegradação, principalmente o pico referente às modificações do anel aromático, levando a crer que este é um sítio ativo de ataque dos micro-organismos presentes no solo.

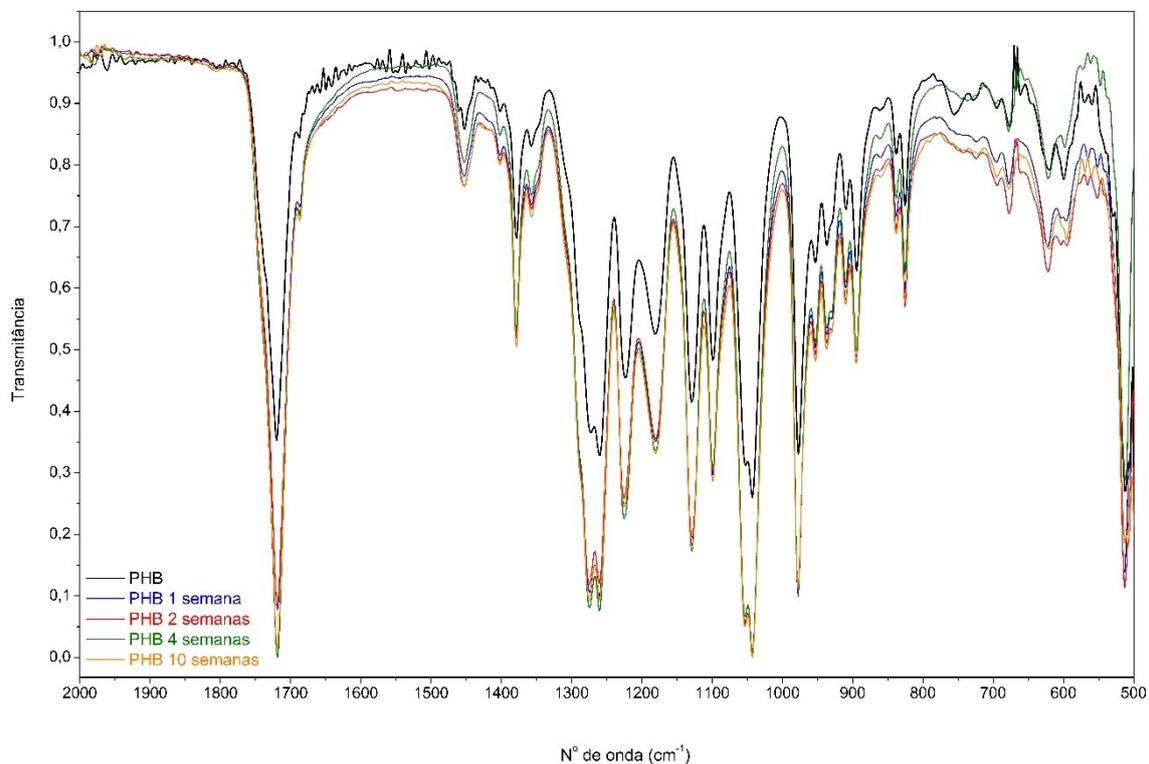


Figura 43. Espectros de FTIR-ATR dos filmes de PHB após ensaio em solo simulado.

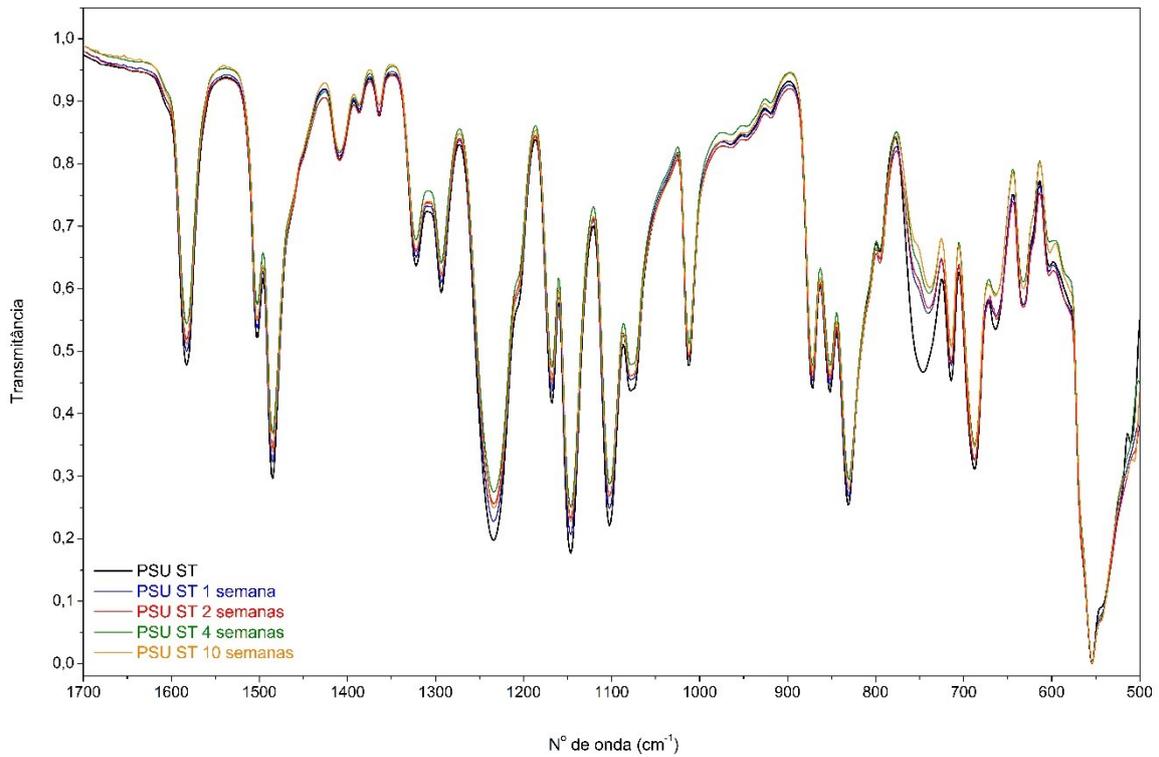


Figura 44. Espectros de FTIR-ATR dos filmes de PSU sem tratamento após ensaio em solo simulado.

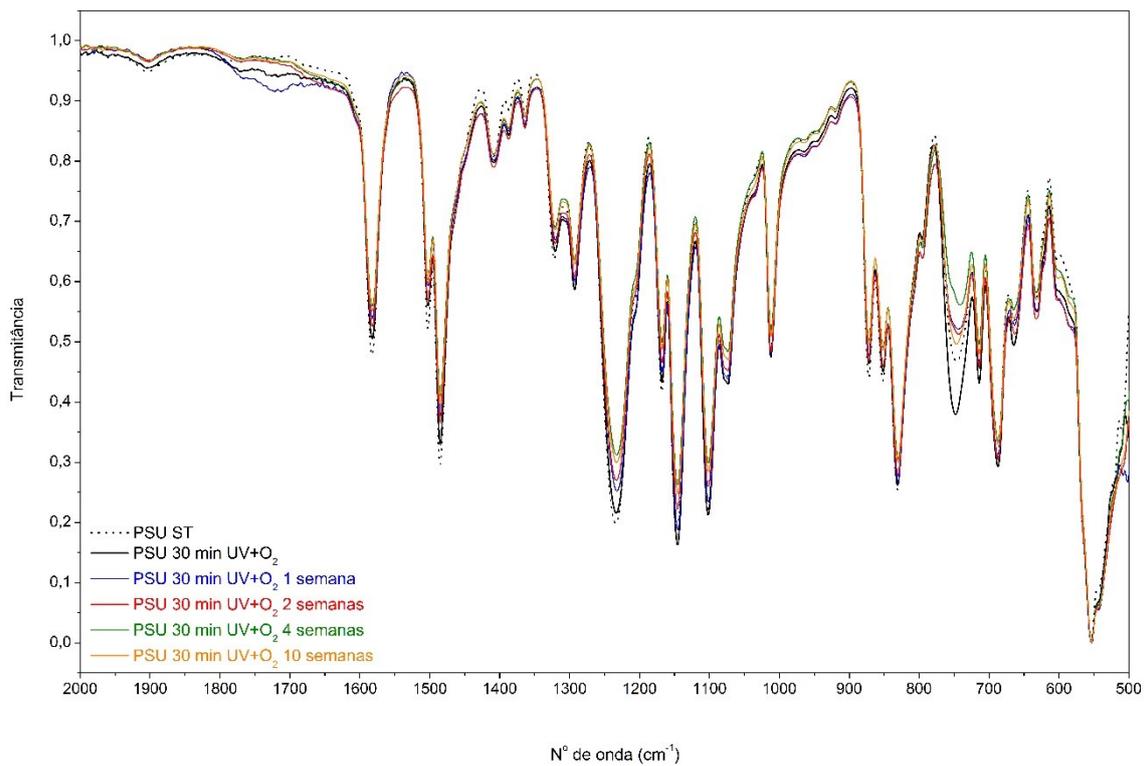


Figura 45. Espectros de FTIR-ATR dos filmes de PSU fotolisados por 30 minutos com O₂ após ensaio em solo simulado.

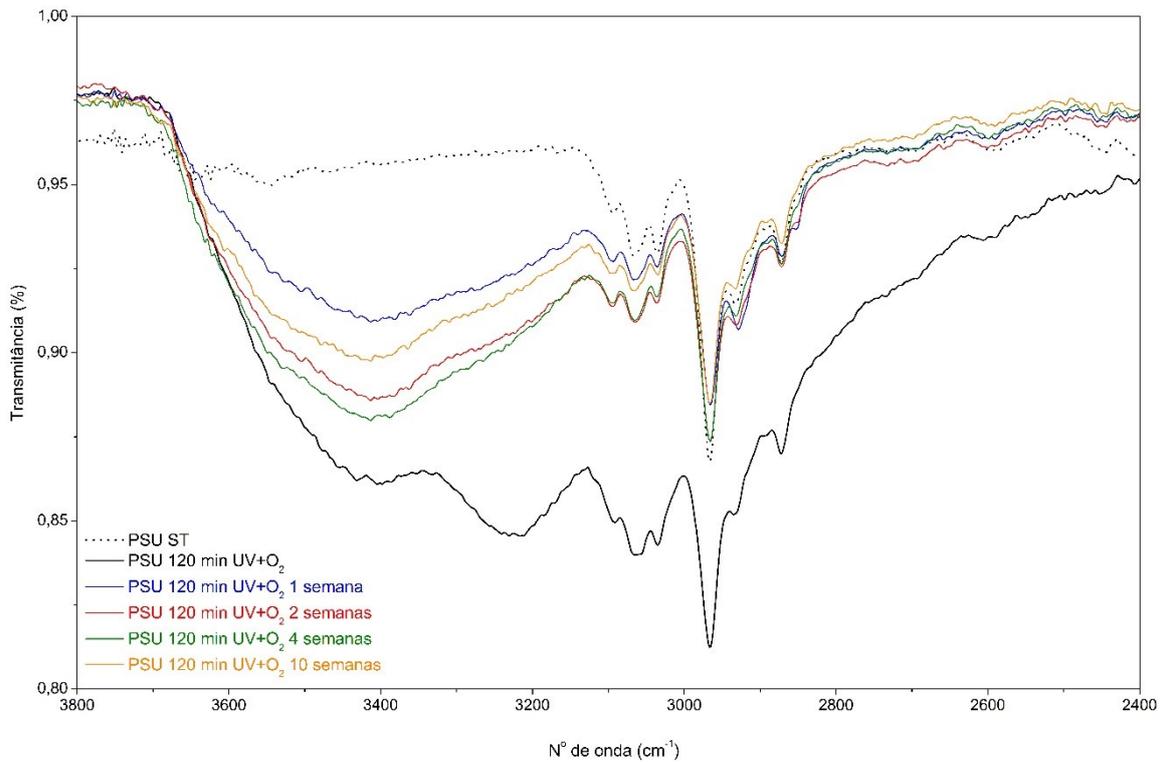


Figura 46. Espectros de FTIR-ATR dos filmes de PSU fotolisados por 120 minutos com O₂ após ensaio em solo simulado, na região entre 3800 e 2400 cm⁻¹.

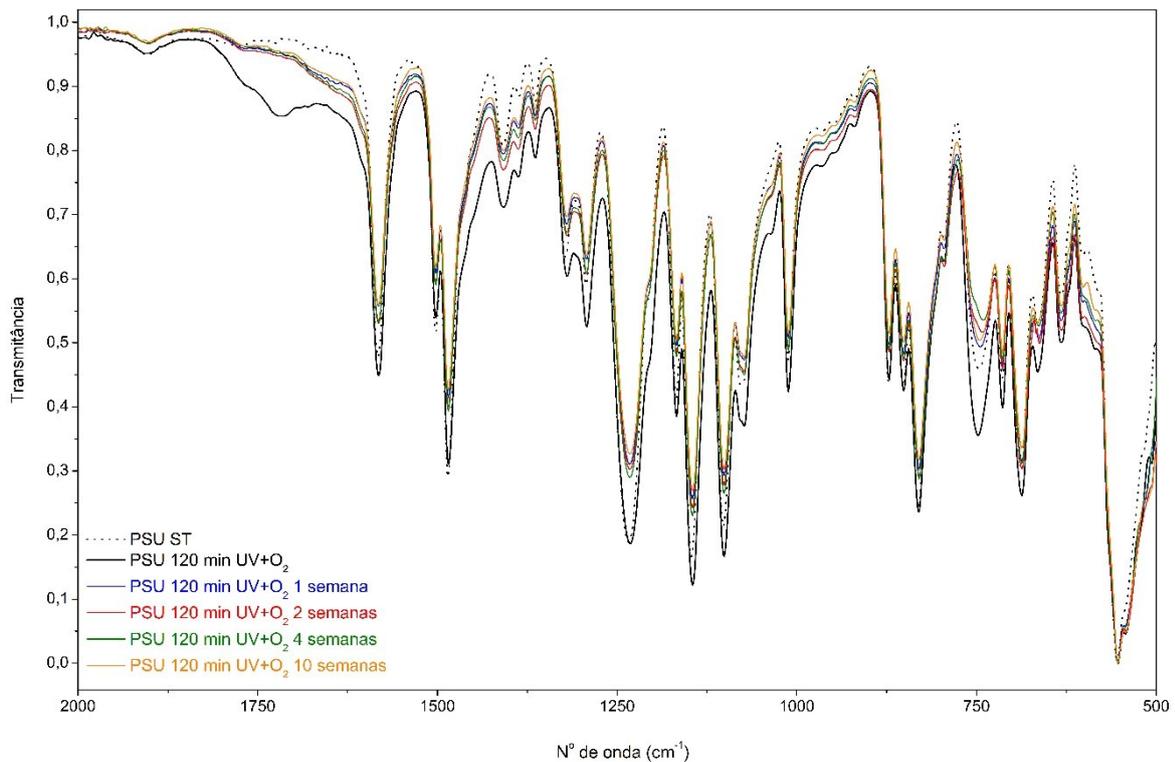


Figura 47. Espectros de FTIR-ATR dos filmes de PSU fotolisados por 120 minutos com O₂ após ensaio em solo simulado, na região entre 2000 e 500 cm⁻¹.

As análises de FTIR-ATR também foram realizadas nas amostras tratadas com AA e submetidas ao ensaio em solo simulado (Figuras 48 e 49). A maior alteração percebida foi o aparecimento de uma banda em 1738 cm^{-1} , região característica da ligação C=O, tanto para as amostras tratadas por 10min quanto para as tratadas por 30 minutos, após 10 semanas em contato com o solo. Há um deslocamento deste pico com relação ao pico da carbonila referente à inserção do filme de PAA sobre a superfície do PSU, podendo indicar que o polímero tenha sofrido hidrólise, gerando grupos oxigenados, além da banda de O-H entre $3600\text{-}3100\text{ cm}^{-1}$, ou algum subproduto da degradação. Tal sinal não é proveniente da terra utilizada, pois não está presente em nenhum outro espectro.

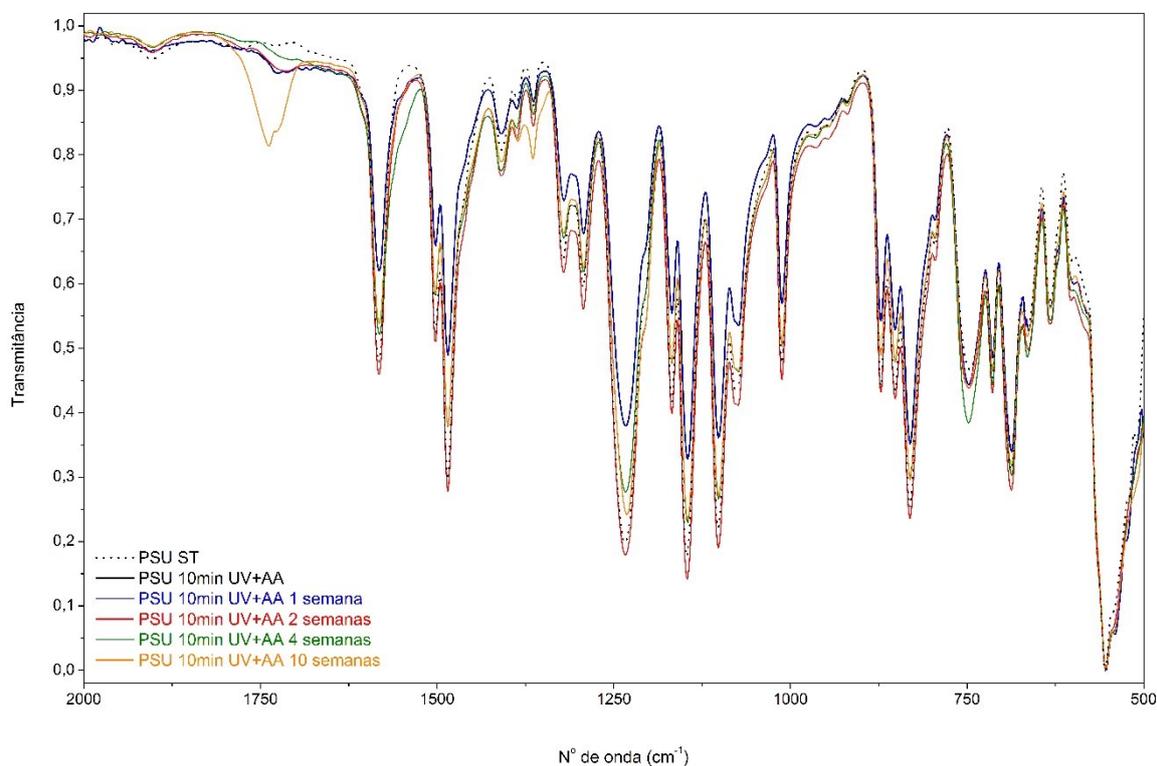


Figura 48. Espectros de FTIR-ATR dos filmes de PSU fotolisados por 10 minutos com AA após ensaio em solo simulado.

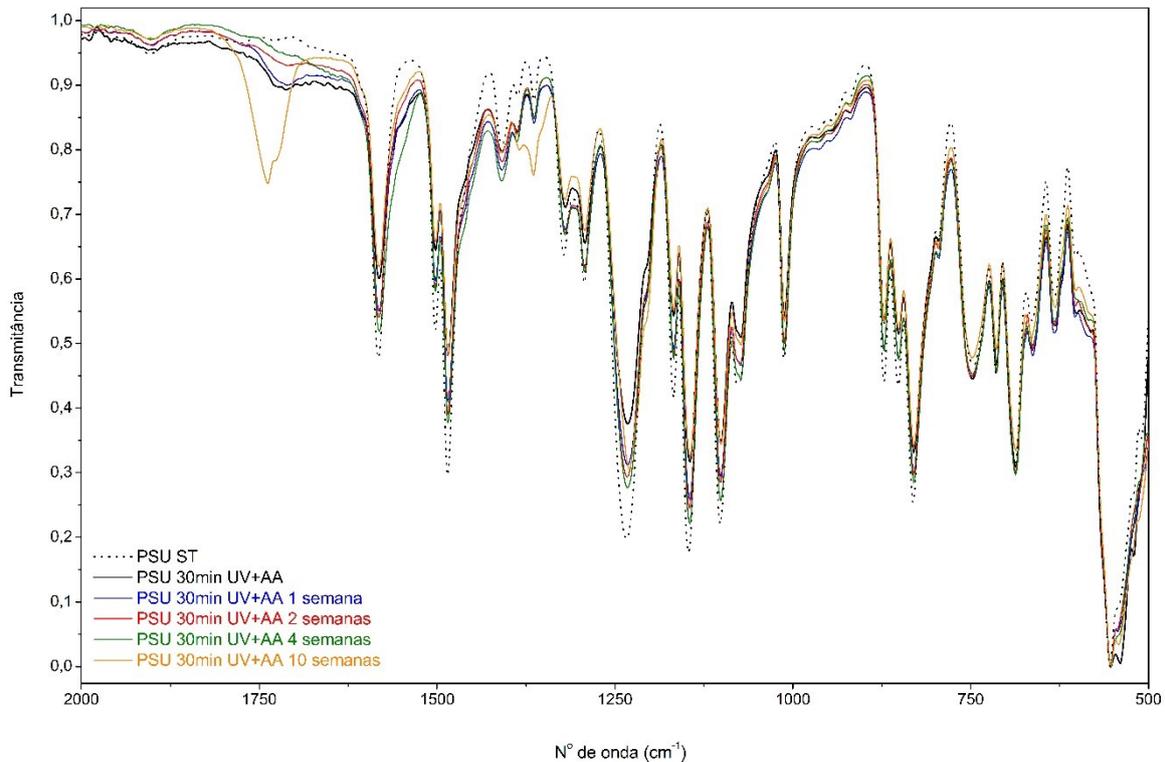


Figura 49. Espectros de FTIR-ATR dos filmes de PSU fotolisados por 30 minutos com AA após ensaio em solo simulado.

Análises de TGA foram realizadas nas amostras após o período de 90 dias em solo simulado (Figura 50). Todas as amostras apresentam o mesmo comportamento, independente do tratamento que receberam, indicando uma maior instabilidade térmica após o contato com o solo, ocorrendo a transição de degradação térmica da cadeia polimérica entre 520°C e 555°C, assim como o comportamento observado para as amostras que estiveram em contato com o MMC e fungos.

Análises de GPC foram realizadas nas amostras antes e após o ensaio de solo simulado. Os valores de Mn e PDI estão representados graficamente nas Figura 51 e 52, respectivamente.

Uma certa tendência é observada nos dois gráficos. O Mn tende a aumentar durante as 2 primeiras semanas de ensaio em solo simulado. O PDI, ao contrário, apresenta diminuição de seus valores durante as duas primeiras semanas, aumentando entre a semana 2 e 10. Em todas as amostras, independente da modificação superficial realizada, durante as primeiras duas semanas de ensaio, os valores de Mw (não apresentadas aqui) aumentaram e os valores para PDI foram

reduzidos. Este comportamento é indicativo de reticulação das cadeias poliméricas¹²⁵, o que já foi visto ao serem comparados os valores do PSU sem tratamento e após cada uma das fotólises. A partir da 4ª semana, as massas molares voltam a diminuir e o PDI aumenta, ou seja, ocorre uma maior distribuição das massas molares, o que é indicativo de uma maior fragmentação da cadeia polimérica, levando a crer que a ação dos micro-organismos do solo está sendo efetiva na biodegradação do PSU. Além disso, há um leve aumento dessa fragmentação quando os tempos de fotólise são comparados, ou seja, as amostras tratadas por 120 minutos em O₂ tem maior fragmentação que as tratadas por 30 minutos sob mesma atmosfera, assim como as fotolisadas com AA por 30 minutos fragmentam em massas molares menores que as amostras irradiadas por 10 minutos em AA.

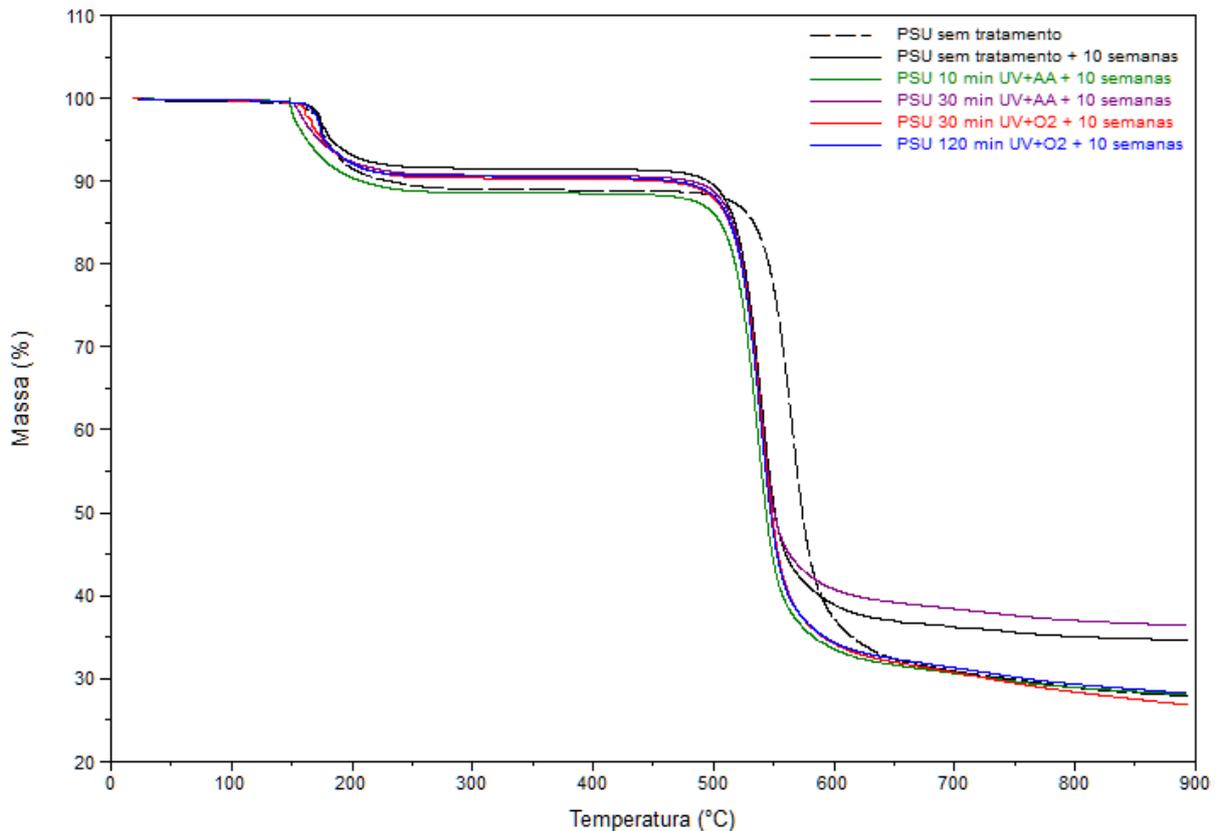


Figura 50. Termogramas dos filmes de PSU sem tratamento antes e filmes tratados e não tratado após 90 dias em solo simulado.

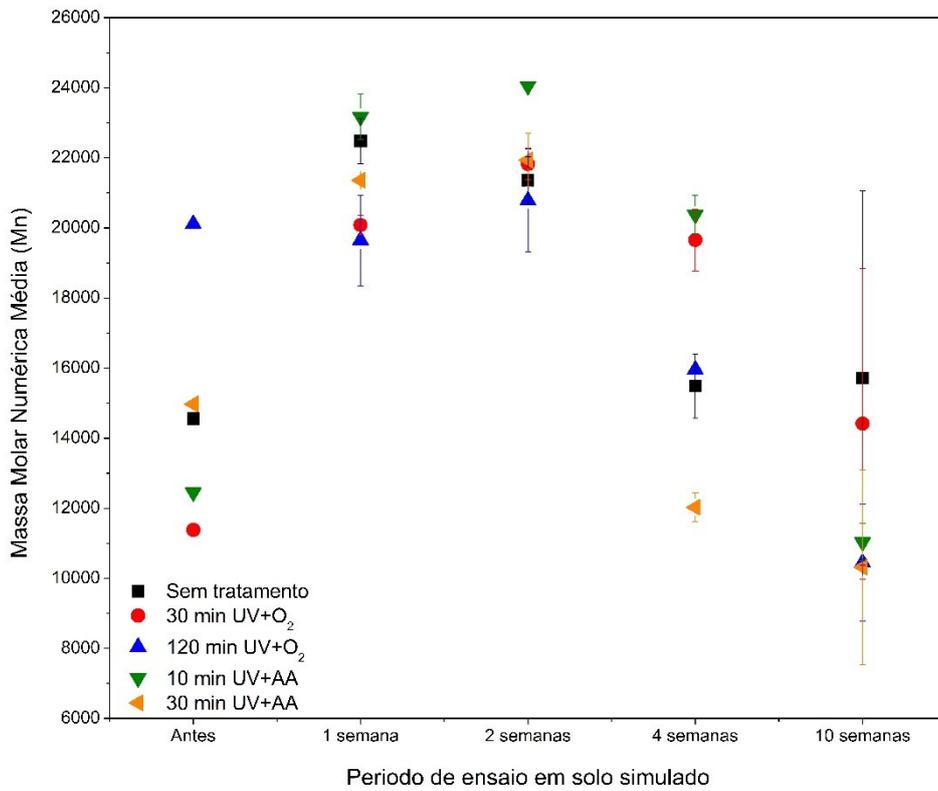


Figura 51. Gráfico de Mn dos filmes de PSU em função do período de ensaio em solo simulado.

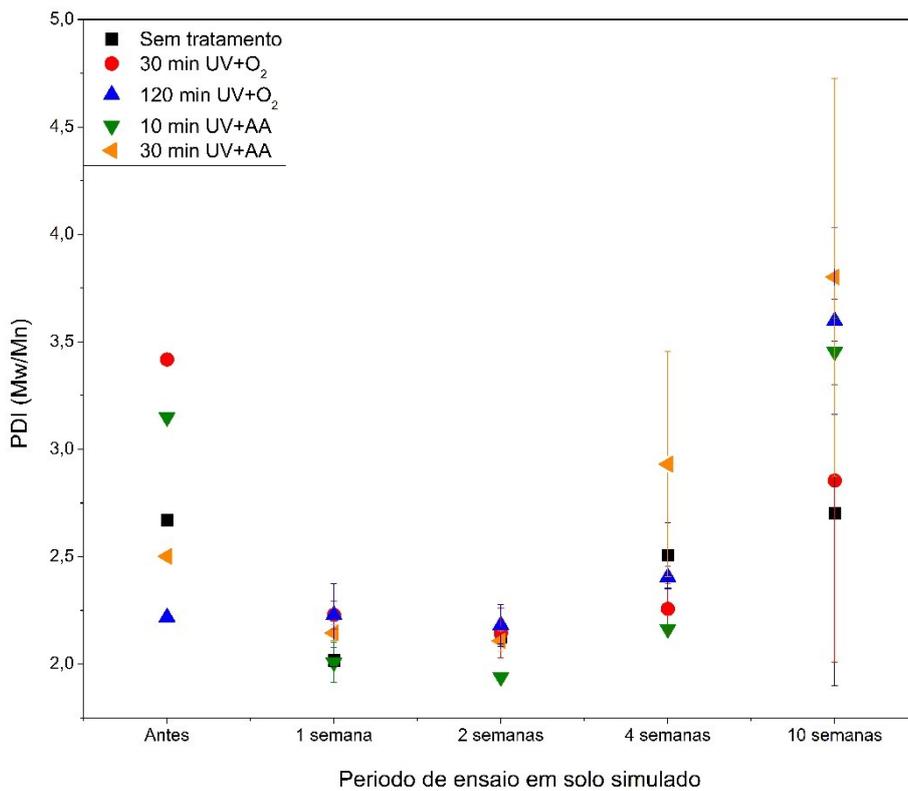


Figura 52. Gráfico de PDI dos filmes de PSU em função do período de ensaio em solo simulado.

Os dados de TGA e GPC estão em concordância, mostrando que ocorrem mudanças na cadeia polimérica dos filmes após os 90 dias em contato com o solo simulado, sendo estas mais significativas quando tratadas com AA e O₂ pelos maiores tempos de fotólise.

5.3.1. Identificação morfológica dos micro-organismos presentes no Solo Simulado

Os micro-organismos presentes no substrato utilizado para o ensaio de solo simulado foram isolados e caracterizados morfológicamente¹³²⁻¹³⁴. Tal identificação é necessária para posteriores estudos de biodegradação de polímeros, pois, como há indicativos de mudanças na estrutura polimérica dos filmes de PSU após o ensaio, saber quais micro-organismos atuaram de forma efetiva nessa mudança e tentar identificar quais enzimas são responsáveis por elas, é de grande importância. A Figura 53 mostra as sete placas obtidas e suas respectivas análises em microscópio óptico. A Tabela 6 mostra o resultado da identificação morfológica e da coloração Gram das placas 1 a 7.

A partir de uma análise visual prévia, acreditava-se que o micro-organismo que se desenvolveu na placa 5a era uma levedura, pois o meio de cultivo presente na placa continha clorofenicol, um antibiótico utilizado para evitar a contaminação por bactérias. Após visualização em microscópio óptico foi constatado que o micro-organismo era, na verdade, um cocobacilo resistente, já que se desenvolveu mesmo com a presença do clorofenicol. Outra identificação visual que se mostrou equivocada foi a da placa 6a. Acreditava-se ser bactéria, mas após coloração de Gram, a morfologia indicou que se tratava de um actinomiceto, considerado bactéria Gram positivo, com organização filamentosa, muitas vezes ramificada. Dada sua semelhança com fungos e por produzirem cadeias de esporos semelhantes a conídios, os actinomicetos são com frequência erroneamente classificados como tais. Ao contrário dos fungos, porém, são organismos procarióticos e em sua grande maioria aeróbios.

Tabela 6. Identificação morfológica dos micro-organismos isolados do substrato utilizado como solo simulado

Placa	Micro-organismo	Morfologia	Coloração Gram
1a-1b	Bactéria	Bacilo	Negativo
2a-2b	Bactéria	Cocobacilo	Negativo
3a-3b	Bactéria	Bacilo	Positivo
4a-4b	Bactéria	Estreptobacilo	Inconclusivo
5a-5b	Bactéria	Cocobacilo	Não efetuada
6a-6b	Actinomiceto	Não se aplica	Não se aplica
7a-7b	Fungo	Filamentoso	Não se aplica

Devido aos resultados positivos na biodegradação dos polímeros modificados e submetidos ao ensaio de solo simulado, a identificação e isolamento dos micro-organismos presentes nesse solo se faz necessária, a fim de se verificar qual deles atua mais ativamente na degradação e quais são as enzimas liberadas para que ocorra a quebra da cadeia polimérica. Trabalhos posteriores darão seguimento à essa identificação e utilização de cada micro-organismos separadamente sobre as amostras poliméricas.

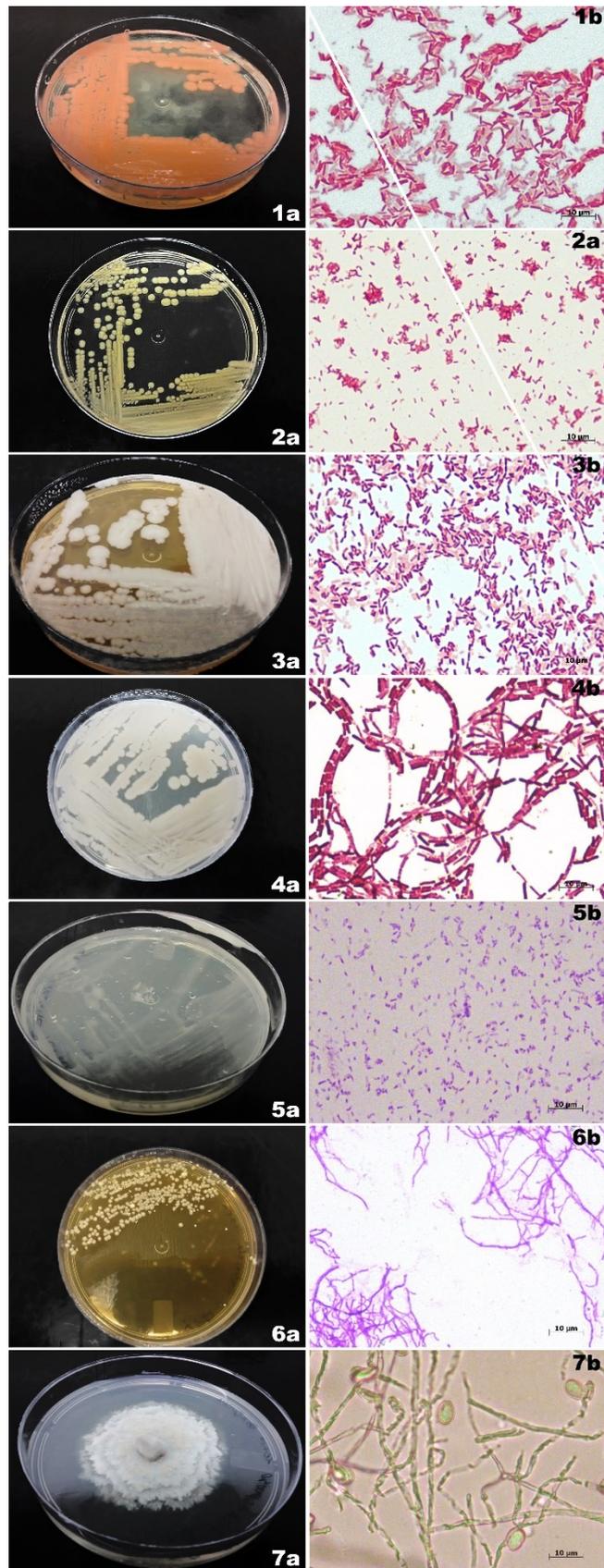


Figura 53. Fotos das placas de cultivo dos micro-organismos isolados do solo simulado (1a-7a) e respectivas imagens de microscopia óptica (1b-7b) com magnificação 40x.

6. CONCLUSÕES

Neste trabalho, filmes de PSU foram modificados superficialmente utilizando radiação UV na presença de gases e vapores reativos, O₂ e AA. A caracterização dos mesmos, através de diversas técnicas, comprovou que há a inserção de grupamentos oxigenados nos radicais promovidos pela incidência de raios UV, resultando em superfícies com características hidrofílicas sem alterar o bulk polimérico. A modificação utilizando UV sob atmosfera de AA foi mais efetiva na busca da hidrofiliabilidade, pois atingiu ângulos de contato menores em menor tempo de fotólise, quando comparado ao tratamento de UV sob atmosfera de O₂.

Ao empregar o fungo *Metarhizium anisopliae*, juntamente com a modificação da superfície para estimular o crescimento do mesmo, foi possível acelerar a biodegradação das amostras testadas. Pode-se observar uma grande adesão e crescimento de massa fúngica para os filmes de PSU tratados, em comparação com o PSU original. As análises gravimétricas, embora não apresentem comportamento linear, mostram uma tendência de modificação das massas das amostras tratadas, mas não permitem uma comparação quantitativa definitiva com outros dados de degradação da polisulfona.

As amostras de PSU não modificadas não foram reconhecidas pelo fungo *Metarhizium anisopliae* como um substrato favorável ao seu desenvolvimento. Esta informação foi confirmada através de análises de OM, SEM, Perfilometria Ótica e FTIR-ATR, onde se observou a presença dos esporos do fungo, mas sem nenhum indício de crescimento.

As fotólises realizadas sob atmosfera oxidante obtiveram resultados pouco satisfatórios quanto ao ataque fúngico quando comparados aos resultados obtidos nos filmes tratados com AA, mas ainda assim apresentam indícios de biodegradação verificáveis pela técnica de FTIR-ATR, onde as bandas que aparecem em função do tempo dos tratamentos tendem a desaparecer após as incubações. O mesmo comportamento é observável após o ensaio em solo simulado. As amostras alcançam menor estabilidade térmica e maior fragmentação das cadeias após o estudo, sendo mais pronunciado este efeito nas amostras modificadas, especialmente as tratadas com irradiação UV e AA.

Os valores de PDI, obtidos através das análises de GPC, mostraram uma maior fragmentação da cadeia polimérica dos filmes tratados com AA após 30 dias em teste *in vitro* com o fungo, sendo comparáveis aos dados obtidos após 10 semanas de ensaio em solo simulado. Fatores como falta de umidade e competição entre os microorganismos presentes na terra podem ter influenciado na lenta biodegradação polimérica. O consórcio de bactérias, fungos e actinomicetos deve ser investigado isoladamente e em ambiente com maior controle, a fim de verificar suas atuações na superfície polimérica e quais são as enzimas responsáveis pela cisão da cadeia do PSU.

A técnica de modificação superficial UV-assistida na presença de vapores e gases reativos é efetiva na alteração da superfície da polisulfona, tornando-a mais suscetível ao ataque e desenvolvimento do *Metarhizium anisopliae* e de outros microorganismos, quando em ambiente favorável. Conclui-se, então, que essa técnica pode ser utilizada como método a ser aplicado no pós-descarte de produtos feitos de PSU, a fim deste ser biodegradado e não mais acumulado no meio ambiente.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. PlasticsEurope - Plastics - The Facts 2013. <http://www.plasticseurope.org/Document/plastics-the-facts-2013.aspx?FolID=2> (27/08/2014),
2. Barnes, D. K. A., et al.; Accumulation and fragmentation of plastic debris in global environments. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* **2009**, 364, 1985-1998.
3. Thompson, R. C., et al.; Our plastic age. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* **2009**, 364, 1973-1976.
4. MMA - Plano Nacional de Resíduos Sólidos. http://www.mma.gov.br/port/conama/processos/E99F974D/Doc_PNRS_consultaspublicas1.pdf (05/10/2015),
5. Plastivida - Monitoramento dos Índices de Reciclagem Mecânica de Plástico no Brasil (IRmP) 2012. http://www.plastivida.org.br/2009/pdfs/IRmP/Apresentacao_IRMP_2012.pdf (27/08/2014),
6. Chen, H., et al.; Biocompatible polymer materials: Role of protein-surface interactions. *Progress in Polymer Science* **2008**, 33, 1059-1087.
7. Ma, Z., et al.; Surface modification and property analysis of biomedical polymers used for tissue engineering. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **2007**, 60, 137-157.
8. Murakami, T. N., et al.; Modification of PS films by combined treatment of ozone aeration and UV irradiation in aqueous ammonia solution for the introduction of amine and amide groups on their surface. *Applied Surface Science* **2005**, 249, 425-432.
9. Weibel, D. E., et al.; Surface modification of polyurethane membranes using acrylic acid vapour plasma and its effects on the pervaporation processes. *Journal of Membrane Science* **2007**, 293, 124-132.
10. Pelletier, J.; Anders, A.; Plasma-based ion implantation and deposition: a review of physics, technology, and applications. *Plasma Science, IEEE Transactions on* **2005**, 33, 1944-1959.
11. Chan, C. M., et al.; Polymer surface modification by plasmas and photons. *Surface Science Reports* **1996**, 24, 1-54.
12. Blythe, A. R., et al.; Surface modification of polyethylene by electrical discharge treatment and the mechanism of autoadhesion. *Polymer* **1978**, 19, 1273-1278.
13. Choi, H.-S., et al.; Plasma-induced graft co-polymerization of acrylic acid onto the polyurethane surface. *Surface and Coatings Technology* **2004**, 182, 55-64.
14. Bhattacharya, A.; Misra, B. N.; Grafting: a versatile means to modify polymers: Techniques, factors and applications. *Progress in Polymer Science* **2004**, 29, 767-814.
15. Mitchell, S. A., et al.; Orientation and confinement of cells on chemically patterned polystyrene surfaces. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **2005**, 46, 108-116.
16. Wirsén, A., et al.; Solvent-Free Vapor-Phase Photografting of Acrylamide onto Poly(ethylene terephthalate). *Biomacromolecules* **2005**, 6, 2697-2702.
17. Rajajeyaganthan, R., et al. In *Brazilian Polymer Congress*, Wiley-V C H Verlag GmbH: Weinheim, 2011; 175-182.
18. Kessler, F., et al.; Controlling the surface wettability of poly(sulfone) films by UV-assisted treatment: benefits in relation to plasma treatment. *Polymer International* **2013**, 62, 310-318.

19. Weibel, D. E.; Polymer Surface Functionalization Using Plasma, Ultraviolet and Synchrotron Radiation. *Compos. Interfaces* **2010**, *17*, 127-136.
20. Kessler, F. Funcionalização superficial de materiais poliméricos induzida por radiação eletromagnética em presença de gases e vapores reativos. Dissertação, PPGQ-UFRGS, **2010**.
21. Artham, T.; Doble, M.; Biodegradation of Physicochemically Treated Polycarbonate by Fungi. *Biomacromolecules* **2010**, *11*, 20-28.
22. Bentham, R. H., et al.; Rapid assessment of the microbial deterioration of Polyurethanes. *International Biodeterioration* **1987**, *23*, 377-386.
23. Bhardwaj, H., et al.; Communities of Microbial Enzymes Associated with Biodegradation of Plastics. *J Polym Environ* **2013**, *21*, 575-579.
24. Campos, A. d., et al.; Biodegradação de filmes de PP/PCL em solo e solo com chorume. *Polimeros* **2010**, *20*, 295-300.
25. Chandra, R.; Rustgi, R.; Biodegradable polymers. *Progress in Polymer Science* **1998**, *23*, 1273-1335.
26. de Faria, A. U.; Martins-Franchetti, S. M.; Biodegradation of Polypropylene (PP), Poly(3-hydroxybutyrate) (PHB) Films and PP/PHB Blend by Microorganisms from Atibaia River. *Polimeros* **2010**, *20*, 141-147.
27. Kim, M.-N., et al.; Biodegradation of poly(3-hydroxybutyrate), Sky-Green® and Mater-Bi® by fungi isolated from soils. *European Polymer Journal* **2000**, *36*, 1677-1685.
28. Geweely, N. S.; Ouf, S. A.; Enhancement of fungal degradation of starch based plastic polymer by laser-induced plasma. *African Journal of Microbiology Research* **2011**, *5*, 9.
29. Lubeck, I., et al.; Evaluation of *Metarhizium anisopliae* strains as potential biocontrol agents of the tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* and the cotton stainer *Dysdercus peruvianus*. *Fungal Ecol.* **2008**, *1*, 78-88.
30. Guillet, J. E.; *Polymer photophysics and photochemistry*. Press Syndicate of the University of Cambridge: **1985**.
31. Gancarz, I., et al.; Modification of polysulfone membranes. 2. Plasma grafting and plasma polymerization of acrylic acid. *Acta Polymerica* **1999**, *50*, 317-326.
32. Pethrick, R. A.; *Polymer surface modification and characterization*. John Wiley & Sons, Ltd.: Nova York, **1993**.
33. Sanchis, M. R., et al.; Characterization of the surface changes and the aging effects of low-pressure nitrogen plasma treatment in a polyurethane film. *Polymer Testing* **2008**, *27*, 75-83.
34. Voronin, S. A., et al.; Time-resolved mass and energy spectral investigation of a pulsed polymerising plasma struck in acrylic acid. *Surface and Coatings Technology* **2006**, *201*, 768-775.
35. Wirsén, A., et al.; Solvent free vapour phase photografting of acrylamide onto poly(methyl methacrylate). *Polymer* **2005**, *46*, 4554-4561.
36. Fujii, K., et al.; Photon stimulated ion desorption of deuterated polystyrene thin films induced by core excitation. *Journal of Electron Spectroscopy and Related Phenomena* **1998**, *88-91*, 837-842.
37. He, D., et al.; Photo-irradiation for preparation, modification and stimulation of polymeric membranes. *Progress in Polymer Science* **2009**, *34*, 62-98.
38. NTP - Ultraviolet-Radiation-Related Exposures. <https://ntp.niehs.nih.gov/ntp/roc/content/profiles/ultravioletradiationrelatedexposures.pdf> (19/10/2015),

39. Guerrero-Beltrón, J. A.; Barbosa-Coronas, G. V.; Advantages and Limitations on Processing Foods by UV Light. *Food Science and Technology International* **2004**, *10*, 137-147.
40. Benvenuti, E. V.; *Química Inorgânica - Átomos, Moléculas, Líquidos e Sólidos*. Editora UFRGS: Porto Alegre, **2006**.
41. Calvert, J. G.; Pitts, J. N. J.; *Photochemistry*. John Wiley & Sons: New York, **1966**.
42. Klessinger, M.; Michl, J.; *Excited States and Photo-Chemistry of Organic Molecules*. VCH Publishers: Estados Unidos, **1995**.
43. Rohatgi-Mukherjee; *Fundamentals of Photochemistry*. New Age International Limited: Calcuta, **1978**.
44. Weibel, D. E., et al.; Ultraviolet-induced surface modification of polyurethane films in the presence of oxygen or acrylic acid vapours. *Thin Solid Films* **2009**, *517*, 5489-5495.
45. Thapliyal, B. P.; Chandra, R.; Advances in photodegradation and stabilization of polyurethanes. *Progress in Polymer Science* **1990**, *15*, 735-750.
46. Kessler, F. Fotofuncionalização Superficial de Polímeros: indução de biocompatibilidade e biodegradabilidade. Tese de Doutorado, DFQ-IQ, UFRGS, Porto Alegre, **2014**.
47. Allmér, K., et al.; Surface modification of polymers. I. Vapour phase photografting with acrylic acid. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry* **1988**, *26*, 2099-2111.
48. Allmér, K., et al.; Surface modification of polymers. II. Grafting with glycidyl acrylates and the reactions of the grafted surfaces with amines. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry* **1989**, *27*, 1641-1652.
49. Kessler, F., et al.; Biodegradation improvement of poly(3-hydroxy-butyrate) films by entomopathogenic fungi and UV-assisted surface functionalization. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* **2014**, *130*, 57-67.
50. Belmonte, G. K. Modificação Superficial Fotoinduzida por Radiação UV, VUV e EUV de Polímeros Sintéticos e Biocompatíveis com potencial para aplicação em Biociências e Litografia EUV. Dissertação de Mestrado, DFQ-IQ, UFRGS, Porto Alegre, **2015**.
51. Parker, D., et al. In *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA: 2000;
52. Kuroda, S.-i., et al.; Degradation of aromatic polymers—I. Rates of crosslinking and chain scission during thermal degradation of several soluble aromatic polymers. *European Polymer Journal* **1989**, *25*, 1-7.
53. Kuroda, S.-i.; Mita, I.; Degradation of aromatic polymers—II. The crosslinking during thermal and thermo-oxidative degradation of a polyimide. *European Polymer Journal* **1989**, *25*, 611-620.
54. Kuroda, S.-i., et al.; Degradation of aromatic polymers—III. Crosslinking and chain scission during photodegradation of polysulphones. *European Polymer Journal* **1989**, *25*, 621-627.
55. Kuroda, S.-i., et al.; Degradation of aromatic polymers: Part IV—Effect of temperature and light intensity on the photodegradation of polyethersulfone. *Polym. Degrad. Stabil.* **1990**, *27*, 257-270.
56. Yamashita, T., et al.; Degradation of sulfur-containing aromatic polymers: Photodegradation of polyethersulfone and polysulfone. *Polym. Degrad. Stabil.* **1993**, *39*, 47-54.

57. Yamagishi, H., et al.; Development of a novel photochemical technique for modifying poly (arylsulfone) ultrafiltration membranes. *Journal of Membrane Science* **1995**, *105*, 237-247.
58. Ulbricht, M.; Riedel, M.; Ultrafiltration membrane surfaces with grafted polymer 'tentacles': preparation, characterization and application for covalent protein binding. *Biomaterials* **1998**, *19*, 1229-1237.
59. Béquet, S., et al.; From ultrafiltration to nanofiltration hollow fiber membranes: a continuous UV-photografting process. *Desalination* **2002**, *144*, 9-14.
60. Kilduff, J. E., et al.; Photochemical modification of poly(ether sulfone) and sulfonated poly(sulfone) nanofiltration membranes for control of fouling by natural organic matter. *Desalination* **2000**, *132*, 133-142.
61. Shim, J. K., et al.; pH-dependent permeation through polysulfone ultrafiltration membranes prepared by ultraviolet polymerization technique. *J. Appl. Polym. Sci.* **1999**, *74*, 75-82.
62. Stoica-Guzun, A., et al.; Biodegradation of Poly(vinyl alcohol) and Bacterial Cellulose Composites by *Aspergillus niger*. *J Polym Environ* **2011**, *19*, 69-79.
63. Gu, J.-D.; Microbiological deterioration and degradation of synthetic polymeric materials: recent research advances. *International Biodeterioration & Biodegradation* **2003**, *52*, 69-91.
64. Sutherland, G. J., et al.; Biodegradation of crosslinked acrylic polymers by a white-rot fungus. *Environ. Sci. & Pollut. Res.* **1997**, *4*, 16-20.
65. Yi Liu, Z., et al.; *Cordyceps brittlebankisoides*, a New Pathogen of Grubs and Its Anamorph, *Metarhizium anisopliae* var. *majus*. *Journal of Invertebrate Pathology* **2001**, *78*, 178-182.
66. Silva, W. O. B., et al.; Characterization of a spore surface lipase from the biocontrol agent *Metarhizium anisopliae*. *Process Biochemistry* **2009**, *44*, 829-834.
67. Shah, P. A.; Pell, J. K.; Entomopathogenic fungi as biological control agents. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2003**, *61*, 413-423.
68. Roberts, D. W.; St. Leger, R. J. In *Advances in Applied Microbiology*, Academic Press: 2004; 1-70.
69. Arruda, W., et al.; Morphological Alterations of *Metarhizium anisopliae* During Penetration of *Boophilus microplus* Ticks. *Exp Appl Acarol* **2005**, *37*, 231-244.
70. Marconatto, L. Avaliação da Degradação de Polímeros por *Metarhizium Anisopliae*. Dissertação de Mestrado, CBIOT, UFRGS, Porto Alegre, **2013**.
71. Rieger, B., et al. In *Advances in Polymer Science*, Springer Heidelberg Dordrecht London New York: 2012; 374.
72. Franchetti, S. M. M.; Marconato, J. C.; Polímeros biodegradáveis - uma solução parcial para diminuir a quantidade dos resíduos plásticos. *Química Nova* **2006**, *29*, 811-816.
73. ISO, ISO 472:1988 - Plastics - Vocabulary, 1988.
74. ASTM, D883 - 12 - Standard Terminology Relating to Plastics, 2012.
75. ISO, ISO 472:2013 - Plastics - Vocabulary, 2013.
76. Mueller, R. J.; Biological degradation of synthetic polyesters - Enzymes as potential catalysts for polyester recycling. *Process Biochemistry* **2006**, *41*, 2124-2128.
77. Ammala, A., et al.; An overview of degradable and biodegradable polyolefins. *Progress in Polymer Science* **2011**, *36*, 1015-1049.
78. Sawada, H.; ISO standard activities in standardization of biodegradability of plastics—development of test methods and definitions. *Polym. Degrad. Stabil.* **1998**, *59*, 365-370.

79. Rudnik, E. In *Compostable Polymer Materials*, Elsevier: Amsterdam, 2008; 112-166.
80. Eubeler, J. P., et al.; Environmental biodegradation of synthetic polymers I. Test methodologies and procedures. *Trac-Trends Anal. Chem.* **2009**, *28*, 1057-1072.
81. Eubeler, J. P., et al.; Environmental biodegradation of synthetic polymers II. Biodegradation of different polymer groups. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **2010**, *29*, 84-100.
82. Hu, S. G., et al.; Antibacterial and biodegradable properties of polyhydroxyalkanoates grafted with chitosan and chitooligosaccharides via ozone treatment. *J. Appl. Polym. Sci.* **2003**, *88*, 2797-2803.
83. Cosgrove, L., et al.; Effect of Biostimulation and Bioaugmentation on Degradation of Polyurethane Buried in Soil. *Appl. Environ. Microbiol.* **2010**, *76*, 810-819.
84. Starnecker, A.; Menner, M.; Assessment of biodegradability of plastics under simulated composting conditions in a laboratory test system. *International Biodeterioration & Biodegradation* **1996**, *37*, 85-92.
85. Augusta, J., et al.; A rapid evaluation plate-test for the biodegradability of plastics. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **1993**, *39*, 673-678.
86. Moore, G. F.; Saunders, S. M.; *Advances in Biodegradable Polymers*. Taylor & Francis: **1998**.
87. Rychter, P., et al.; Environmental Degradation of Polyester Blends Containing Atactic Poly(3-hydroxybutyrate). Biodegradation in Soil and Ecotoxicological Impact. *Biomacromolecules* **2006**, *7*, 3125-3131.
88. Volova, T. G., et al.; Biodegradation of polyhydroxyalkanoates (PHAs) in tropical coastal waters and identification of PHA-degrading bacteria. *Polym. Degrad. Stabil.* **2010**, *95*, 2350-2359.
89. Corrêa, M. C. S., et al.; Surface composition and morphology of poly(3-hydroxybutyrate) exposed to biodegradation. *Polymer Testing* **2008**, *27*, 447-452.
90. Federle, T. W., et al.; Anaerobic Biodegradation of Aliphatic Polyesters: Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyoctanoate) and Poly(ϵ -caprolactone). *Biomacromolecules* **2002**, *3*, 813-822.
91. Kale, G., et al.; Degradation of Commercial Biodegradable Packages under Real Composting and Ambient Exposure Conditions. *J Polym Environ* **2006**, *14*, 317-334.
92. Pang, M. M., et al.; Degradation studies during water absorption, aerobic biodegradation, and soil burial of biobased thermoplastic starch from agricultural waste/polypropylene blends. *J. Appl. Polym. Sci.* **2013**, *129*, 3656-3664.
93. Kijchavengkul, T., et al.; Atmospheric and soil degradation of aliphatic–aromatic polyester films. *Polym. Degrad. Stabil.* **2010**, *95*, 99-107.
94. Darby, R. T.; Kaplan, A. M.; Fungal susceptibility of polyurethanes. *Applied Microbiology* **1968**, *16*, 900-&.
95. Filip, Z.; Decomposition of polyurethane in a garbage landfill leakage water and by soil microorganisms. *European J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **1978**, *5*, 225-231.
96. Griffin, G. J. L.; Synthetic polymers and the living environment. *Pure and Applied Chemistry* **1980**, *52*, 399-407.
97. Huang, S. J.; Roby, M. S.; Biodegradable polymers poly(amide-urethanes). *Journal of Bioactive and Compatible Polymers* **1986**, *1*, 61-71.
98. Russell, J. R., et al.; Biodegradation of Polyester Polyurethane by Endophytic Fungi. *Appl. Environ. Microbiol.* **2011**, *77*, 6076-6084.

99. Lando, G. A. Estudo da Biodegradação por Fungos Filamentosos de Poliuretano Modificado Superficialmente por Irradiação UV-Assistida. Trabalho de Conclusão de Curso, DFQ-IQ, UFRGS, Porto Alegre, **2013**.
100. Hutchings, I. M.; *Tribology: friction and wear of engineering materials*. CRC Press: **1992**.
101. Canevarolo, S. V. J.; *Ciência dos Polímeros: um texto básico para tecnólogos e engenheiros*. 2 ed.; Editora Artliber: São Paulo, **2002**.
102. Meyrath, J.; Suchanek, G. In *Methods in Microbiology*, Academic Press: 1972; 159-209.
103. Bartholomew, J. W.; Mittwer, T.; THE GRAM STAIN. *Bacteriological Reviews* **1952**, *16*, 1-29.
104. Silverstein, R. M., et al.; *Spectrometric identification of organic compounds*. 7 ed.; John Wiley & Sons: New York, **2005**.
105. Rivaton, A.; Gardette, J. L.; Photodegradation of polyethersulfone and polysulfone. *Polym. Degrad. Stabil.* **1999**, *66*, 385-403.
106. Ates, S., et al.; Synthesis, characterization and thermally activated curing of polysulfones with benzoxazine end groups. *Polymer* **2011**, *52*, 1504-1509.
107. Bardet, L., et al.; Étude de la transition conformationnelle de l'acide polyacrylique syndiotactique en solution aqueuse par spectroscopie de vibration. *Journal of Molecular Structure* **1975**, *24*, 153-164.
108. Leyte, J. C., et al.; An i.r. investigation of polyion-counterion interactions. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular Spectroscopy* **1967**, *23*, 1397-1407.
109. Stuart, B. H.; *Infrared Spectroscopy: Fundamentals and Applications*. Wiley: New York, **2004**.
110. Rivaton, A.; Gardette, J.-L.; Photo-oxidation of aromatic polymers. *Die Angewandte Makromolekulare Chemie* **1998**, *261-262*, 173-188.
111. Choi, Y.-J., et al.; Preparation and characterization of acrylic acid-treated bacterial cellulose cation-exchange membrane. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology* **2004**, *79*, 79-84.
112. Naim, R., et al., Effects of sulfonation process on thermal behavior and microstructure of sulfonated polysulfone membranes as a material for Proton Exchange Membrane (PEM). In *Proceedings of Regional Symposium on Membrane Science and Technology 2004*, Malaysia, 2004;
113. Gaur, M. S., et al.; Structural and thermal properties of polysulfone-ZnO nanocomposites. *J Therm Anal Calorim* **2013**, *111*, 743-751.
114. Lufrano, F., et al.; Sulfonated polysulfone as promising membranes for polymer electrolyte fuel cells. *J. Appl. Polym. Sci.* **2000**, *77*, 1250-1256.
115. Callister, W. D.; Rethwisch, D. G.; *Ciência Engenharia de Materiais - Uma Introdução*. 8 ed.; LTC: Rio de Janeiro, **2012**.
116. Sinirlioglu, D., et al.; Novel membranes based on poly(5-(methacrylamido)tetrazole) and sulfonated polysulfone for proton exchange membrane fuel cells. *J. Appl. Polym. Sci.* **2014**, *131*, n/a-n/a.
117. Nayak, L., et al.; Influence of carbon nanofibers reinforcement on thermal and electrical behavior of polysulfone nanocomposites. *Polymer Engineering & Science* **2012**, *52*, 2424-2434.
118. Momeni, S. M.; Pakizeh, M.; Preparation, characterization and gas permeation study of PSf/MgO nanocomposite membrane. *Brazilian Journal of Chemical Engineering* **2013**, *30*, 589-597.

119. Kruczek, B.; Matsuura, T.; Development and characterization of homogeneous membranes de from high molecular weight sulfonated polyphenylene oxide. *Journal of Membrane Science* **1998**, *146*, 263-275.
120. Filip, D.; Macocinschi, D.; Thermogravimetric analysis of polyurethane–polysulfone blends. *Polymer International* **2002**, *51*, 699-706.
121. Persson, J. C., et al.; Polysulfones tethered with benzimidazole. *Polymer* **2006**, *47*, 991-998.
122. Martos, A. M., et al.; Electrochemical and structural characterization of sulfonated polysulfone. *Polymer Testing* **2015**, *45*, 185-193.
123. Grover, N., et al.; Characterization of acrylic acid grafted poly(ethylene terephthalate) fabric. *J. Appl. Polym. Sci.* **2010**, *117*, 3498-3505.
124. Ravat, B., et al.; Electron irradiation of polyesterurethane: study of chemical and structural modifications using FTIR, UV spectroscopy and GPC. *Radiation Measurements* **2001**, *34*, 31-36.
125. Murakami, K.; Kudo, H.; Gamma-rays irradiation effects on polysulfone at high temperature. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms* **2007**, *265*, 125-129.
126. Shah, A. A., et al.; Biological degradation of plastics: A comprehensive review. *Biotechnology Advances* **2008**, *26*, 246-265.
127. Zahra, S., et al.; Biodegradation of low-density polyethylene (LDPE) by isolated fungi in solid waste medium. *Waste Management* **2010**, *30*, 396-401.
128. Luo, Y.-L., et al.; Degradation Behavior and Biocompatibility of PEG/PANI-Derived Polyurethane Co-polymers. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition* **2010**, *21*, 1143-1172.
129. Frautschi, J. R., et al.; Degradation of polyurethanes in vitro and in vitro: comparison of different models. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **1993**, *1*, 305-313.
130. Kessler, F., et al.; Wettability and cell spreading enhancement in poly(sulfone) and polyurethane surfaces by UV-assisted treatment for tissue engineering purposes. *Tissue Eng Regen Med* **2014**, *11*, 23-31.
131. Weng, Y.-X., et al.; Biodegradation behavior of PHBV films in a pilot-scale composting condition. *Polymer Testing* **2010**, *29*, 579-587.
132. Young, K. D.; Bacterial morphology: Why have different shapes? *Current opinion in microbiology* **2007**, *10*, 596-600.
133. Young, K. D.; The Selective Value of Bacterial Shape. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **2006**, *70*, 660-703.
134. Reddy, C. A., et al., Methods for General and Molecular Microbiology (3rd Edition). In American Society for Microbiology (ASM):