

LIBERAÇÃO LENTA DE NITROGÊNIO E FÓSFORO A PARTIR DE COMPOSTO POLIMÉRICO DE ALGINATO DE CÁLCIO E AMIDO MODIFICADO PARA FINS DE BIOESTÍMULO.

REIS, E.A.¹; BISPO, E. P.²; ROCHA-LEÃO, M.H.M.³; LEITE, S.G.F.⁴

¹Universidade Federal do Rio de Janeiro/ Escola de Química/ Departamento de Bioquímica.

²Universidade Federal do Rio de Janeiro/ Departamento de Engenharia Ambiental.

³Universidade Federal do Rio de Janeiro/ Escola de Química/ Departamento de Engenharia Bioquímica.

⁴ Universidade Federal do Rio de Janeiro/ Escola de Química/ Departamento de Engenharia Bioquímica

E-mail para contato: evertonamazonas@yahoo.com.br

RESUMO - A preocupação com a qualidade ambiental vem aumentando na sociedade, pois o desenvolvimento industrial e tecnológico tem levado a grandes taxas de contaminação no ambiente, devido a liberação de carbono. Uma das técnicas mais utilizadas para a biorremediação é o bioestímulo, podendo ser auxiliado através da técnica de microencapsulamento. Este trabalho tem por objetivo formular um composto de liberação lenta de nitrogênio e fósforo utilizando os polímeros alginato e Capsul ® a fim de promover o bioestímulo da população hidrocarbonoclástica no meio ambiente visando a biorremediação de poluentes. Foram feitas cápsulas de liberação lenta com 2 mm de espessura contendo N e P. Os experimentos conduzidos com o material encapsulado quanto a produção de biomassa e consumo de glicose como fonte orgânica de carbono, foram melhores quando comparados a sistemas contendo os mesmos nutrientes livres, demonstrando que as cápsulas apresentam potencial para aplicação em processos de biorremediação.

1. INTRODUÇÃO

A preocupação com a qualidade ambiental vem se tornando cada vez mais presente na sociedade. O aumento do desenvolvimento industrial e tecnológico têm levado a grandes taxas de contaminação dos solos, rios, lagos, oceanos, lençóis subterrâneos e sedimentos (Roling & Van Verseveld, 2002). Como consequência da grande quantidade de contaminantes originados principalmente das indústrias petrolíferas, uma intensa oferta de carbono (provenientes de hidrocarbonetos do petróleo) tem sido liberada no ambiente.

Um dos processos mais relatados na literatura para o tratamento de áreas poluídas com grandes quantidades de carbono disponíveis é o processo conhecido como biorremediação, de acordo com a Agência de Proteção Ambiental Americana (USEPA). Biorremediação é o processo de tratamento que utiliza a ocorrência natural de microrganismos para degradar substâncias toxicamente perigosas transformando-as em substâncias menos ou não tóxicas.

As tecnologias de biorremediação podem ser classificadas como *ex situ* ou *in situ*. As tecnologias *ex situ* constituem os tratamentos que removem o contaminante para um local fora

de onde ocorre a contaminação, já as tecnologias *in situ*, envolvem o tratamento dos contaminantes no próprio local. As técnicas de biorremediação *in situ* mostram-se vantajosas, pelo fato de poderem ser realizadas eliminando custos de transporte e a intervenção pode ser diminuída (IWAMOTO & NASU, 2001).

Existem diferentes técnicas que podem ser utilizadas no processo de bioremediação *in situ*, dentre as quais estão: atenuação natural, bioaumento e bioestímulo. A atenuação natural pode ser definida como a redução da toxicidade, mobilidade ou volume do contaminante sem a intervenção humana e pode se dar por processos físicos, químicos e biológicos. O bioaumento, por sua vez, envolve a estimulação de populações nativas que são reintroduzidas no sítio de contaminação, ou ainda a adição de cepas selvagens ou de culturas mistas não nativas do local contaminado, mas que são capazes de degradar o poluente. Por fim, o bioestímulo é descrito como uma técnica que visa estimular a microbiota nativa de um determinado ambiente em virtude do fornecimento adequado de nutrientes e de condições ambientais favoráveis. Porém, a idéia fundamental é condicionar o desenvolvimento de microrganismos indígenas em um local impactado para que haja redução do contaminante, devido ao seu uso como fonte de carbono no metabolismo microbiano, provocando a diminuição dos poluentes ao longo do tempo (IWAMOTO & NASU, 2001; ROBB & MOYER, 2001; EPA, 2004; SCOW & HICKS, 2005). Hoje existem muitos estudos que utilizam o bioestímulo, pois agride menos o ambiente (CUNHA et al, 2006; SCOW & HICKS, 2005), porém o estímulo nem sempre é imediato, podendo requerer algum tempo para que seja evidente, e a quantidade e o tipo de nutrientes adicionados vão depender das relações de carbono, nitrogênio e fósforo (C:N:P) presentes no ambiente. Esta relação deve ser mantida sempre em equilíbrio para permitir o crescimento adequado de microrganismos (ALEXANDER, 1999).

Hoje com o objetivo de fornecer tais nutrientes de maneira a impactar menos o sistema e obter uma boa relação C:N:P, muitos trabalhos científicos estão utilizando a técnica de microencapsulação de materiais ativos para formulação de fertilizantes de liberação lenta, a fim de que seu conteúdo de forma gradual seja liberado e coincida com a exigência nutricional do organismo envolvido. (SUAVE et al., 2006; TRINDADE, PINHO & ROCHAS, 2008; BANSODE et al., 2010).

A microencapsulação é uma tecnologia de empacotamento de materiais sólidos, líquidos e gases, em pequenas, cápsulas seladas, isolando e protegendo-os de condições ambientais adversas, tais como a luz, oxigênio, umidade e interações com outros compostos. As cápsulas podem liberar seu conteúdo em taxas controladas sob condições específicas. Esses pacotes em miniaturas, chamadas esferas, tendo um tamanho de poucos milímetros, no entanto, são fortemente influenciadas, pela estrutura do material originado (THIES, 2003; BASTOS et al., 2009).

Dentre os diversos polímeros utilizados para a produção de grânulos destacamos o copolímero de alginato. É um componente de grande interesse para revestimento devido às suas propriedades coloidais únicas, como a possibilidade de ser um agente espessante, gelificante, estabilizante de emulsão, além de ser capaz de formar suspensões e filmes. É um hidrato de carbono coloidal hidrófilo extraído com álcali diluído a partir de várias espécies de algas castanhas (Phaeophyceae). A propriedade mais útil dos alginatos é sua habilidade em

reagir com cátions polivalentes, especialmente íons de cálcio, para produzir géis fortes ou polímeros insolúveis. (ARBURTO et al, 1998; BASTOS et al, 2009) .

Capsul ® é um amido modificado quimicamente desenvolvido por National Starch & Chemical Corporation dos Estados Unidos. Esta modificação consiste na adição de um componente lipofílico (succinato de octanil) nas formulações, aumentando assim a estabilidade da emulsão e mantendo a biodegradabilidade do amido (BASTOS et al, 2009).

Diante do que foi apresentado, este estudo tem por objetivo formular um fertilizante de liberação lenta de nitrogênio e fósforo utilizando os polímeros alginato e Capsul ® como fonte de bioestímulo para microrganismos hidrocarbonoclásticos no meio ambiente.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Preparação das Cápsulas de Liberação Lenta

Inicialmente foram pesados fosfato de monopotássio, fosfato dipotássio e nitrato de amônio (todos na concentração de 1g/L e provenientes da indústria Proquímios) dissolvida em água destilada e misturado em uma solução de 3% (peso/volume) de alginato de sódio (proveniente da indústria proquímios) e 4% (peso/volume) de capsul® (National starch and chemical corporation USA). A solução final foi transferida para um funil de separação e gotejada em uma solução de 0,3 M de cloreto de cálcio (da empresa Vetec), técnica conhecida como colapso da gota, formado cápsulas esféricas que ao final da produção foram secas em forno a 60°C durante 1 hora.

2.2. Quantificação da quantidade de água absorvida pelas Cápsulas (Wa)

Para a quantificação da água absorvida pelo material preparado, 1 g de amostra *M0* (peso seco) das cápsulas formadas e secas foi imersa em um becker de vidro com 50 ml de água destilada por um período de 90 min em temperatura ambiente. As amostras embebidas *M* foram retiradas filtradas com auxílio de uma peneira granulométrica com objetivo de retirar o excesso de água não absorvida. A capacidade de absorção (*Wa*) por grama de peso seco foi determinada pela equação (1) abaixo de acordo com Wu & Liu, (2008).

$$Wa = \frac{M-M0}{M} \quad (1)$$

2.3 Determinações analíticas:

Foram analisados nitrogênio total utilizando-se o equipamento TOC VCP Total Organic Carbon, modelo Shimadzu TNM-1; proteínas pelo método de Lowry; fósforo total e glicose pelo emprego de kits colorimétricos (Doles®).

2.4 Experimento para avaliação do bioestímulo:

Com o objetivo de compreender a bioestimulação dos microrganismos com os nutrientes em meio com 2 % (p/V) de glicose, foi construído um sistema com meio líquido baseado no meio mineral Bushneel Hass (Reis et al, 2013), onde as fontes de nitrogênio e fósforo foram substituídas pelos encapsulados. O experimento foi realizado com 96h e comparado com o próprio meio Bushnell Hass (proveniente da empresa Sigma) com os nutrientes livres, muito utilizado na literatura como meio para cultivo de microrganismo degradadores de hidrocarbonetos de petróleo. A cepa de *Pseudomonas sp.* usada no experimento foi obtida de um ambiente marinho com histórico de contaminação por hidrocarboneto, adquirido pelo laboratório de Microbiologia industrial da UFRJ. A cepa após crescida em caldo nutriente, foi mantida em refrigerador e transferida para um novo caldo a cada mês. Para cada experimento, foi feito um pré-inóculo a partir do estoque, em um novo caldo nutriente estéril que foi cultivado a 30°C por 24h. O inóculo inicial empregado foi de 5ml para cada 100ml de volume dos meios experimentais do sistema de bioestímulo.

3. RESULTADOS

3.1 Produção dos Encapsulados de Liberação Lenta de Nutrientes.

A composição de 3% (p/v) de alginato de sódio e 4%(p/v) de capsul®, quando diluídos em água destilada e misturados com os nutrientes, formaram uma solução que ao ser gotejada em cloreto de cálcio, deram origem a pequenas esferas de coloração esbranquiçada que quando submetidas a secagem alcançaram um diâmetro médio de 0,2 mm. (Figura 1)

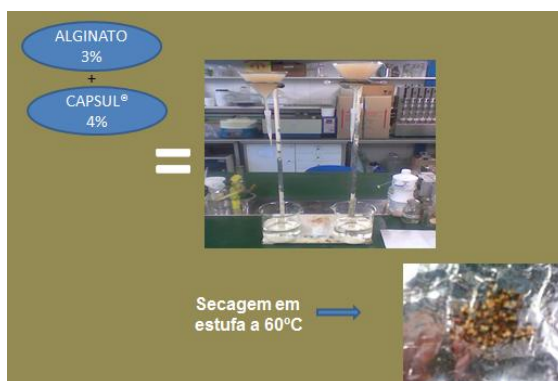


Figura 1: Obtenção do encapsulado de Alginato de sódio/Capsul® e nutrientes (N e P) após secagem em estufa a 60 °C.

3.2 Avaliação do Comportamento do Encapsulado em Meio de Cultivo Líquido:

A figura 2 mostra a concentração de nitrogênio e fósforo em sistema livre e em sistema imobilizado no meio de cultivo na presença do microrganismo *Pseudomonas sp.*

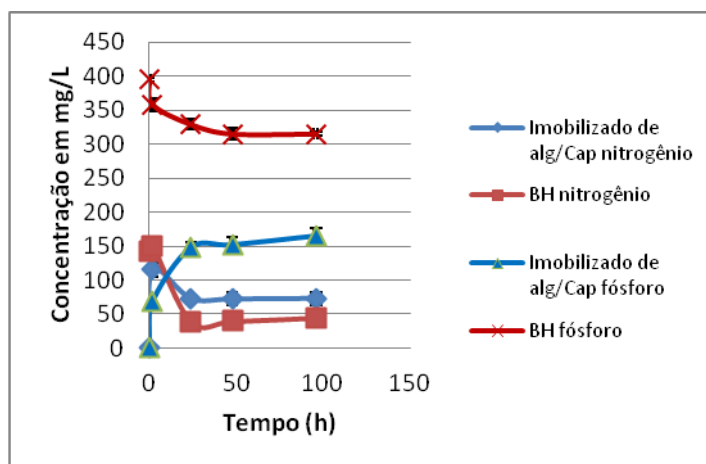


Figura 2: Liberação de nitrogênio e fósforo em sistemas com nutrientes livres e encapsulados em meio bushnell hass na presença de *Pseudomonas sp.*

O experimento com sistema encapsulado mostrou que no intervalo de 0 a 24h há uma concentração de 120 mg/L de nitrogênio total e 150 mg/L de fósforo disponível no meio. A concentração de nitrogênio diminuiu para 70 mg/L, enquanto a concentração de fósforo manteve-se estável até 48h de experimento. Ao final de 96h a concentração de nitrogênio manteve-se estável já a concentração de fósforo apresentou um ligeiro aumento atingindo 170 mg/L.

No meio mineral Bushell Hass, em que os nutrientes estão livres a concentração de nitrogênio, atingiu 40 mg/L enquanto que a concentração de fósforo apresentou 320 mg/L de fósforo no intervalo de 0 a 24h. A concentração de nitrogênio manteve-se estável, enquanto que a de fósforo apresentou uma ligeira diminuição até 48h. Ao fim de 96h o valor da concentração de nitrogênio não apresentou alteração assim como a concentração de fósforo que permaneceu estável apresentando um valor de 300 mg/L.

A Tabela 1 mostra o consumo de glicose e o crescimento microbiano, expresso em proteínas, ao longo dos experimentos.

Tabela 1: Consumo de glicose e crescimento de proteína no intervalo de 96h de experimento.

Tempo		0 horas	24 horas	48 horas	96 horas
Encapsulado Alg/Capsul	Glicose (g/L)	19,89 ± 0,2	18,54 ± 0,5	17,2 ± 0,2	16,05 ± 0,2
Encapsulado Alg/Capsul	Proteínas (mg/L)	89 ± 0,02	143 ± 1,0	141 ± 0,5	178 ± 0,1
Bushnell Hass	Glicose (g/L)	20 ± 0	18,22 ± 0,2	17,74 ± 0,3	17,41 ± 0,1
Bushnell Hass	Proteínas (mg/L)	78 ± 0,8	91 ± 0,1	134 ± 0,2	155 ± 0,5

Pode-se observar que no sistema contendo os nutrientes imobilizados ocorre um pequeno consumo de glicose no intervalo de 0 a 24h atingindo o valor de 18,5 g/L, neste mesmo intervalo o valor da concentração de proteína apresenta 143 mg/L. Após este período no intervalo de 48h a concentração de glicose apresentou mais um pequeno declínio,

chegando a 17,2g/L, no entanto o valor proteico sofre pouca alteração mantendo-se praticamente constante. Já em 96h de experimento ocorre ainda uma ligeira queda na concentração de glicose chegando a 16g/L, levando também a ligeiro acréscimo de proteína, com valor de 178,0 mg/L.

No sistema com meio Bushnell Hass, onde os nutrientes estão livres no meio, o consumo de glicose exibiu uma queda inicial atingindo valor de 18g/L e um crescimento de 90 mg/L de proteína em 24h. Verificou-se também, um consumo de glicose muito pequeno, obtendo-se valor de 17,5g/L e um aumento no crescimento cuja concentração proteica chega a 140mg/L com 48 horas. Ao final de 96h de experimento a concentração de glicose manteve-se quase que estável, porém a concentração de proteína apresentou um ligeiro aumento, obtendo-se 155mg/L.

4. Discussão.

Ao se observar a figura 2, percebe-se que o sistema formado pelo encapsulado apresentou um abastecimento de fósforo e nitrogênio livres no meio, porém o sistema formado pelo encapsulado permitiu uma concentração final de 170 mg/L de fósforo e 70 mg/L de nitrogênio, enquanto que o sistema formado por nutrientes livres deixou disponível 300 mg/L de fósforo e 40 mg/L de nitrogênio. Apesar dos valores de nitrogênio finais estarem baixos nos dois sistemas, os valores da concentração de fósforo com os nutrientes livres é o dobro quando comparado ao sistema encapsulado o que pode permitir uma intensificação do processo de eutrofização. É importante chamar a atenção que nos dois sistemas, as concentrações de nitrogênio e fósforo estão fora dos limites estabelecidos pelo Conselho Ambiental de Meio Ambiente (CONAMA 357, 2005).

Na tabela 1, pode-se observar que apesar das concentrações de glicose estarem bem próximas em relação aos valores, é possível observar ao longo do tempo que o consumo de glicose apresentado pelo sistema formado pelo nutriente encapsulado, apresentou um declínio contínuo ao longo do tempo, diferentemente do sistema formado por nutrientes livres, que apresentou uma ligeira queda nas primeiras 24h de experimento e permaneceu quase estável nos intervalos seguintes que vai de 48 a 96h. Ao observar o crescimento dos microrganismos, verificou-se um valor mais elevado no sistema formado pelos nutrientes encapsulados nas primeiras 24h, quando comparado ao crescimento do sistema formado pelos nutrientes livres. Este resultado pode ser corroborado ao observarmos a figura 2, pois neste período a quantidade de fósforo presente no sistema livre era o dobro da quantidade de fósforo no sistema encapsulado, interferindo diretamente na relação C:N:P.

Ao final de 48h nos dois sistemas pode-se evidenciar o crescimento. No entanto o sistema contendo o material encapsulado superou o sistema com nutriente livre, apresentando uma intensificação no crescimento atingindo valor maior que o meio contendo nutrientes livres. Isto é reforçado quando observamos a tabela 1, onde pode-se detectar que a partir de 48h ainda se verifica uma tendência de queda no consumo de glicose e de aumento do crescimento microbiano. No trabalho de Reis et al, (2013), também verificou-se que o crescimento de microrganismos foi mais eficiente em sistema com sais encapsulados do que em sistemas com sais livres.

5. Conclusão.

As esferas compostas por 3% (p/v) de alginato de sódio e 4% (p/v) de capsul®, formaram cápsulas de liberação lenta de nutrientes, que ao serem usadas em um sistema líquido absorvem água e ampliam seu tamanho chegando a 4mm de espessura e desta maneira foram capazes de estimular o crescimento dos microrganismos hidrocarbonocláticos. De acordo com os gráficos apresentados e discutidos, é compreensível supor que quando os microrganismos são alimentados com nutrientes essenciais para seu crescimento de forma contínua e lenta, é possível chegar a valores maiores de crescimento, quando comparado ao crescimento conduzido com os nutrientes disponibilizados todos ao mesmo tempo inicialmente. Este estudo indica que o controle dos nutrientes no meio de cultura, além de otimizar a relação custo/benefício ajuda a otimizar o tratamento das áreas estudadas podendo ainda não apresentar risco de eutrofização do ambiente, uma vez que com o melhor aproveitamento dos nutrientes, menores concentrações dos mesmos ficam livres no sistema. Neste ponto o trabalho em questão ainda deverá ser aprimorado de modo a permitir que os valores residuais destes nutrientes atendam o limite estipulado pela legislação.

6. Referências:

- ALEXANDER, M. In: *Biodegradation and bioremediation*. 239. San Diego, Academic Press, Califórnia, 1999.
- ARBURTO L. C.; TAVARES D. Q; MARTUCCI E.T. *Microencapsulação de óleo essencial de laranja*. Revista Ciência e Tecnologia de Alimentos. 18 (1): 45-48.1998.
- BANSODE, S. S., BANARJEE, S. K., GAIKWAD, D. D., JADHAV, S. L. & THORAT, R. M, *Microencapsulation: a review*. International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research, 1(2), 38-43, 2010.
- BASTOS D. S, GOMES K, ROCHA-LEAO M. H. M., *Ascorbic acid retaining using a new calcium alginate-Capsul based edible film*. J. Microencap. 26 97-103.2009.
- CONAMA- CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE. Nº 235, 2005. Acessado em 25 de março de 2014.
- CUNHA, C.D; ROSADO, A.S; SEBASTIAN, G.V; SELDIN, L; VON DER WEID, I. *Oil biodegradation by Bacillus strains isolated from the rock of an oil reservoir located in a deep-water production basin in Brazil*. Appl Microbiol biotechnol 73 (4) 949-959. 2006.
- EPA: ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY, UNITED STATES. How to Evaluate Alternative Cleanup Technologies for Underground Storage Tank Sites: A Guide for Corrective Action Plan Reviewers. Chapter XII - Enhanced Aerobic Bioremediation, EPA 510-B-94-003; EPA 510-B-95-007 and EPA 510-R-04-002, 2004d. 73p.

- IWAMOTO, T., NASU, M. *Current bioremediation practice and perspective*. Journal of bioscience and Bioengineering. 92(1), 1-8, 2001.
- LOWRY O. H, ROSEBROUGH N. J, FARR A. L; RANDALL R. J. *Protein measurement with the Folin phenol reagent*. J. Biolog. Chemist. 193 (1): 265-275.1951.
- REIS, E. A. ; ROCHA-LEÃO, M. H. M. ; LEITE, S. G. F. . *Slow-Release Nutrient Capsules for Microorganism Stimulation in Oil Remediation*. Applied Biochemistry and Biotechnology (Online), v. 169, p. 1241-1249, 2013.
- ROBB, J. & MOYER, E. *Natural attenuation of benzene and MTBE at four midwestern retail gasoline marketing outlets*. Contam. Soil Sed. Water, Spring, 67-71, 2001.
- ROLING, W.F.M.; VAN VERSEVELD, H.W. *Natural attenuation: What does the subsurface have in store?* Biodegradation. 13, 53-64, 2002.
- SCOW, K., HICKS, K. *Natural attenuation and enhanced bioremediation of organic contaminants in groundwater*. Current Opinion in Biotechnology. 16, 246-253, 2005.
- SUAVE, J.; DALL'AGNOL, E.C.; PEZZIN, A.P.T.; SILVA, D.A.K.; MEIER, M. M. & SOLDI, V. *Microencapsulação: Inovação em diferentes áreas*. J. Health and Environment, 7(2), 12-20, 2006.
- TRINDADE, C.S.F.; PINHO, S.C. & ROCHA, G.A. *Review: Microencapsulation of food ingredients*. Brazilian Journal of Food Technology, 11(2), 103-109, 2008.
- THIES, C. *Microcapsules*. In: Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition, 3892-3903. Edited by Caballero, B. , Trugo, L. , Finglas, P., London, England, 2003.
- UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. Setting standards for safe drinking water.2013(<http://www.epa.gov/safewater/standard/setting.cfm>, consulted 20 may, 2013).
- WU, L; LIU, M; RUI, L. *Preparation and properties of a double-coated slow-release NPK compound fertilizer with superabsorbent and water-retention*. Bioresour Technol 99(3) 547-554.2008.