

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

**“COMPREENDENDO O PAPEL DA MELAMINA (C<sub>3</sub>H<sub>6</sub>N<sub>6</sub>) NO  
CAMINHO DE DEGRADAÇÃO DE COMPÓSITOS  
FERTILIZANTES CONTENDO UREIA”**

**Joyce Fabiula Rodrigues\***

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de MESTRA EM QUÍMICA, área de concentração: FÍSICO-QUÍMICA.

**Orientador: Dr. Caue Ribeiro de Oliveira**

**\* bolsista Capes**

**SÃO CARLOS - SP**

**2021**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS**

Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia  
Programa de Pós-Graduação em Química

---

**Folha de Aprovação**

---

Defesa de Dissertação de Mestrado da candidata Joyce Fabiula Rodrigues, realizada em 23/11/2021.

**Comissão Julgadora:**

Prof. Dr. Cauê Ribeiro de Oliveira (EMBRAPA)

Profa. Dra. Christiane Abreu de Oliveira Paiva (EMBRAPA Milho e Sorgo)

Profa. Dra. Elaine Cristina Paris (EMBRAPA)

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

O Relatório de Defesa assinado pelos membros da Comissão Julgadora encontra-se arquivado junto ao Programa de Pós-Graduação em Química.

*A meus pais, Luiz e Elma, com amor.*

## **Agradecimentos**

Primeiramente à Deus pela vida e pelo cuidado que sinto a todo momento.

Ao Dr. Cauê Ribeiro, pela orientação e dedicação em me orientar e sempre me ajudar nessa trajetória.

À Dra. Amanda Giroto pela ajuda e apoio neste trabalho, além do auxílio em todos os momentos.

Aos funcionários da Embrapa Instrumentação (Joana, Adriana, Suzane, Alice, Silviane e Viviane), pela ajuda e excelente convívio nesses anos.

À todos os colegas e amigos de laboratório especialmente aos mais próximos (Stella, Roger, Jean, Jéssica A, Rodrigo K, Gelson, Juliana) pela amizade e apoio de sempre.

Aos meus amigos Daniela, Jean, Jefferson, Jheyunny e Eloiza pelos momentos de descontração e amizade. Vocês fizeram com que as dificuldades se tornassem pequenas.

Aos meus amigos que mesmo distantes se fizeram presentes e acreditaram em mim em especial a Fernanda, Isaura, Sheila, Rita, Geraldo, Ândrea, Mateus, Lucas e Ítalo.

Aos meus pais que não mediram esforços para que meus sonhos fossem realizados.

À minha irmã, pelo carinho e o apoio.

E de forma geral, à todos que de alguma forma contribuíram e participaram do meu processo de mestrado.

A Embrapa Instrumentação pela infraestrutura concedida e a CAPES pela bolsa concedida.

## Lista de Figuras

FIGURA 2.2: Subprodutos da degradação da melamina. Fonte: Adaptado de JUTZI et al. (1982).....	9
FIGURA 4.1: Extrusora usada para preparação dos compósitos (model Micro 18 Leistritz) .....	16
FIGURA 4.2: Compósito (a)TPS:Ur:Mel 2:1 e (b) TPS:Ur:Mel 1:2.....	17
FIGURA 4.3: Ensaio de solubilidade de ureia com varredura de pH .....	19
FIGURA 4.4: Esquema de etapas realizados no ensaio de quantificação de nitrogênio .....	23
FIGURA 5.1: DRX dos precursores (amido (a), melamina (b) e ureia (c)) e dos compósitos TPS:Ur:Mel 2:1 (d) e TPS:Ur:Mel 1:2 (e)) *fases melamina *fases ureia	25
FIGURA 5.2: FT-IR dos precursores (amido (a), melamina (b) e ureia (c) ) e dos compósitos TPS:Ur:Mel 2:1 (d) e TPS:Ur:Mel 1:2 (e). .....	26
FIGURA 5.3: Imagens de microscopia eletrônica de varredura dos precursores a) melamina e b) ureia, em duas magnificações. ....	27
FIGURA 5.4: Imagens de microscopia eletrônica de varredura dos compósitos estudados TPS:Ur:Mel 1:2, em quatro magnificações .....	28
FIGURA 5.5: Imagens de microscopia eletrônica de varredura dos compósitos estudados TPS:Ur:Mel 2:1, em quatro magnificações.....	29
FIGURA 5.6: Teor de ureia presente nos materiais em pH:3 .....	31
FIGURA 5.7: Teor de ureia presente nos materiais em pH:4 .....	31
FIGURA 5.8: Teor de ureia presente nos materiais em pH:5 .....	32
FIGURA 5.9: Teor de ureia presente nos materiais em pH:6 .....	32
FIGURA 5.10: Teor de ureia presente nos materiais em pH:7 .....	33
FIGURA 5.11: Teor de ureia presente nos materiais em pH:8 .....	34
FIGURA 5.12: Crescimento de isolado <i>Acidovorax Citrulli</i> em meio com ágar .....	36
FIGURA 5.13: Crescimento do fungo <i>Trichoderma Harzianum</i> em meio BDA .....	37
FIGURA 5.14: Crescimento dos micro-organismos em 3 dias de incubação a) TPS:Ur:Mel 2:1 com <i>Trichoderma harzianum</i> b) TPS:Ur:Mel 1:2 <i>Acidovorax Citrulli</i>	38
FIGURA 5.15: Crescimento com micro-organismos em 7 dias no tratamento com melamina a) <i>Trichoderma Harzianum</i> b) <i>Acidovorax Citrulli</i> .....	39

FIGURA 5.16: Teor de volatilização de gases de amônia para presença do fungo a) <i>Trichoderma Harzianum</i> , e da bactéria b) <i>Acidovorax Citrulli</i> .....	41
FIGURA 5.17: Teor de amônio presente no solo a) <i>Trichoderma Harzianum</i> b) <i>Acidovorax Citrulli</i> .....	43
FIGURA 5.18: Teor de nitrato presente no substrato com a) <i>Trichoderma Harzianum</i> b) <i>Acidovorax Citrulli</i> . ....	45

## Resumo

COMPREENDENDO O PAPEL DA MELAMINA ( $C_3H_6N_6$ ) NO CAMINHO DE DEGRADAÇÃO DE COMPÓSITOS FERTILIZANTES CONTENDO UREIA. Este trabalho propôs um estudo de novos compósitos fertilizantes que possuem melamina em sua composição, uma molécula de alto teor de nitrogênio (66% massa total) porém recalcitrante, observando fatores que possam influenciar na liberação efetiva de seu N como nutriente. Foram estudados compósitos com matriz de amido termoplástico (TPS) de ureia e melamina, para aplicação de fertilizantes. Os compósitos (TPS:Ur:Mel 1:2 e TPS:Ur:Mel 2:1) produzidos foram caracterizados por difratometria de raios X, absorção na região do infravermelho e microscopia eletrônica de varredura e testados com presença de micro-organismos para estudar o comportamento frente a presença da melamina. Todas as caracterizações indicaram a sinergia entre os precursores no processo de extrusão. Os testes de liberação de ureia mostraram resultados superiores para os compósitos comparativamente com a ureia pura. Além destes, testes com adição dos micro-organismos *Trichoderma Harzianum* e *Acidovorax Citrulli* levaram à um melhor entendimento no processo de biodegradação da melamina. Assim como esperado o uso dos micro-organismos acelerou as liberações, mas desempenhou um papel importante a termo de comparação com o uso em solos sem condições controladas. Os micro-organismos se adaptaram à presença da melamina e os resultados quantitativos de liberação de gases de amônia, amônio e nitrato indicaram que provavelmente o processo de degradação da melamina foi iniciado. Tais ensaios ressaltaram a eficiência do uso de micro-organismos para que o N presente na melamina seja acessível, e corroboraram a capacidade de liberação controlada dos compósitos poliméricos sintetizados com matriz de amido.

Palavras chaves: Nitrogênio, Melamina, Compósito nitrogenado, Degradação biológica.

## Abstract

UNDERSTANDING THE ROLE OF MELAMIN ( $C_3H_6N_6$ ) IN THE PATH OF DEGRADATION OF FERTILIZER COMPOUNDS CONTAINING UREA. This work proposed a study of new fertilizer composites that have melamine in their composition, a molecule with high nitrogen content (66% total mass) but recalcitrant, observing factors that may influence the effective release of its N as a nutrient. Composites with thermoplastic starch matrix (TPS) of urea and melamine were studied for fertilizer application. The composites (TPS:Ur:Mel 1:2 and TPS:Ur:Mel 2:1) produced were characterized by X-ray diffraction, infrared absorption and scanning electron microscopy. All characterizations indicated the synergy between the precursors in the extrusion process. Urea release tests showed superior results for composites compared to pure urea. In addition to these, tests with the addition of the microorganisms *Trichoderma Harzianum* and *Acidovorax Citrulli* led to a better understanding of the melamine biodegradation process. As expected, the use of microorganisms accelerated releases, but played an important role in terms of comparison with the use in soils without controlled conditions. The microorganisms adapted to the presence of melamine and the quantitative results of the release of ammonia, ammonium and nitrate gases indicated that the melamine degradation process was probably initiated. These tests highlighted the efficiency of using microorganisms so that the N present in melamine is accessible, and corroborated the controlled release capacity of polymeric composites synthesized with a starch matrix.

Key words: Nitrogen, Melamine, Nitrogen composite, Biological degradation.

## Sumário

1.	Introdução .....	1
2.	Referencial Teórico .....	3
2.1	Fertilizantes nitrogenados .....	3
2.2	Melamina.....	8
2.3	Degradação da melamina .....	10
3	Objetivos.....	14
4	Materiais e métodos.....	15
4.1	Materiais.....	15
4.2	Procedimentos .....	15
4.2.1	Preparação dos polímeros .....	15
4.3	Caracterizações .....	17
4.3.1	Difratometria de raios X (DRX.....	17
4.3.2	Espectroscopia de absorção na região do infravermelho (FT-IR).....	17
4.3.4	Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	18
4.4	Avaliação da ureia .....	18
4.4.1	Testes de solubilidade de ureia em meio aquoso com varredura de pH.....	18
4.5	Ensaio de biodegradação.....	19
4.5.1	Crescimento e inoculação dos micro-organismos .....	20
4.5.1.a	<i>Trichoderma harzianum</i> .....	20
4.5.2.b	<i>Acidovorax Citrulli</i> .....	20
4.6	Determinação de nitrogênio mineralizado em solo incubado com micro-organismos .....	21
4.7	Tratamento estatístico dos dados.....	23

5	Resultados e Discussões .....	24
5.1	Caracterizações .....	24
5.2	Avaliação da ureia frente à variação de pH .....	29
5.3	Ensaio de biodegradação .....	35
5.3.1	Crescimento dos micro-organismos .....	35
5.3.2	Quantificação de N mineralizado com presença de micro-organismos.....	39
6.	Conclusões .....	47
7.	Sugestões para trabalhos futuros .....	49
8.	Referências .....	50

## 1. Introdução

O crescimento populacional desenfreado tem sido motivo de preocupação mundial. Estima-se que o aumento da população é de 1,05% ao ano, ou seja 81 milhões de pessoas por ano. (*Worldometers*, 2021). Tal fato leva à preocupação de que a cada dia fica mais difícil produzir alimento suficiente. A produção alimentícia enfrenta desafios diversos, como por exemplo, condições meteorológicas extremas, redução de recursos hídricos, limitação e esgotamento do solo, entre outras.[1,2] Por isso, é necessário que se busque alternativas para aumentar a produção alimentícia sem gerar impactos posteriores.

Os fertilizantes e suas subclasses (biofertilizantes, fertilizantes inteligentes, fertilizantes de liberação lenta e prolongada) são fundamentais para que seja possível produzir mais alimentos. No entanto quando esses fertilizantes são aplicados eles sofrem volatilização e perdas que geram prejuízos.[3] Entre os nutrientes incluídos em fertilizantes, o nitrogênio (N) é de suma importância devido a sua atuação diretamente na clorofila e crescimento das plantas.[4] Uma vez utilizados, esses fertilizantes são mineralizados por ação de micro-organismos presentes no solo. Com advento na atividade biológica, a ação dos micro-organismos pode ser distinta, dependendo da fonte de nitrogênio presente no fertilizante. Em estudos recentes, foi demonstrado que fertilizantes nanocompósitos utilizando a melamina apresentam perfil de liberação lenta de N diminuindo as perdas por volatilização.[5] A melamina possui alto teor de N, porém é reconhecida por sua baixa mineralização. Devido a isso, é necessário entender a integração dos micro-organismos com a melamina, pois estes são responsáveis pela degradação desse composto.

Este estudo avaliou preliminarmente a ação de dois micro-organismos, o fungo *Trichoderma harzianum*, que já é conhecido por sua eficiência biológica e portanto deve estar presente na microbiota do solo, e a bactéria *Acidovorax citrulli* presente em doença de meloeiro e que já vem sendo estudada na degradação da melamina. Através de ensaios avaliando o N presente, buscou-se entender como esses micro-organismos deslocam as condições químicas de equilíbrio das formas de N disponíveis para as plantas.

Desta forma espera-se que uma melhor compreensão do papel da melamina torne possível o uso desse composto em fertilizantes com alto teor de N disponível.

## **2. Referencial Teórico**

### **2.1 Fertilizantes nitrogenados**

Os fertilizantes são compostos por nutrientes essenciais para melhoria do solo e da planta. Os nutrientes presentes são classificados em macronutrientes; nitrogênio (N), potássio (K), fósforo (P), cálcio (Ca), magnésio (Mg) e enxofre (S), e micronutrientes: boro, zinco, cobre, manganês, ferro, molibdênio, níquel e cloro.[6]

O nitrogênio é essencial, sendo necessário em grandes proporções e perdendo apenas para o consumo de oxigênio, carbono e hidrogênio. Quando associado na agricultura ele pode ser um fator limitante para a produção. Embora o nitrogênio seja um elemento comum e esteja presente em 78% da atmosfera, como  $N_2$ , ele não pode ser assimilado devido a presença de uma tripla ligação estável. Há diferentes formas de assimilação de nitrogênio, conhecido como ciclo do nitrogênio. Entre essas é importante citar a fixação biológica através de micro-organismos e a fixação de N atmosférico que ocorre pelas chuvas e relâmpagos.[7] Esses e outros processos da assimilação do N podem ser vistos na Figura 2.1.

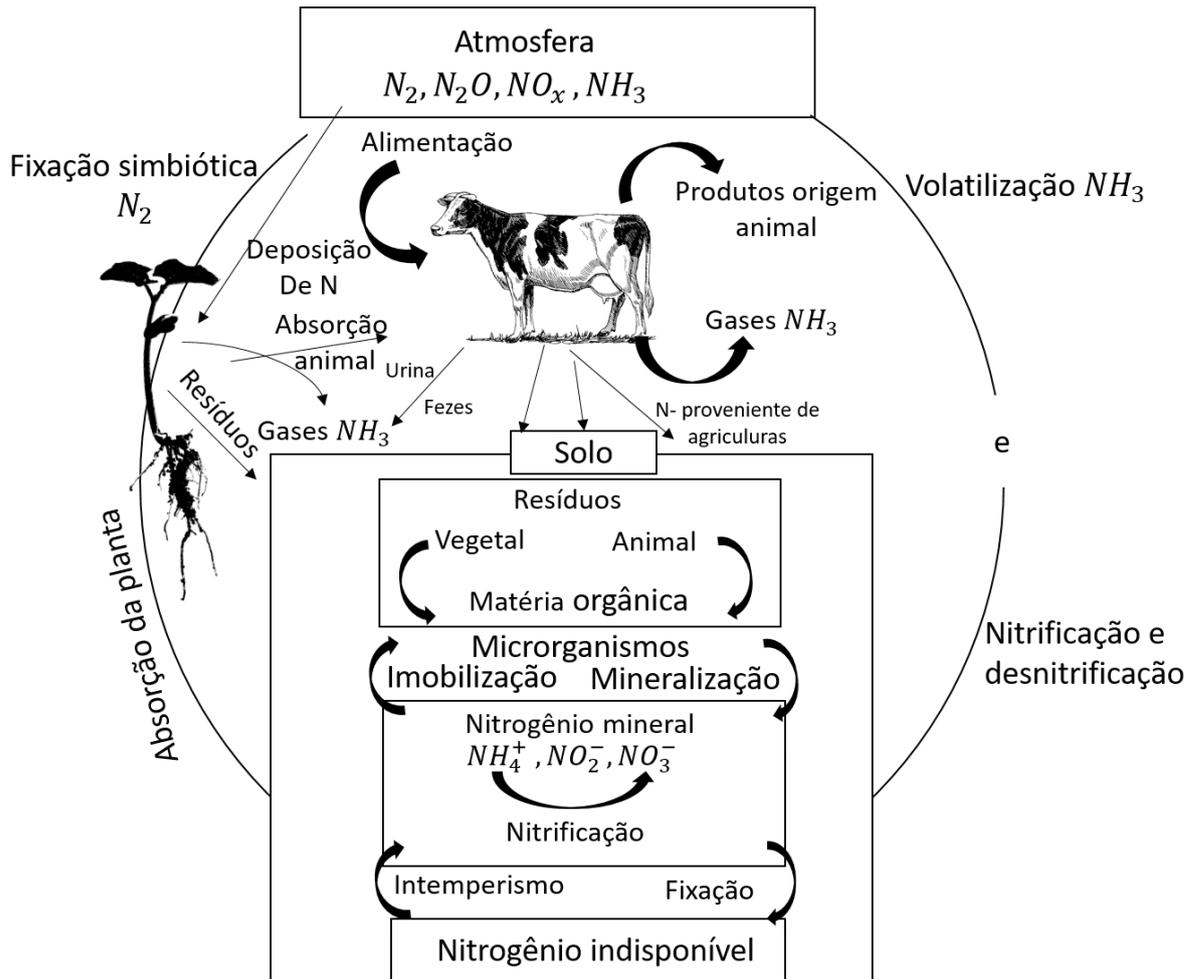
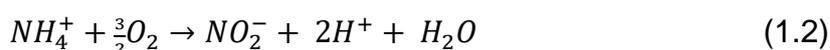
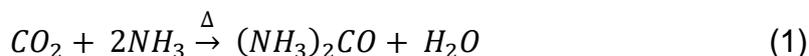


FIGURA 2. 1: Ciclo do nitrogênio. Adaptado por FOLLETT 2008[8]

Devido a processos lentos que ocorrem naturalmente, e também a perdas por lixiviações, é de suma importância a complementação desse nutriente através de aplicação de fertilizantes nitrogenados. Segundo dados da Secretaria de Assuntos Estratégicos da Presidência da República, a importação de fertilizantes em 2018 aumentou 4% em relação a 2017, sendo 35% relativo a fertilizantes nitrogenados, o que é equivalente a 8,77 milhões de toneladas.[9]

O uso mais comum de adubação incluindo o nitrogênio é a amônia e seus derivados, como a ureia ( $(NH_3)_2CO$ ), sais de amônio e seus nitratos. A ureia tem considerável teor de N e facilidade na aplicação, e devido a isto se tornou a fonte mais comum de nitrogênio atendendo uma enorme demanda mundial.[10] A ureia é obtida através de uma reação entre o gás carbônico ( $CO_2$ ) e a amônia ( $NH_3$ ), sob pressão e

temperatura controladas (Equação 1). Quando a ureia é adicionada no solo, ela é hidrolisada pela ação das enzimas urease (Equação 1.1). Em uma segunda etapa, após a hidrólise em  $NH_4^+$ , essa passa por um processo de nitrificação. (Equações 1.2 e 1.3):[11]



Analisando a absorção de N pela planta, calcula-se que é absorvido apenas 50 a 70%, o que pode gerar baixa produtividade e prejuízos econômicos. Uma das perdas que geram maiores impactos é pela volatilização de nitrogênio na forma de amônia ou óxidos nitrosos (principalmente  $N_2O$ ). Tais perdas podem variar de 40% até 80% no caso de situações drásticas, após a aplicação da ureia, o que reduz sua eficiência.[12] Além de afetar drasticamente a produção e a economia, perdas de N podem gerar danos ambientais. Tais impactos negativos, como a poluição da atmosfera e a contaminação dos sistemas aquáticos deve-se ao excesso desse nutriente no solo. Por isso, fica a constante busca por aprimoramento dos fertilizantes e controle da aplicação, buscando minimizar os malefícios e tentando atingir a capacidade máxima de produção sem danos ambientais. Muitas são as estratégias que podem ser aplicadas para redução de perdas. Ressalta-se entre estas o uso correto dos recursos hídricos, a incorporação adequada dos fertilizantes ao solo, o parcelamento da adubação, uso de aditivos de estimuladores biológicos e esterco, a adição de outros nutrientes como fertilizantes nitrogenados solúveis, sequências de culturas e uso de fertilizantes de liberação controlada e/ou prolongada. [13]

Como já mencionado anteriormente, as perdas geradas tanto pela lixiviação e volatilização destacam a importância em controlar a quantidade aplicada de nitrogênio visando maior produtividade, menor impacto ambiental e prejuízos econômicos. Logo, é importante a busca de fertilizantes de liberação prolongada que contribuam diretamente para o uso de forma eficiente desses suplementos essenciais. Shaviv e Mikkelsen (1993), classificaram os fertilizantes de liberação lenta em 4 tipos: (1) materiais inorgânicos de baixa solubilidade; (2) materiais de baixa solubilidade quimicamente ou biologicamente degradáveis; (3) materiais relativamente solúveis que decompõem no solo gradualmente; e (4) fertilizantes solúveis, mas controlados por barreira física.[14] Os fertilizantes de liberação lenta ou controlada, quando comparados com fertilizantes convencionais apresentam muitas vantagens. Uma vez que, o excesso de nutrientes resulta em desenvolvimento indesejado da planta, é desejável que estes fertilizantes sejam “inteligentes”, ou seja, sejam liberados conforme a planta demanda mantendo a sua disponibilidade em concentrações ideais.[15]

Pensando em avaliar os efeitos dos fertilizantes de liberação controlada, Zhao et al. (2013) realizaram um estudo quantitativo de volatilização de amônia, eficiência de uso e taxa fotossintética. Os tratamentos com uso dos fertilizantes de liberação controlada mostraram resultados significativos, como por exemplo, menor volatilização de amônia e maior taxa de fotossíntese. Os fertilizantes recobertos com resina ou com enxofre mostraram resultados superiores aos fertilizantes de uso comum. [16] Wu Wenzhu et al. (2021) produziram fertilizante de liberação controlada de N usando esterco de yak (herbívoro da região do Himalaia) através de carbonização hidrotérmica (HTC). Os resultados obtidos mostraram bom desempenho de liberação controlada de N. Tal desempenho deve-se ao fato do processo de produção melhorar a porosidade e aumentar o conteúdo de grupos funcionais contendo oxigênio ácido, especialmente os grupos hidroxila fenólicos. A pesquisa mostrou-se promissora, principalmente porque os fertilizantes produzidos de liberação controlada de N forneceram resultados superiores aos fertilizantes convencionais, além da busca por uma agricultura verde sustentável.

De modo geral, muitos têm sido os esforços de pesquisas visando reduzir os impactos ambientais e o melhor aproveitamento dos fertilizantes.

Madusanka et al. (2017) sintetizaram um material nanohíbrido com nanopartículas de hidroxiapatita modificada com ureia encapsulada em montmorilonita. O material sustentável mostrou liberação controlada de N mesmo com a variação de pH. Quando testado no plantio de arroz indicou ter um potencial para o melhor aproveitamento da colheita e uma economia no consumo de ureia. [17]

Os fertilizantes revestidos, ou seja com presença de barreira física, representam a maior porcentagem em todas as classes de fertilizantes.[14] Porém é necessário que busque revestimentos que não gerem resíduos remanescentes. Pensando nisso, Pereira et al. (2017) estudaram a polimerização entre ureia e paraformaldeído processados com montmorilonita. Os experimentos mostraram resultados positivos: os nanocompósitos tiveram baixa volatilização de amônia e melhor qualidade nutricional do latossolo amarelo, um solo pouco fértil. [18] Ni et al. (2009) avaliaram o uso de etilcelulose em associação com superabsorventes, como matriz biodegradável para ureia multifuncional de liberação lenta. Os estudos através de análises como Calorimetria Diferencial de Varredura avaliou que a temperatura de transição vítrea (Tg) diminuiu em tempo prolongado, indicando que um produto com boas propriedades de liberação lenta e retenção de água, sendo ecologicamente correto, são um boa alternativa para à aplicação na agricultura e horticultura.[19]

Giroto et al. (2020) também avaliaram uma matriz biodegradável para fonte de N. O amido quando adicionado com a ureia e a melamina, materiais plastificantes, e submetidos a um processo de extrusão com variação de temperatura e um máximo de 105°C, formando um material termoplástico (TPS). O material obtido mostrou características desejáveis, como mobilidade da cadeia, alto teor de N e uma matriz que é totalmente biodegradável.[20]

A alta eficiência de matriz biodegradáveis conseqüentemente leva ao uso combinado de micro-organismos e fertilizantes. A presença de micro-organismos, como *Aspergillus Niger*, controla o pH do solo quando exposto à aditivos. A acidificação da presença microbiológica controla a basicidade causada pela hidrólise do N, e conseqüentemente leva a um controle da liberação de N. [21] Tais matrizes podem atuar como barreiras físicas e simultaneamente como fontes de energia para esses micro-organismos.

Um micro-organismo que já é de eficiência conhecida é o fungo *Trichoderma Harzianum*. Estudos indicaram que mesmo à altas taxas de aplicação de N, a sobrevivência do fungo não foi afetada. Ao contrário, os fertilizantes estimularam o crescimento e a produção de conídios, podendo ter um efeito sinérgico com a capacidade de biocontrole. [22]

É de grande interesse agrônômico buscar fontes com alto teor de N, biofertilizantes, controle biológico e fertilizantes inteligentes.

## 2.2 Melamina

A melamina (1,3,5-Triazina-2,4,6-triamina) é um trímico da cianamida com média de 66% de N em sua composição que apresenta baixa solubilidade. Foi sintetizada pela primeira vez em 1834 pelo químico alemão Justus Von Liebig, trata-se de um pó branco cristalino com solubilidade mediana em água. É produzida em todo o mundo em grandes quantidades (cerca de 600.000 t por ano), devido ser matéria-prima básica para a produção de várias resinas de melamina (laminados, colas, adesivos, repelentes à água, retardantes de fogo, etc.).[12]

Aplicada em diferentes áreas, a melamina tem atraído atenção também para aplicação na construção de redes supramoleculares. A presença de três átomos de N no anel e três aminas, permite que seja o doador e aceitador de hidrogênio para formar uma extensa rede de ligações de hidrogênio. Porém sua alta rigidez, deixa disponível apenas um átomo de N do N-heterocíclico. A forte capacidade de coordenação da melamina também torna as estruturas altamente estáveis termicamente. [23]

A melamina ficou conhecida do público em geral em 2008 por ser encontrada como adulterante em produtos lácteos. A melamina e seus subprodutos alteram o teor aparente de proteína presente em leites e derivados pela sua menor relação C/N. Supõe-se que a melamina e seus metabólitos são absorvidos no trato gastrointestinal e precipitam no rim formando cristais. Isso associou a melamina com doenças graves e a morte em bebês na China. [24] Diante tais relatos, a Nature Medicine® publicou em seu artigo “News in brief” a decisão de especialistas em uma

reunião da Organização Mundial da Saúde (OMS), foi estipulado uma ingestão tolerável diária de 0,2 mg/Kg de peso corporal.[25]

Em seu processo de degradação, a melamina, composto da classe dos triazinícos passa por um processo de desaminação. Em uma rota hidrolítica, o composto libera amônia ( $\text{NH}_3$ ) e forma subprodutos como mostrado na Figura 2.2.

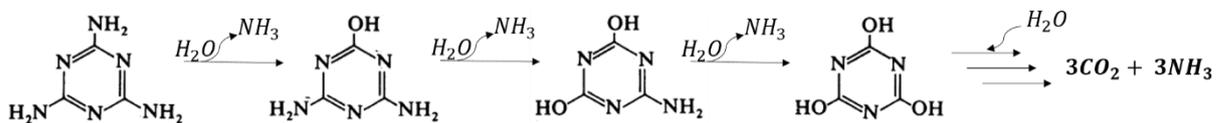


FIGURA 2.2: Degradação da melamina e seus subprodutos. Fonte: Adaptado de JUTZI et al. (1982)

Por apresentar propriedades desejáveis como alto teor de N, baixa solubilidade e baixo potencial de lixiviação, a melamina vem sendo investigada como matéria prima para uso em fertilizantes. Tennessee Valley Authority (TVA) nos EUA, testou o uso da melamina como fertilizante de liberação lenta. Os resultados não foram conclusivos, mas abriu os horizontes quanto ao uso desse composto para fins agrônômicos. [12] Scholl et al., (1937) testaram a melamina em casa de vegetação, usando capim Bermuda. Quando usada isoladamente, a melamina não apresentou a maior taxa de absorção de N pelo capim comparada com outros tratamentos. Mas apresentou vantagens como aumento da taxa de transpiração e um maior desenvolvimento radicular. [26]

No início dos anos 80, a antiga Melamine Chemicals Inc. (Louisiana, EUA) tentou desenvolver um fertilizante ureia-melamina (Super 60)[27] e realizou diferentes testes de liberação retardada de nitrogênio (sistema de fertilização: "liberação do tempo"). Embora não houve uma conclusão sobre os resultados e o produto nunca tenha sido comercializado, testes isolados mostraram bons resultados. Quando essa patente Super 60 foi testada no cultivo de arroz, houve um aumento substancial na extensão do perfilhamento, ou surgimento de brotos a partir da base das cabeças originais.[27] No cultivo de milho, o uso isolado da melamina aumentou ligeiramente as folhas e o peso médio das espigas também aumentaram um pouco.

Quando utilizada a patente do aglomerado ureia-melamina no cultivo de trigo, houve um aumento de espigas de trigo a partir do nitrogênio melamínico, o que mostrou que a inserção de melamina foi eficaz no aumento das unidades produtivas no trigo.[12]

Hauck e Stephenson (1964) investigaram a nitrificação de N proveniente de compostos triazínicos, comparando ensaios de incubação e de perfusão. Mesmo que a melamina não tenha mostrado os resultados esperados, o ácido cianúrico, um dos seus subprodutos mostrou taxas consideráveis de presença de nitrato. Eles concluíram que, tais materiais quando usados como fontes de nitrogênio, devem ser aplicados em colheitas que se espera quantidades menores de N adicionado em intervalos frequentes durante o processo.[28]

Giroto et al. (2019) ao avaliarem a síntese de um compósito composto de amido, ureia e melamina, perceberam um comportamento de liberação controlada de N e bons resultados em testes de casa de vegetação. A presença da melamina, aumentou o teor de N e teve papel importante quanto a estrutura do compósito formado. Houve uma interação entre a melamina e a ureia através de ligações de hidrogênio com grupos amina e também com o amido, o que levou a uma compósito homogêneo e que retardou a hidrólise da ureia. [5]

## 2.3 Degradação da melamina

A melamina, como já mencionado anteriormente, é um composto com alta estabilidade ou recalcitrante. Essa estabilidade deve-se à estrutura ressonante simétrica da molécula, o que acaba deixando o N presente não disponível.[28] Por isso a busca por rotas alternativas para a degradação desse composto nitrogenado vem sendo estudadas. No processo de degradação seja química, física ou biológica a melamina sofre desaminação levando aos subprodutos ammeline, ammeline e ácido cianúrico.[29]

Cook e Hutter (1981) buscaram isolar cepas capazes de degradar s-triazinas, categoria de compostos que inclui a melamina. Foram isoladas cepas de *Pseudomonas sp.* e *Klebsiella Pneumoniae* capazes de usar s-triazínicos como única fonte de N para o crescimento. Testes de cepas isoladas mostraram rendimentos

quantitativos de íon amônio de s-triazinas e átomos de carbono do anel foram liberados como dióxido de carbono. Embora já existissem pesquisas de degradação por rota microbiológica da melamina, os autores abriram o leque para o uso das *Pseudomonas* e da *Klebsiella Pneumoniae*. O acesso ao carbono presente no anel dos subprodutos da melamina também foi um dos primeiros relatados na literatura e levaram a maior atenção para esse composto. [30]

Jutzi et al. (1982) estudaram a rota de degradação da melamina através da atividade microbiológica. Os pesquisadores utilizaram a melamina e seus subprodutos durante o crescimento da bactéria *Pseudomonas sp* e a *Klebsiella Pneumoniae*, e obtiveram o mesmo resultado. A partir do processo de biodegradação foi possível converter 0,4mM de melamina em 2,3mM de  $\text{NH}_4^+$ . Eles concluíram que a via de degradação pode ser hidrolítica e que prossegue por consecutivos processos de desaminação até o ácido cianúrico, que finalmente é metabolizado.[29]

Takagi et al. (2012) também estudaram a degradação microbiológica da melamina. Foi utilizado um consórcio bacteriano incluindo uma nova espécie de bactéria da classe *Nocardioides*, visando a aplicação como descontaminante. Após 7 dias a degradação do ácido cianúrico, penúltimo subproduto, não estava completa, sendo essencial o uso de associação das bactérias. Foi possível gerar mais de 3 mols de amônio a partir de 1 mol de melamina, indicando a eficiência do uso do consórcio bacteriano na degradação da melamina. [31]

Ainda avaliando o potencial da bactéria *Nocardioides sp.*, Takashi e Takagi (2016) avaliaram o uso dessa bactéria e da espécie *Arthrobacter sp.* em solos enriquecidos previamente com melamina. Inicialmente, foi feita a aplicação das bactérias diretamente no solo e foi observado uma taxa de 50% de degradação da melamina. Para fins de comparação, esses autores realizaram o crescimento das cepas em meio com melamina presente para que depois fossem feitas as aplicações. As taxas de degradação, para as bactérias que já estavam em contato com a melamina, aumentaram para um teor aproximado de 72%. Todos os ensaios foram realizados com as mesmas condições físicas e no mesmo período de 30 dias. [32]

Shelton et al. (1997) avaliou o metabolismo da melamina pela bactéria *Klebsiella terrigena*. Visando que a atividade biológica desta bactéria já mostrava

eficiência na degradação da melamina, os autores investigaram o processo de metabolização. O uso da *Kebsiella terrigena* estimulou o crescimento das plantas quando associado à uma mistura inoculante com presença da melamina. Os estudos indicaram que a bactéria não degradou totalmente a melamina, e que a adição de  $\text{NH}_4^+$  não atingiu sua sobrevivência. Os autores sugeriram que as desaminações da melamina e amelina, e possivelmente de outros intermediários, ocorreram fora da membrana citoplasmática. Tais observações desempenham um papel importante no entendimento mais profundo da degradação da melamina. [33]

Muitos dos estudos presentes na literatura, relataram uma eficiência da degradação da melamina com uso de micro-organismos. Porém na maioria dos casos a degradação não ocorre efetivamente até  $\text{NH}_3$ , o produto final, encerrando no ácido cianúrico. O ácido cianúrico mostrou em alguns casos ser tóxico na fase inicial de plantio e pode causar malefícios para o desenvolvimento e crescimento da planta.[12,26]

Em virtude da degradação do ácido cianúrico, têm sido buscada rotas biológicas a partir desse subproduto. Cook et al. (1985) usaram *Pseudomonas sp.* e obtiveram 3 mols de  $\text{CO}_2$  e 3 mols de  $\text{NH}_4^+$ , resultados que corroboraram trabalhos anteriores dos mesmos autores. Eles também identificaram outros subprodutos a partir do ácido cianúrico, formando intermediários orgânicos identificados conclusivamente como biureto e ureia, formado por reações hidrolíticas.[34]

Uma vasta gama de micro-organismos foram testados e investigados para compostos do tipo s-triazinas. O uso de cepas da *Pseudomonas sp.* são citadas frequentemente devido à boa eficiência dessa bactéria frente a melamina. A cepa utilizada da classe das *Pseudomonas Avenae*, foi reclassificada como *Acidovorax Citrulli*. [35] A *Acidovorax Citrulli* é uma bactéria encontrada em regiões de plantações de melão, devido ser a causadora da doença mancha-aquosa.[36] Por possuir uma eficiência em degradar composto triazínicos, é de grande interesse agrônomo para a aplicação em fertilizantes nitrogenados.

Desta forma é de grande interesse entender como os micro-organismos irão comportar frente a melamina isolada e à compósitos com presença desse composto. Como já mencionado, o *Trichoderma harzianum* e a *Acidovorax Citrulli*

apresentam bons resultados frente a fontes de N, sendo assim avalia-los em condições conhecidas pode levar à uma melhor compreensão do papel da melamina.

### 3 Objetivos

O presente trabalho teve como objetivo estudar o comportamento da melamina, quando associada em um compósito de matriz biodegradável e ureia. De forma a verificar, como a presença da melamina pode influenciar na degradação biológica dos compósitos sintetizados. Especificados:

- i. Caracterização dos compósitos armazenados.
- ii. Comportamento da difusão de N com variação de pH
- iii. Quantificação das formas de N ( $\text{NH}_3$ ,  $\text{NH}_4^+$  e  $\text{NO}_3^-$ ) liberados na presença dos micro-organismos *Acidovorax Citrulli* e *Trichoderma Harzianum*

## **4 Materiais e métodos**

### **4.1 Materiais**

Os compósitos TPS:Ur:Mel 1:2 e 2:1 foram sintetizados conforme no trabalho de Giroto et al. (2019) e usados em forma de pellets.[5] A composição química dos materiais e de seus precursores foram melamina (99%) e ureia (98%)(Sigma-Aldrich®), amido de milho (30% amilose e 70% de amilopectina) (National Starch and Chemical Company). A ureia foi moída em moinho de facas do tipo Willey (Solab®) equipado com tela de 1mm.

### **4.2 Procedimentos**

#### **4.2.1 Preparação dos polímeros**

O amido, a ureia e a melamina foram misturados manualmente em sacos plásticos por 10 minutos, nas proporções de 67% de amido 11% de melamina e 22% de ureia para TPS:Ur:Mel 2:1 e 67% de amido, 11% de ureia e 22% de melamina para TPS:Ur:Mel 1:2. A mistura foi adicionada em extrusora de parafuso duplo co-rotativa, Figura 4.1 (model Micro 18 Leistritz, Alemanha) e foi operada a 120 rpm. A extrusora barril possuía 6 zonas de aquecimento (70,80,90,105, 105 e 105°C). A taxa de alimentação foi de 23-25 g min<sup>-1</sup>. A água foi adicionada diretamente na extrusora a 4g min<sup>-1</sup> e o produto da extrusão coletado foi resfriado em temperatura ambiente e depois adicionado em micropelletizador (Model 1, Wayne Machine and Die Co., Totowa, NJ). Após o processo de extrusão foram se obtidos pellets, como mostrado na Figura 4.2

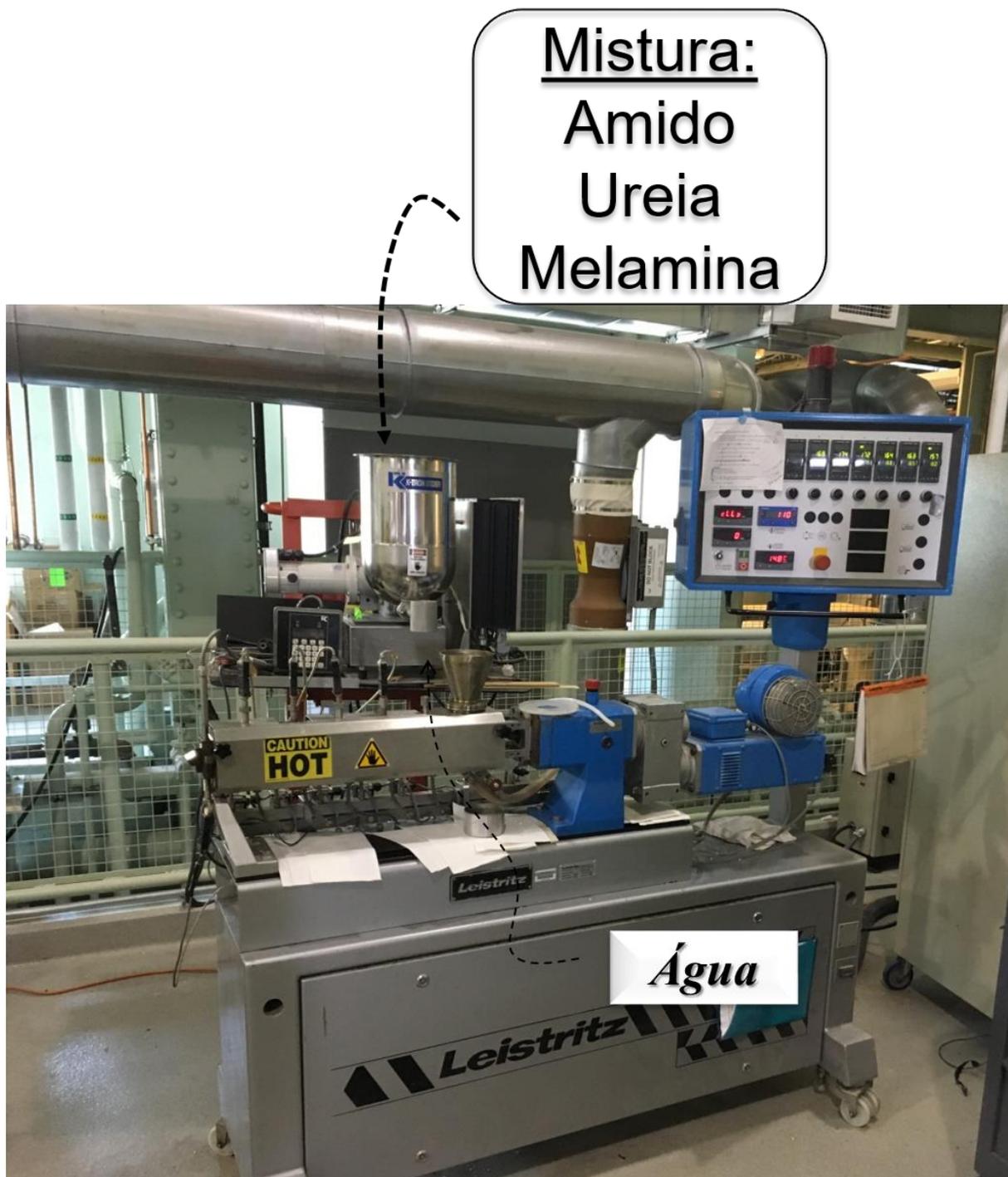


FIGURA 4.1: Extrusora usada para preparação dos compósitos (model Micro 18 Leistriz)



FIGURA 4.2: Compósito (a)TPS:Ur:Mel 2:1 e (b) TPS:Ur:Mel 1:2.

### 4.3 Caracterizações

As caracterizações foram realizadas com o intuito de entender melhor as propriedades químicas, físicas e morfológicas dos materiais. Ao comparar as análises dos precursores com os compósitos é possível avaliar as reações de polimerização e o grau alcançado.

#### 4.3.1 Difratomia de raios X (DRX)

Os difratogramas de raios X foram obtidos através de um difratômetro SHIMADZU XRD 600. Usou-se uma dispersão ( $2\theta$ ) de 3 a  $70^\circ$ , radiação Cu-K $\alpha$  ( $\lambda=0,1546$  nm) com velocidade de  $2^\circ\text{min}^{-1}$ . A voltagem foi de 30kV e a corrente dos tubos de raios X foram de 30mA.

#### 4.3.2 Espectroscopia de absorção na região do infravermelho (FT-IR)

As análises espectroscópicas dos compósitos foram realizadas com acessório de total reflectância total atenuada (ATR) na faixa de  $4000-400$   $\text{cm}^{-1}$ . Os

dados de espectroscopia de FTIR aforam obtidos utilizando equipamento Shimadzu FTIR-8300.

#### **4.3.4 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)**

As amostras foram espalhadas em fita de carbono que estava sob um disco metálico (stub). Para as análises, os stubs foram recobertos com ouro em uma câmara de ionização (BALTEC Med. 020). A microscopia eletrônica de varredura foi realizada em microscópio JEOL, modelo JSM 6510 a 2,5kV.

### **4.4 Avaliação da ureia**

#### **4.4.1 Testes de solubilidade de ureia em meio aquoso com varredura de pH**

Os testes de solubilidade foram realizados em varredura de pH com agitação constante e temperatura controlada como mostrado na Figura 4.3. Afim de quantificar a ureia solúvel no ensaio de 7 dias, alíquotas nas primeiras horas (1, 3 e 6 horas) e conseqüentemente a cada 24 horas foram retiradas e analisadas em espectrofotômetro de UV-visível (SHIMADZU - modelo UV-1601 PC). A metodologia para determinar a concentração de ureia foi adaptada do método para quantificar ureia em ensaios biológicos.[37] Usou-se um reagente nomeado de Ehrlich (solução de 4-dimetilaminobenzaldeído  $0,36 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) em HCl  $2,4 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) e uma solução 10% de ácido tricloroacético. Para realização da leitura no espectrofotômetro de UV-visível ( $\lambda = 435 \text{ nm}$ ) adicionou-se 1 mL da amostra a ser analisada (alíquotas retiradas em diferentes intervalos de tempo) com 4 mL da solução ácida e 1 mL do reagente de Ehrlich. A concentração pesada previamente foi de 2000 ppm de ureia presente nos compósitos e 2000 ppm de melamina pura, a faixa de pH foi de 3-8, temperatura de  $25^\circ\text{C}$  e a agitação teve como objetivo garantir a difusão para o meio e não à ação do

agitador. Desta forma, curvas de concentração de nitrogênio em solução versus tempo de liberação foram obtidas.

Os ensaios de dissolução da ureia em diferentes pH e com solução tampão, teve como propósito avaliar como os compósitos iriam reagir em pH mais ácido (pH:3) e mais básico (pH:8) sendo que estes já haviam sido testados em pH neutro. A varredura de pH: 3-8 teve como objetivo avaliar mudanças de comportamento e liberação desses materiais frente a variação de pH.

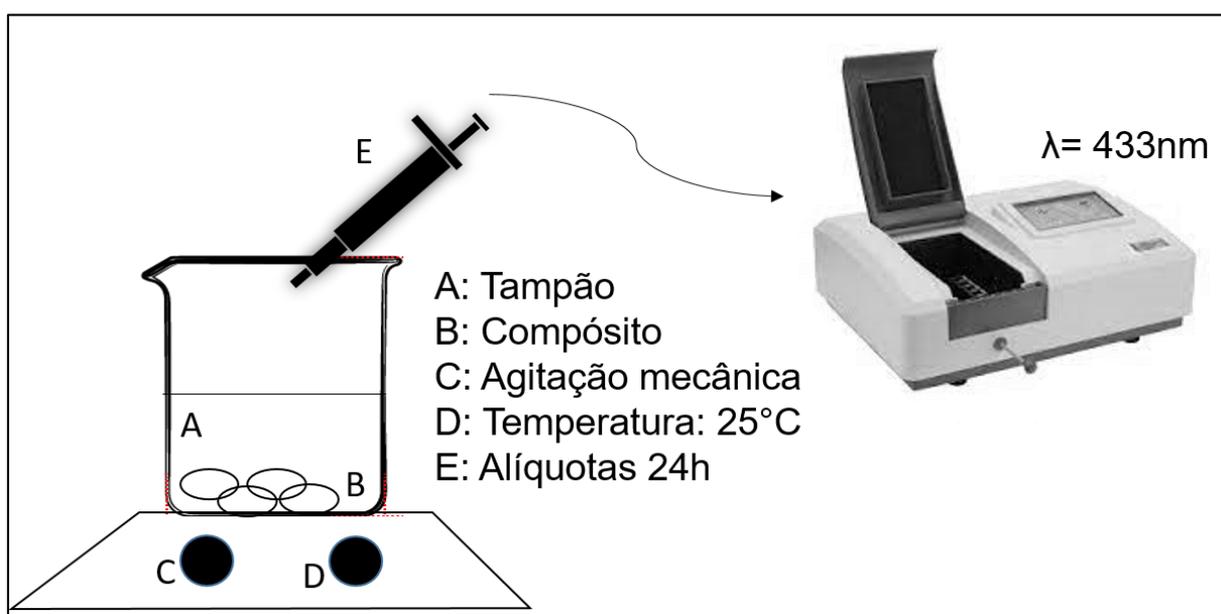


FIGURA 4.3: Ensaio de solubilidade de ureia com varredura de pH

## 4.5 Ensaio de biodegradação

Foram realizadas incubações de solo pobre em matéria orgânica (areia) e baixa ou quase nenhuma atividade microbiológica afim de estabelecer condições adversas para o crescimento dos micro-organismos. A areia utilizada é areia comum comercial. Utilizou-se isolados do fungo *Trichoderma Harzianum* e da bactéria *Acidovorax Citrulli*, ambos já estudados anteriormente para degradação de compostos nitrogenados. Vale ressaltar também que os testes com atividade microbiológica controlada foram realizados também para comparação com resultados obtidos

anteriormente com os mesmo materiais porém usando solo de jardim (Vivatto Plus®, classe F, Technes), um solo com alta atividade microbiológica e alta matéria orgânica.

## **4.5.1 Crescimento e inoculação dos micro-organismos**

### **4.5.1.a *Trichoderma harzianum***

Pertencente ao Reino Fungi, da classe *Hypocreaceae*, Gênero *Trichoderma*, Espécie *Trichoderma harzianum*. Esse fungo é amplamente estudado devido à complexidade de compostos capazes de ser gerados e também a facilidade de resistir e adaptar em condições adversas.

Foram utilizados fungos da coleção da Embrapa Instrumentação de São Carlos que possui um banco de micro-organismos, estes foram cultivados em meio Batata Dextrose Ágar (BDA) à 28°C até sua esporulação e depois suspendidas em microtubos com água e glicerol 1:1 e congeladas em freezer -80°C.

Para utilização nos ensaios, os isolados congelados foram reativados em BDA (marca Kasvi®), após o período de crescimento foi feita a raspagem das placas com solução 1% de Tween 80 (Dinâmica®) e os esporos foram contados em placas de Neubauer (marca Precision® modelo C1010) utilizando microscópio eletrônico (Labor import® modelo: L2000). Os esporos foram adicionados ao ensaio com presença do meio de cultivo de 10g/L Sacarose puríssima (Neon), 8g/L caseína hidrolisada (KASVI), 4g/L extrato de levedura (Kasvi®), 2g/L K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (Êxodo científica®) e 0,3g/L MgSO<sub>4</sub> (Sigma-Aldrich®). Os micro-organismos foram previamente inoculados em ambiente estéril usados em concentração 1.10<sup>7</sup>células/mL.

### **4.5.2.b *Acidovorax Citrulli***

Pertencente a classe *Betaproteobacteria*, família Comamonadaceae e espécie *Acidovorax avenue subsp Citrulli*, é uma bactéria Gram-negativa que foi

reclassificada, por antes pertencer a espécie *Pseudomonas avenae*. [35] Ela é conhecida comumente como mancha-aquosa que ataca meloeiros.

Os isolados foram obtidos por doação do estoque genético da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia de Brasília e nomeada como Emb.A11-19. Tais isolados foram mantidos em freezer -80°C.

Para inoculação da bactéria em ensaio de biodegradação, os isolados foram suspensos no meio de cultivo de 10g/L Sacarose puríssima (Neon®), 8g/L caseína hidrolisada (Kasvi®), 4g/L extrato de levedura (Kasvi®), 2g/L K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (Êxodo científica®) e 0,3g/L MgSO<sub>4</sub> (Sigma-Aldrich®) e 20g/L ágar (Kasvi®) e avaliados por método de quantificação indireta de bactérias em suspensão utilizando a escala McFarland. O método de quantificação da *Acidovorax Citrulli* consiste em leitura em espectrofotômetro UV-Vis (SHIMADZU - modelo UV-1601 PC) de um padrão composto por 1% de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e 0,5 mL de solução 10g/L de BaCl<sub>2</sub> (Êxodo®) e comparação com a leitura do meio de cultivo com a bactéria. Através do relação de densidade celular da amostra (células/ml) = (absorbância da amostra x 1.10<sup>8</sup>)/absorbância do padrão.[38] A bactéria foi previamente inoculada em ambiente estéril e usada em concentração 1.10<sup>7</sup>células/mL.

#### **4.6 Determinação de nitrogênio mineralizado em solo incubado com micro-organismos**

Foram conduzidas incubações para investigar a transformação do nitrogênio orgânico presente em volatilização de gases de amônia e nas formas inorgânicas NH<sub>4</sub><sup>+</sup> e NO<sub>3</sub><sup>-</sup>. Os compósitos e os precursores foram incubados em 50g de areia livre de atividade microbiológica e sem matéria orgânica presente. A areia foi peneirada em peneira de 5mm afim de manter a uniformidade da granulometria, a umidade foi ajustada em 60% com o meio de cultivo previamente estipulados para a sobrevivência da bactéria *Acidovorax Citrulli* e do fungo *Trichoderma Harzianum*.

Os tratamentos foram realizados em triplicadas e divididos em Branco (areia com *Trichoderma Harzianum*); Ureia (areia, ureia e *Trichoderma Harzianum*); Melamina (areia, melamina e *Trichoderma Harzianum*); TPS:Ur:Mel 1:2 (areia,

compósito TPS:Ur:Mel 1:2 e *Trichoderma Harzianum*); TPS:Ur: Mel 2:1( areia, compósito TPS:Ur:Mel 2:1 e *Trichoderma Harzianum*), e da mesma forma para a bactéria, adicionando *Acidovorax Citrulli*. Estes foram pesados segundo a recomendação de nitrogênio para o solo de  $100\text{kg}_N.\text{ha}^{-1}$ . Todas as amostras foram incubadas em triplicatas por 3,7,14,28 e 42 dias. Foi adaptado um sistema com presença de 5mL de ácido bórico ( $\text{H}_3\text{BO}_3$ ) 4% que era recolhido e titulado com solução de ácido clorídrico (HCl) ( $0,01\text{ mol.L}^{-1}$ ) afim de quantificar a volatilização de  $\text{NH}_3$ .

O N mineral foi extraído com solução de KCl ( $1,0\text{ mol.L}^{-1}$ ) e acetato de fenilmercúrio ( $5\text{ mg.L}^{-1}$ ) como inibidor da urease. O extrato foi filtrado em filtro de filtragem lenta (diâmetro de 12,5 cm) e armazenados em frasco de poliestireno a  $5^\circ\text{C}$  e analisados por método colorimétrico adaptado de Kempers & Zwiers (1986). Para quantificação de  $\text{NH}_4^+$  foram adicionados 0,18mL de solução nomeada RT; solução de salicilato de sódio e nitroprusiato de sódio e solução tampão de citrato de sódio tribásico, e 0,20mL mL de hipoclorito comercial nos extratos e analisados em espectrofotômetro de UV-visível ( $\lambda=647\text{nm}$ ) (SHIMADZU - modelo UV-1601 PC) . [39]

Para análise de  $\text{NO}_3^-$  foi adaptado o método de Yang et al. (1998), foram adicionados ao extrato 0,05 mL de solução TRI ( salicilato de sódio, NaCl, sulfamato de amônio e NaOH) e as amostras foram secas em estufas a  $80^\circ\text{C}$  após 24 horas na estufa foram adicionados 0,1mL de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  concentrado e 0,5 mL de NaOH ( $10\text{mol.L}^{-1}$ ) e analisados em Espectrofotômetro de UV-visível ( $\lambda=410\text{ nm}$ ) (SHIMADZU - modelo UV-1601 PC). [40] Como mostrado no esquema na Figura 4.4.

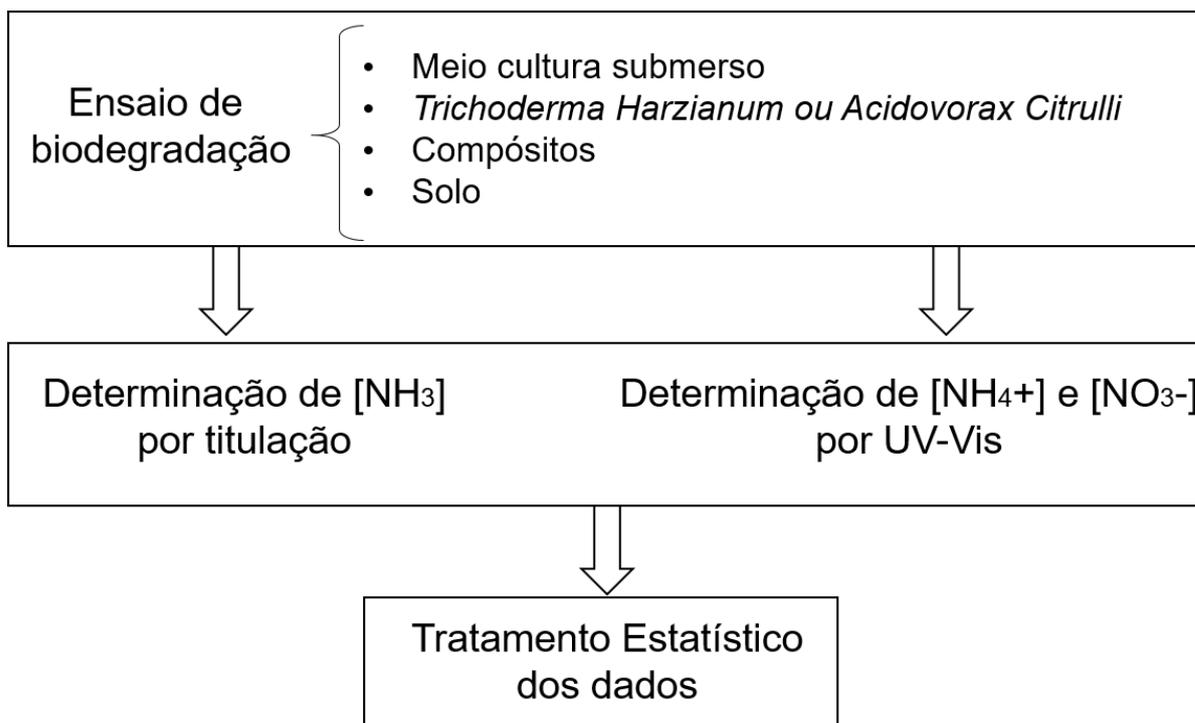


FIGURA 4.4: Esquema de etapas realizados no ensaio de quantificação de nitrogênio

## 4.7 Tratamento estatístico dos dados

Todos os dados da quantificação do nitrogênio presente foram submetidos a testes estatísticos, a fim de avaliar diferença significativa entre as médias amostrais. Os testes foram realizados no *software* Origin Pro.8® e avaliados pelo teste ANOVA usando o Teste de Tukey (nível de significância  $p < 0,05$ ) para comparar as médias.

## 5 Resultados e Discussões

### 5.1 Caracterizações

Para identificar e caracterizar a estrutura cristalográfica dos materiais foram feitas análises por DRX, como mostrado na Figura 5.1. Foram comparados os materiais precursores dos compósitos; amido, melamina e ureia e os compósitos TPS:Ur:Mel 1:2 e TPS:Ur:Mel 2:1. O difratograma do amido (a) apresenta características típicas para esse material, tais estruturas são identificadas como helicoidais simples de cristais de amilose, que é desordenada.[41] O amido é um polissacarídeo formado por uma cadeia de amilose que são várias estruturas de glicose ligadas entre si e ramificações nomeadas de amilopectina que apresentam picos cristalinos. [42,43]. Comparando os difratogramas dos compósitos (d) e (e) com o amido, precursor com maior teor nos materiais; percebe-se uma sobreposição dos picos da ureia e melamina, mascarando o amido que sofre uma ruptura da estrutura durante o processo de extrusão que causa a quebra das ligações de hidrogênio presente.[43] Para o compósito TPS:Ur:Mel 2:1 (d) a presença de pico intenso em  $\theta$ : 22,48° é característico da presença de ureia. Essa intensidade é enfatizada devido ao maior teor de ureia quando comparado com o compósito TPS:Ur:Mel 1:2 (e) que apresenta o pico na mesma região  $\theta$ : 21,92°, com intensidade inferior. Nos compósitos TPS:Ur:Mel 2:1 e TPS:Ur:Mel 1:2 os picos característicos da presença da melamina se encontram em  $\theta$ : 26,44° e 26,38°. Da mesma forma o maior teor de melamina é corroborado pela maior intensidade desse pico no compósito TPS:Ur:Mel 1:2 que apresenta 22% e TPS:Ur:Mel 2:1 11% de melamina.

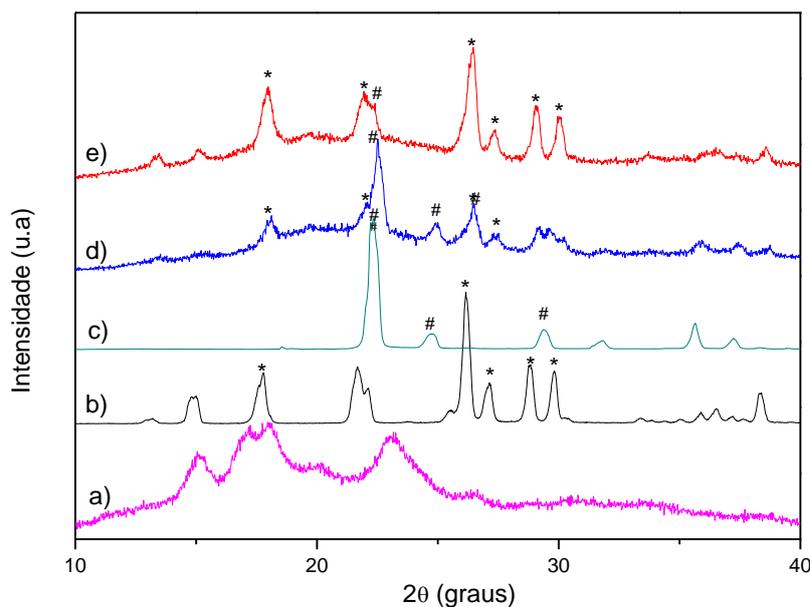


FIGURA 5.1: DRX dos precursores (amido (a), melamina (b) e ureia (c)) e dos compósitos TPS:Ur:Mel 2:1 (d) e TPS:Ur:Mel 1:2 (e) \*fases melamina \*fases ureia

Os espectros de absorções de infravermelho para os compósitos e seus precursores são apresentados na Figura 5.2. O FT-IR foi indicado como uma técnica para verificar o amido presente nas estruturas [44,45]. As bandas de absorção presentes no amido (a) são características desse precursor em  $2931\text{ cm}^{-1}$ , referente ao alongamento C-H, em  $1155\text{ cm}^{-1}$  ao alongamento C-O, C-C e CO-H, e em  $1079$  e  $1022\text{ cm}^{-1}$  à flexão C-O-H.[46] A melamina (b) apresenta bandas características em  $3441\text{ cm}^{-1}$  ao alongamento de  $-\text{NH}_2$  e  $3345\text{ cm}^{-1}$ , atribuídos a alongamentos simétricos e assimétricos de absorção de  $-\text{NH}$ .[47] No espectro da ureia (c) as bandas são observados em  $3469$  e  $3414\text{ cm}^{-1}$  e em  $1632\text{ cm}^{-1}$  da C=O. Os compósitos TPS:Ur:Mel 2:1 (d) e TPS:Ur:Mel 1:2 (e) apresentam bandas mais intensas, características dos precursores na região de  $3400\text{ cm}^{-1}$  referentes a alongamento da ligação  $-\text{NH}_2$  e N-H, na região  $1600\text{ cm}^{-1}$  para vibrações de C=O, e as bandas na região  $1100\text{-}900\text{ cm}^{-1}$  referentes à flexão da ligação C-O-H. Sendo assim, foi possível caracterizar o amido presente e observar os picos esperados dos compostos presentes indicando também a ausência de contaminantes nos compósitos.

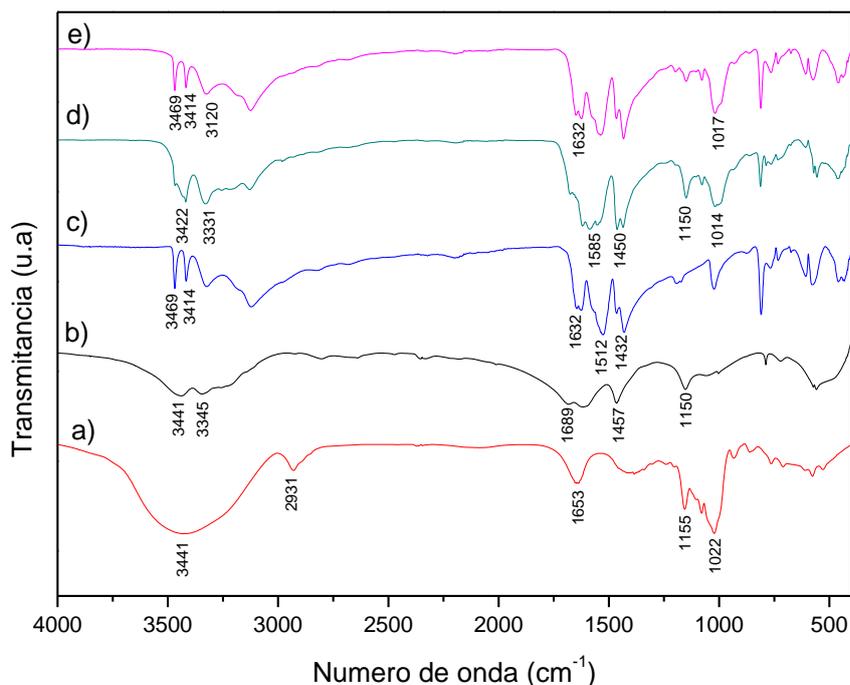


FIGURA 5.2: FT-IR dos precursores (amido (a), melamina (b) e ureia (c)) e dos compósitos TPS:Ur:Mel 2:1 (d) e TPS:Ur:Mel 1:2 (e).

A microscopia eletrônica de varredura foi realizada para os materiais precursores ureia e melamina, Figura 5.3. Para os compósitos as micrografias são apresentadas na Figura 5.4 para TPS:Ur:Mel 1:2 e Figura 5.5 para TPS:Ur:Mel 2:1. Os compósitos TPS:Ur:Mel 1:2, Figura 5.4 e TPS:Ur:Mel 2:1, Figura 5.5 foram analisados em seção transversal. Comparando as micrografias dos precursores melamina e ureia com os compósitos pode-se observar a alteração morfológica nos materiais durante o processo de extrusão e de polimerização. Os compósitos apresentam homogeneidade e estabilidade mantendo suas condições originais mesmo com o armazenamento. Na Figura 5.4 a) o compósito TPS:Ur:Mel 1:2 apresenta poros que podem estar relacionados à evaporação de água durante o processo de extrusão. Na Fig. 5.4 a.1 e a.2 nota-se que o material apresenta desníveis em sua superfície e aproximando nesse desnível na Fig. 5.4 a.3 não é presente segregação de fase. Nos compósitos TPS:Ur:Mel 2:1, Figura 5.5, o material não apresentou poros. Na Figura 5.5 a.2 é possível perceber uma recristalização da ureia na superfície, isso se deve primeiramente à maior quantidade de ureia nesse

compósito na proporção de 2:1, e também ao tempo de armazenamento do material. Vale ressaltar que essa recristalização foi bem sutil e na Figura 5.5 a.3 é possível notar a polimerização da matriz (amido), indicando assim que não houve comprometimento do material e que ele manteve sua estabilidade.

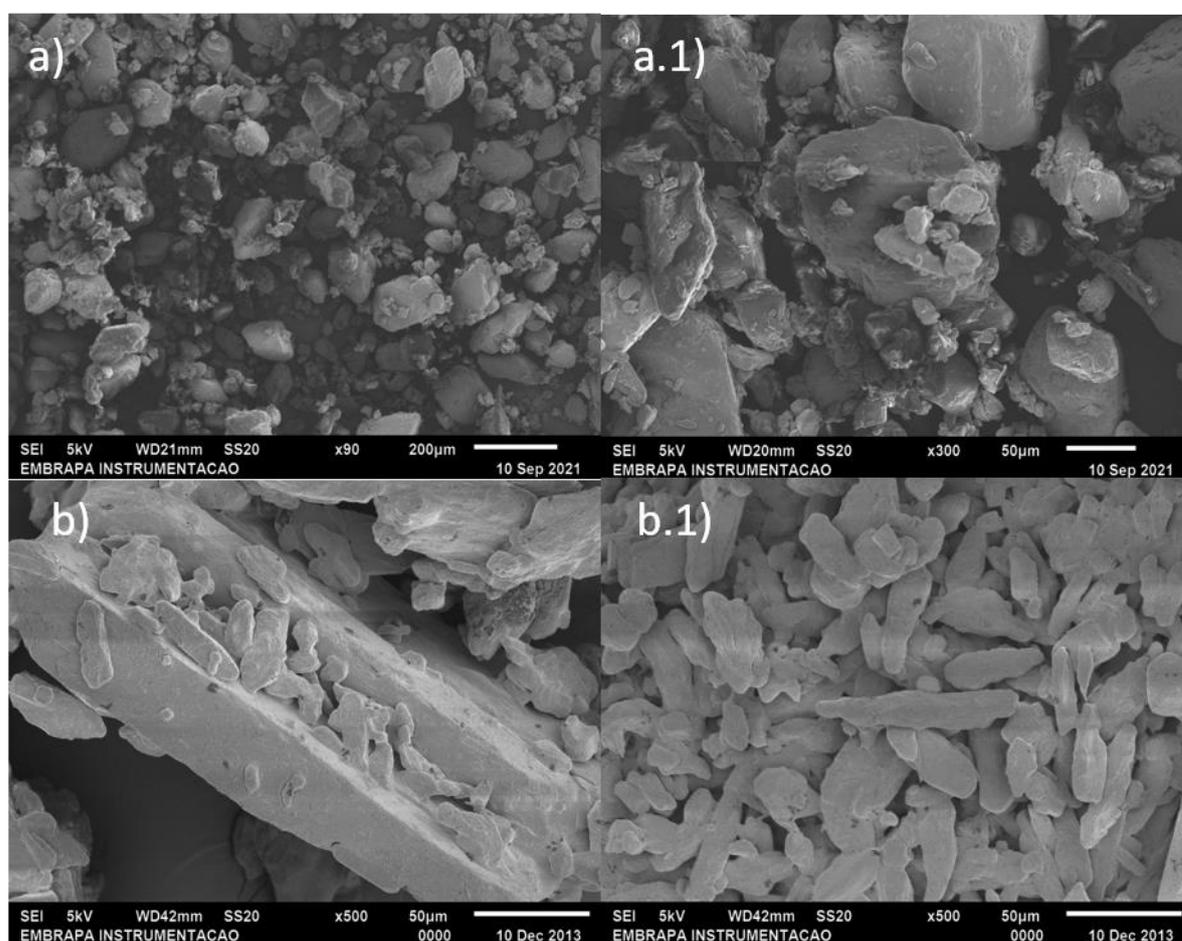


FIGURA 5.3: Imagens de microscopia eletrônica de varredura dos precursores a) melamina e b) ureia, em duas magnificações.

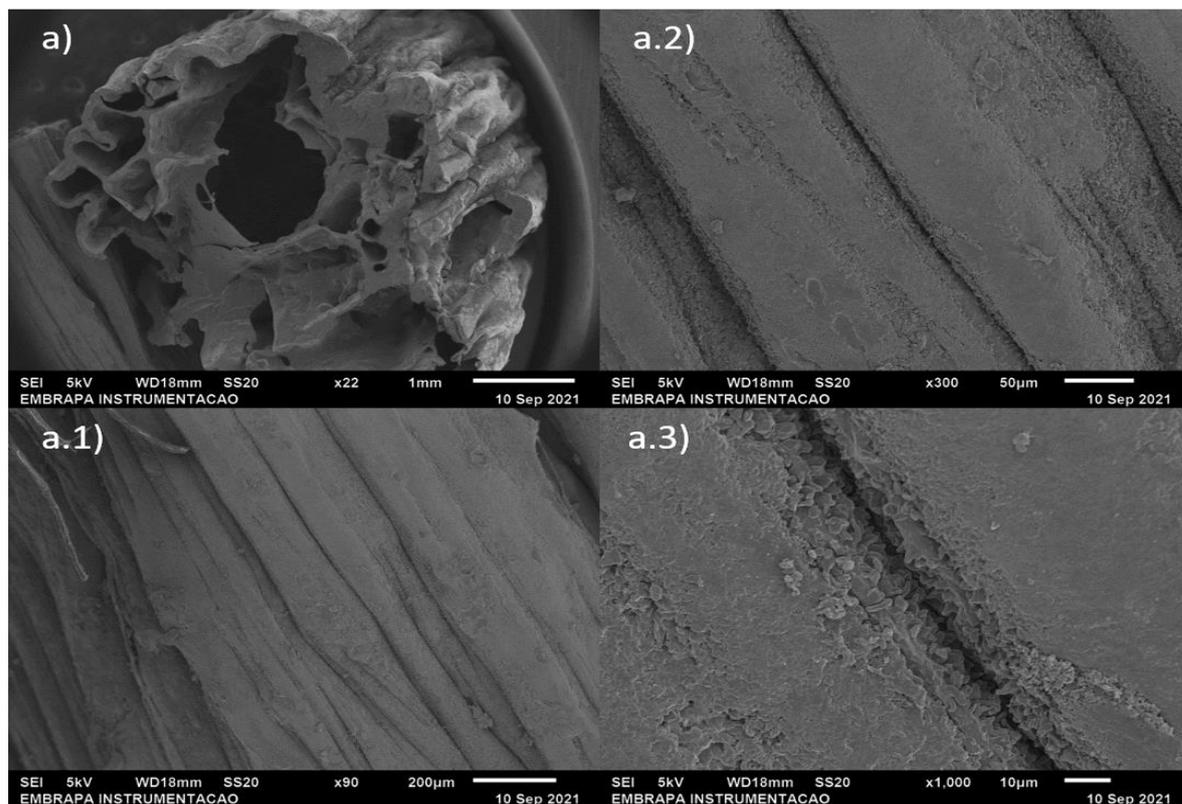


FIGURA 5.4: Imagens de microscopia eletrônica de varredura dos compósitos estudados TPS:Ur:Mel 1:2, em quatro magnificações a) seção transversal a.1) superfície a.2) e a.3) aproximação nos desníveis presentes na superfície

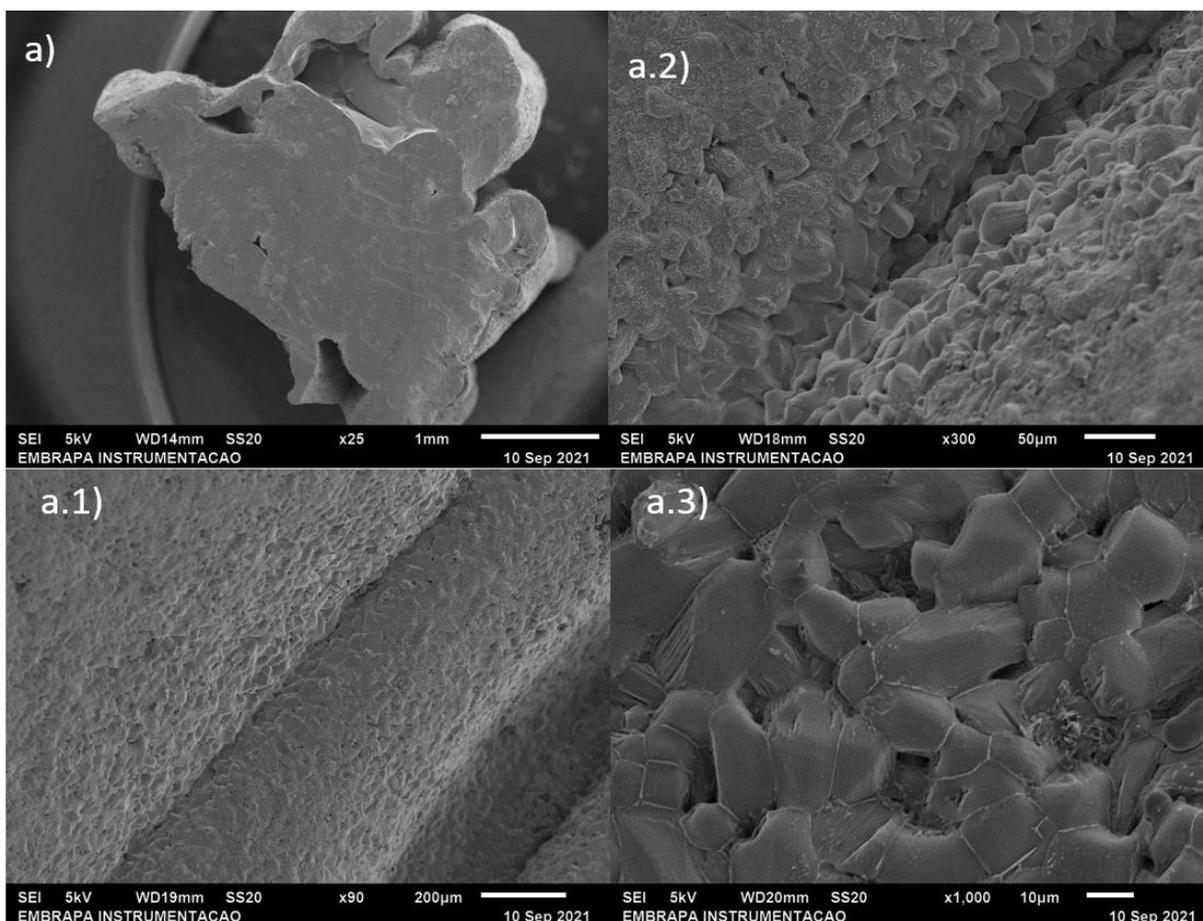


FIGURA 5.5: Imagens de microscopia eletrônica de varredura dos compósitos estudados TPS:Ur:Mel 2:1, em quatro magnificações, a) seção transversal a.1) superfície a.2) e a.3) aproximação nos desníveis presentes na superfície.

## 5.2 Avaliação da ureia frente à variação de pH

A dissolução da ureia para os dois compósitos estudados, comparativamente com a melamina pura e a ureia pura, precursores desses materiais é apresentada nas Figuras 5.6 à Figura 5.11. No pH 3, a ureia foi liberada no seu teor máximo em 3 horas, o compósito TPS:Ur:Mel 2:1 teve uma liberação gradual atingindo seu máximo em 48 horas, e o compósito TPS:Ur:Mel 1:2 teve 60% de liberação em 3h e atingiu seu máximo de liberação em 80% em 48 horas. No pH 4, assim como em todos os outros valores de pH a ureia teve um liberação rápida e comportamento igual liberando seu máximo em 3 horas, os compósitos TPS:Ur:Mel 2:1 teve sua liberação máxima em 3 horas devido sua composição maior de ureia e o TPS:Ur:Mel 1:2 teve liberação máxima em 48 horas. Em pH 5 para o TPS:Ur:Mel 2:1 em 24h houve uma

liberação de 80% e liberação de 100% em 48 horas, o TPS:Ur:Mel 1:2 apresentou uma liberação gradual atingindo 70% em 48 horas e o máximo teor em 4 dias (96 horas). Em pH 6 o TPS:Ur:Mel 2:1 teve um liberação de 80% em 24 horas e TPS:Ur:Mel 1:2 liberação máxima de 72 horas. Para pH 7 o máximo de TPS:Ur:Mel 2:1 em 24 horas e TPS:Ur:Mel 1:2 em 48 horas. No pH mais alto, pH 8 o compósito TPS:Ur:Mel 2:1 teve um liberação rápida em 3 horas e para TPS:Ur:Mel 1:2 liberação máxima 48 horas. A presença de alto teor de N nos compósitos TPS:Ur:Mel 2:1 e TPS:Ur:Mel 1:2 levou a maior solubilidade da ureia principalmente em pH:7, Fig.4.10, e pH:8 apresentado na Fig.5.11. Isso se deve ao pH influenciar diretamente na atividade da enzima urease. Pettit et al. (1976) definiram como o pH ótimo para a dissolução da ureia valores entre 6,5 a 7,0 [48], o que corrobora com a maior teor de solubilização desses compósitos em pH mais alto.[48] Para o compósito TPS:Ur:Mel 1:2 a solubilização máxima foi um pouco mais lenta em pH:5, Fig.5.8, e em pH:6 na Fig.5.9, atingindo seu máximo depois de 72 horas. Para esse mesmo compósito, em proporção 1:2 (ureia: melamina), após 24 horas em todas as condições de pH ele foi o que apresentou a maior disponibilidade de ureia. Isso se deve ao fato de que nesse material existe maior teor de melamina, a qual durante o processo de extrusão levou a uma maior plasticidade e interação mais intensa dos grupos amina presentes com o amido.[20] A melamina usada isoladamente não houve solubilização de ureia mesmo com a variação de pH, o que era esperado devido à alta estabilidade da molécula e baixa solubilidade.[49]

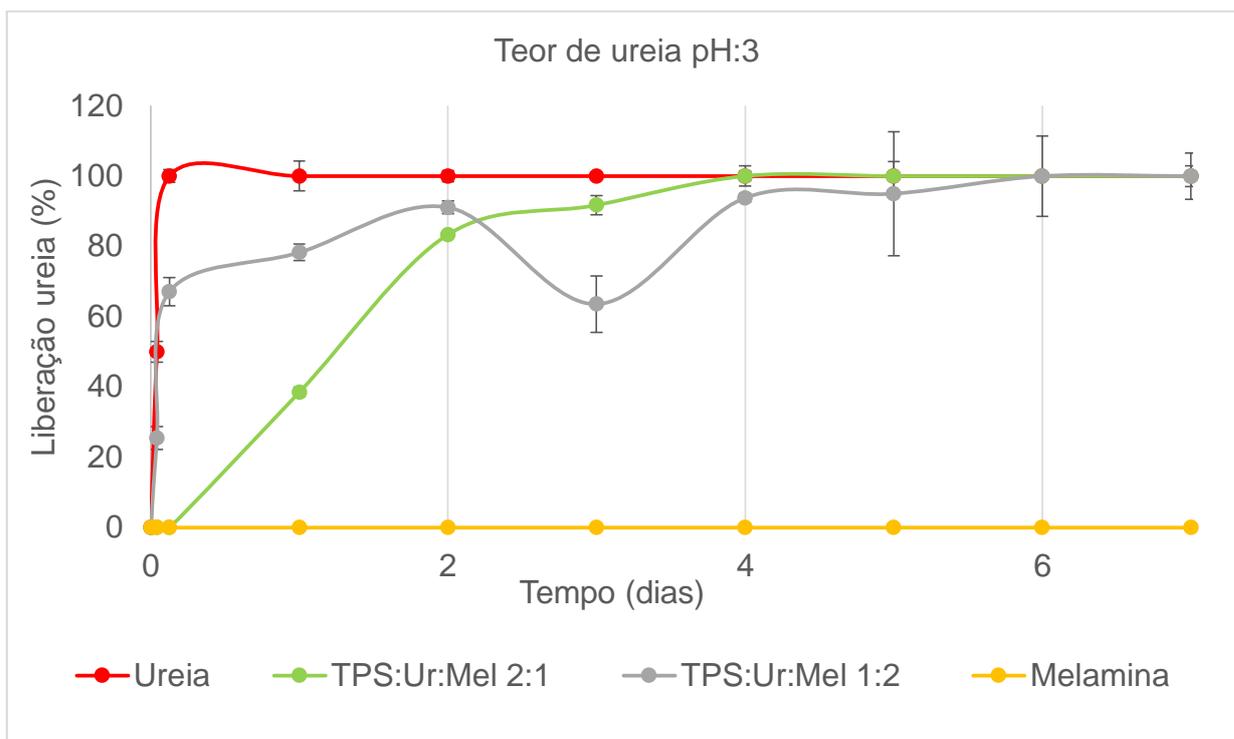


FIGURA 5.6: Teor de ureia presente nos materiais em pH:3

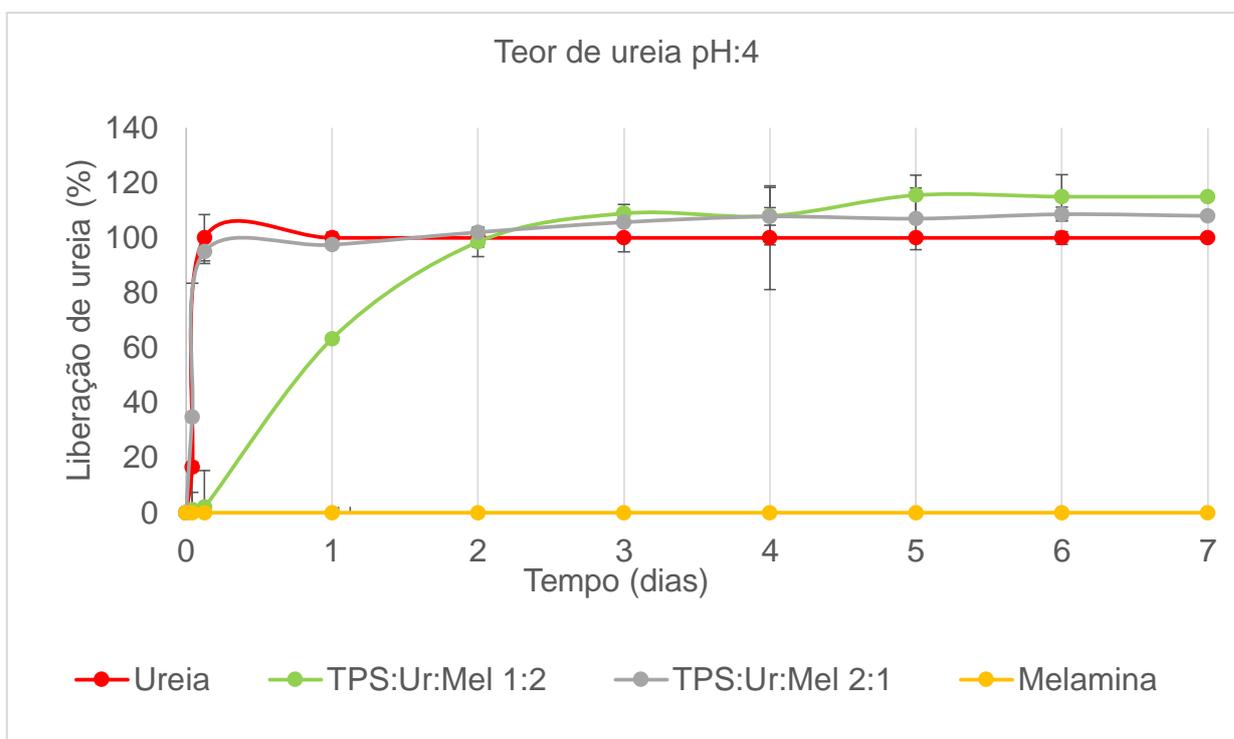


FIGURA 5.7: Teor de ureia presente nos materiais em pH:4

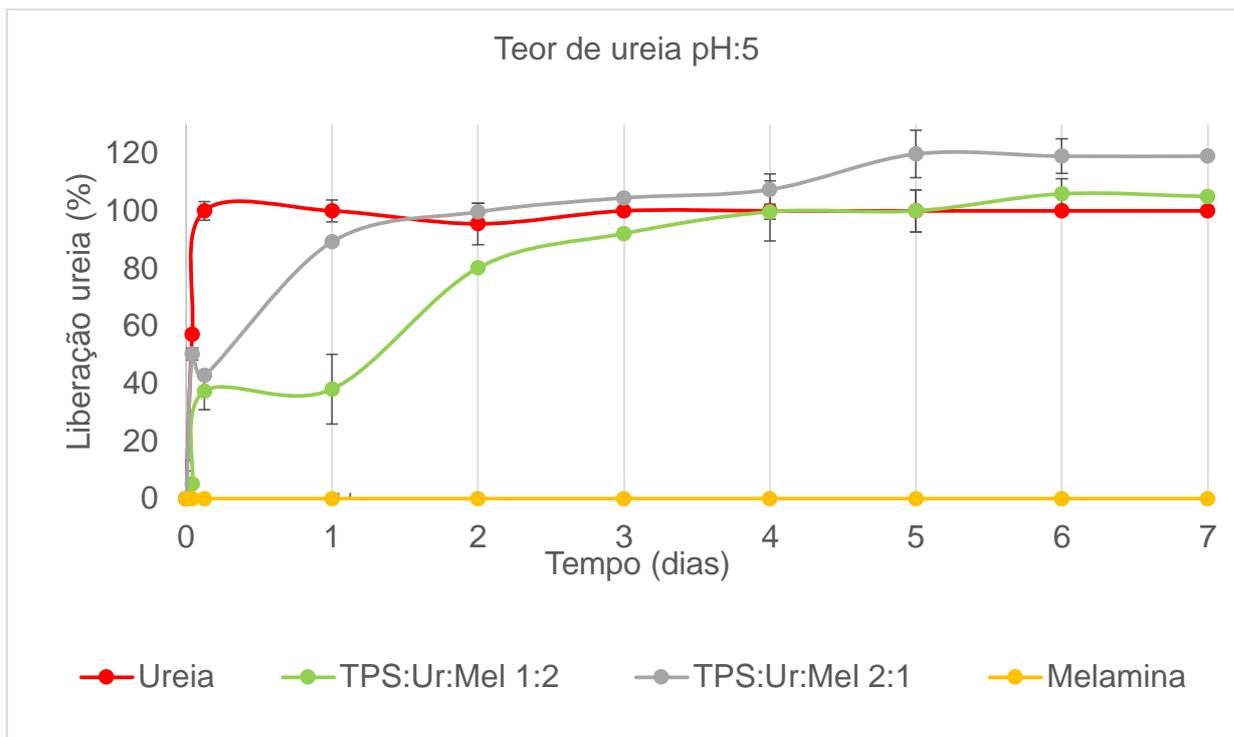


FIGURA 5.8: Teor de ureia presente nos materiais em pH:5

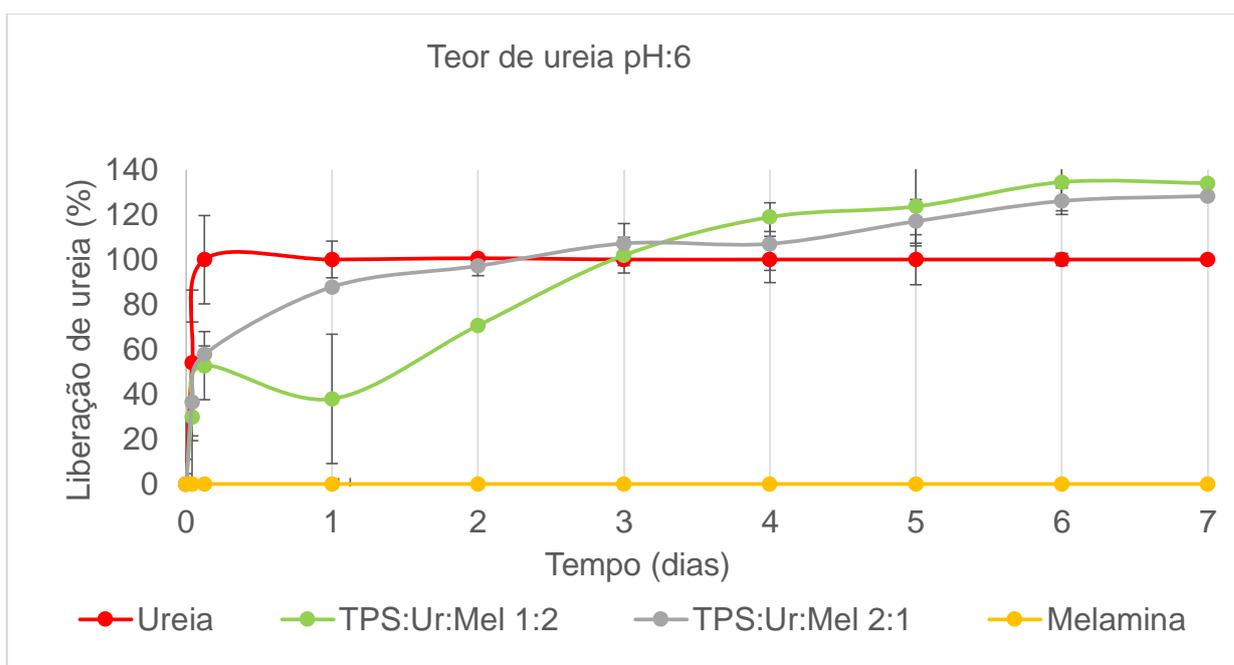


FIGURA 5.9: Teor de ureia presente nos materiais em pH:6

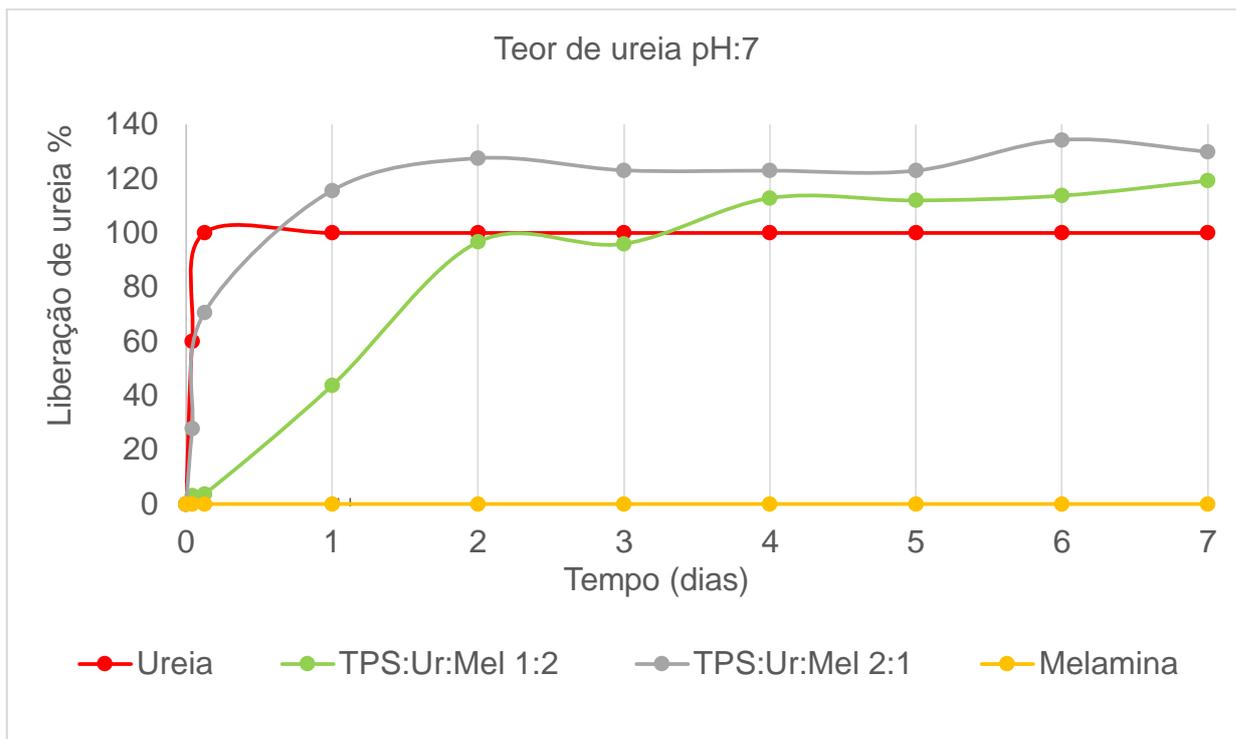


FIGURA 5.10: Teor de ureia presente nos materiais em pH:7

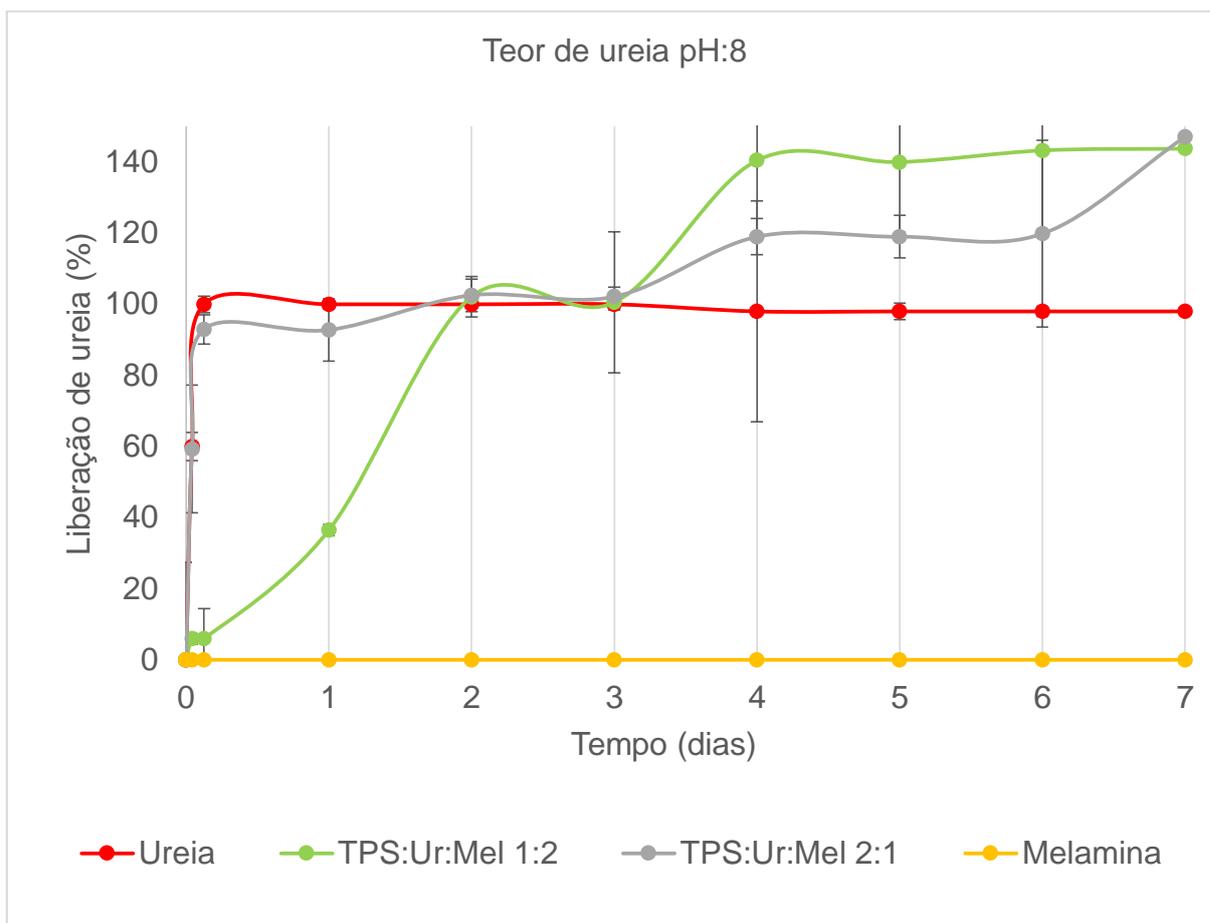


FIGURA 5.11: Teor de ureia presente nos materiais em pH:8

No entanto, ressalta-se que o ensaio de dissolução de ureia é realizado por imersão completa dos materiais que passam por uma moagem dos compósitos, ou seja, trata-se de um ensaio muito agressivo, sendo assim não pode ser comparado com o comportamento real em campo, onde o teor de água seria menor, levando a uma maior retenção da ureia.

Avaliando os resultados de dissolução da ureia em solução tampão com variações de pH, é importante comparar com outros resultados obtidos para esses materiais em água e pH neutro. Giroto e colaboradores (2019) avaliaram uma liberação de apenas 40% de ureia para o compósito TPS:Ur:Mel 1:2 enquanto neste presente estudo houve o dobro da liberação, isso pode ser suposto ao efeito do tempo de estocagem do material. Mesmo não apresentando mudanças químicas em sua estrutura, pode ter sido iniciado um processo de recristalização da ureia, mesmo não

tão aparente como foi visualizado no MEV no compósito TPS:Ur:Mel 2:1 mostrado na Fig.5.5. Mas, como observado na Fig.5.4, esse processo pode ter sido iniciado e conseqüentemente aumentado a ureia presente na superfície dos defeitos desse material. Para o compósito TPS:Ur:Mel 2:1, em Giroto et al. (2019) os teores de liberação total foram de 70% em 120 horas enquanto nesses experimentos foram de 100% em 24 horas. Nesse caso, também pode ser ao efeito da recristalização da ureia na superfície dos defeitos como mostrado na Fig.5.5. [5]

Entre outros efeitos é necessário citar que os equipamentos de testes foram diferentes, e mesmo que tenham sido seguidas rigorosamente as mesmas condições, isso pode acarretar diferenças nos resultados. Além de ressaltar o tempo de estoque dos compósitos, é importante observar que mesmo com temperatura controlada de 25°C o uso de solução tampão é um grande atrativo para a ação de micro-organismos, principalmente fungos, e isso foi notável durante a realização dos ensaios. Todos os testes foram realizados em triplicadas e com leituras diárias de pH, que não variou significativamente. Porém, mesmo com a não variação de pH nos ensaios de varredura, a ação inesperada de micro-organismos pode ter acarretado uma aceleração na liberação de ureia. Isso pode ser devido à biodegradação da matriz polimérica (amido), levando a maior liberação em menor tempo dos compostos presentes.

## **5.3 Ensaio de biodegradação**

Os ensaios foram realizados com adição de micro-organismos sendo conhecida a concentração/densidade de células de micro-organismos por mL. Para fins comparativos foram utilizados isolados do fungo da *Trichoderma Harzianum* e da bactéria *Acidovorax Citrulli*, como já mencionado.

### **5.3.1 Crescimento dos micro-organismos**

Os isolados contidos em estoque da Embrapa Instrumentação, antes de serem inoculados nos ensaios de biodegradação foram crescidos em meio ágar como

mostrado na Figura 5.12 e Figura 5.13. O crescimento prévio dos isolados é importante para avaliar a viabilidade dos esporos estocados em freezer com temperatura de  $-80^{\circ}\text{C}$ . Sendo assim, antes da inoculação dos testes, os isolados são adicionados na superfície de placa de Petri, previamente esterilizados com alça microbiológica em ambiente estéril e capela de fluxo laminar e avaliados em seu devido tempo de crescimento.

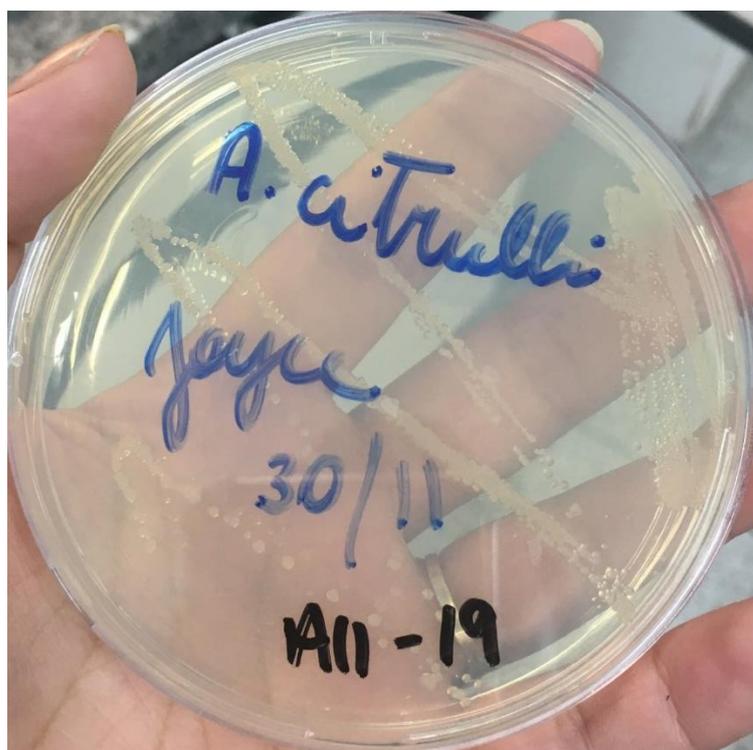


FIGURA 5.12: Crescimento de isolado *Acidovorax Citrulli* em meio com ágar



FIGURA 5.13: Crescimento do fungo *Trichoderma Harzianum* em meio BDA

Após o crescimento dos isolados estes foram retirados e quantificados para inoculação nos ensaios. O ensaio com diferentes tratamentos foram realizados com areia e a umidade foi ajustada com meio de cultivo pré-estabelecidos para os micro-organismos. O fungo e a bactéria se adaptaram ao ensaio mostrando crescimento ao longo dos dias. Na Figura 5.14 é possível perceber que houve crescimento.

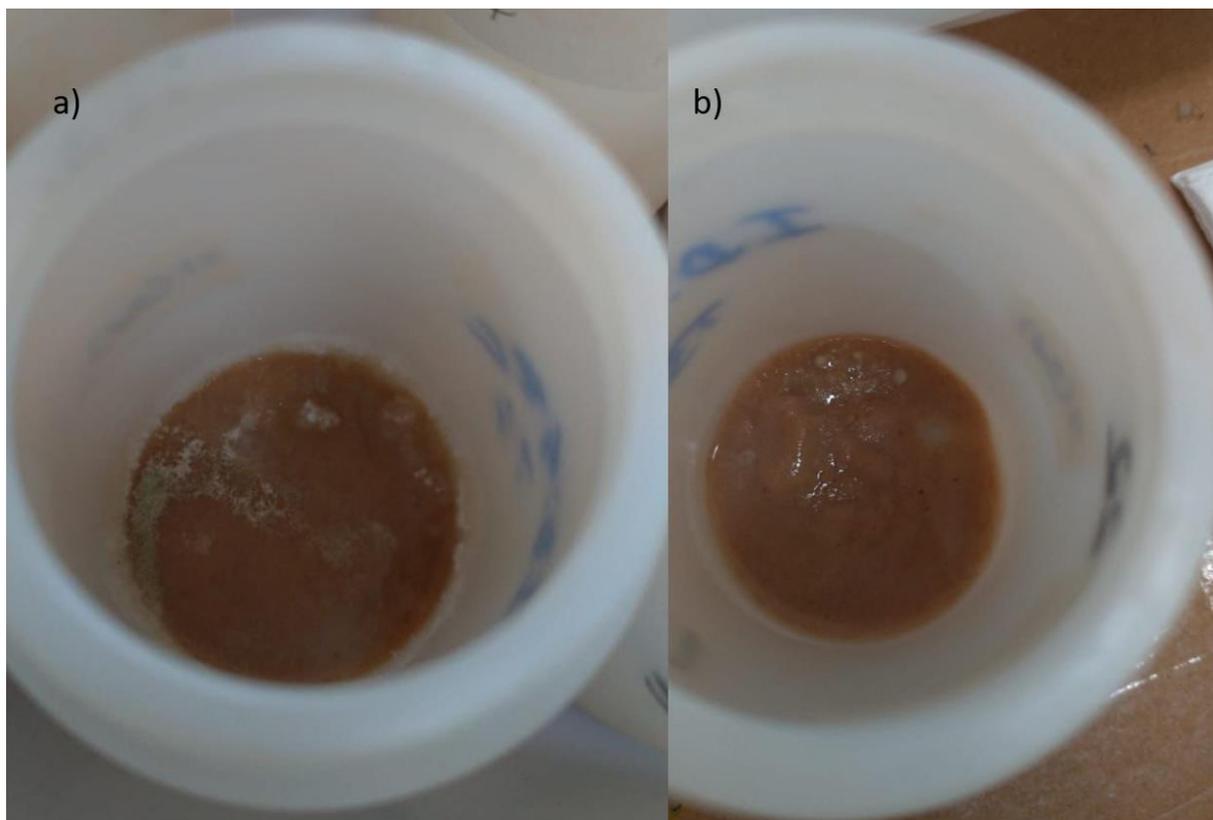


FIGURA 5.14: Crescimento dos micro-organismos em 3 dias de incubação a) TPS:Ur:Mel 2:1 com *Trichoderma harzianum* b) TPS:Ur:Mel 1:2 *Acidovorax Citrulli*

Os tratamentos foram retirados em 3, 7, 14, 28 e 42 dias e avaliados para gases de amônia, amônio e nitrato. Para o sétimo dia os tratamentos com a melamina mostraram um crescimento perceptível a olho nu, como pode ser observado na Figura 5.15.

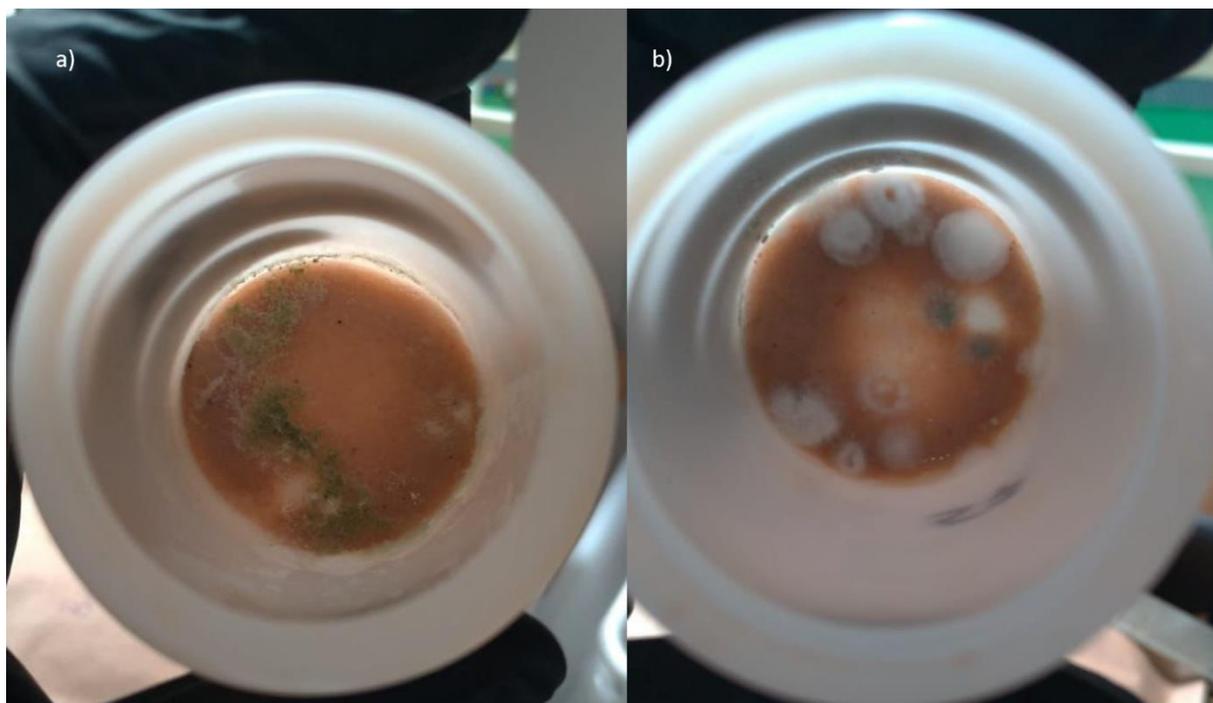


FIGURA 4.15: Crescimento com micro-organismos em 7 dias no tratamento com melamina a) *Trichoderma Harzianum* b) *Acidovorax Citrulli*

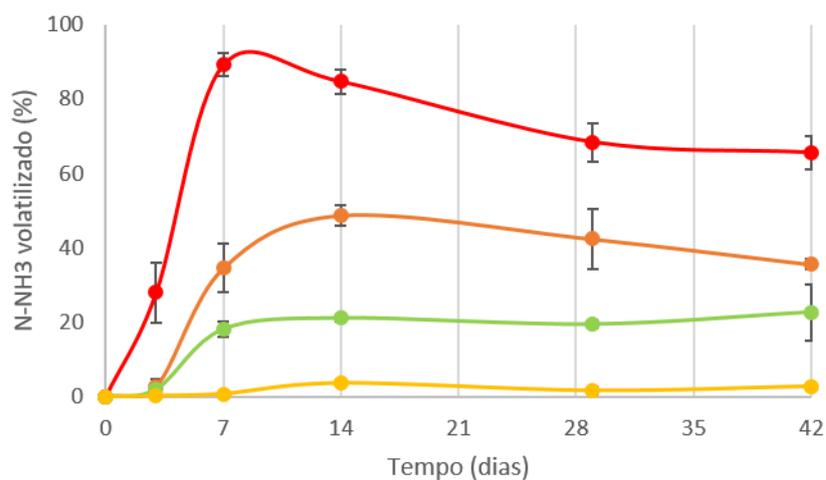
As fotos foram tiradas nos dias estabelecidos para retirar o ensaio, e não houve o aparecimento visível ao olho nu de crescimento em todos os tratamentos, sendo assim representados apenas alguns ensaios. Mas vale ressaltar que em todos os tratamentos houve crescimento, que pôde ser corroborado pelas quantificações realizadas. Logo, os micro-organismos se mostraram adaptáveis às condições estabelecidas.

### 5.3.2 Quantificação de N mineralizado com presença de micro-organismos

A Fig. 5.16 (a) mostra o teor de volatilização dos gases da amônia ( $\text{NH}_3$ ) realizado com a presença do fungo *Trichoderma Harzianum* e (b) da bactéria *Acidovorax Citrulli*. A ureia volatilizou aproximadamente 90% em apenas 7 dias, processo que foi acelerado devido a presença de micro-organismos no ensaio. O pico observado nos ensaios com *T. harzianum* em 7 dias indica que outros processos de

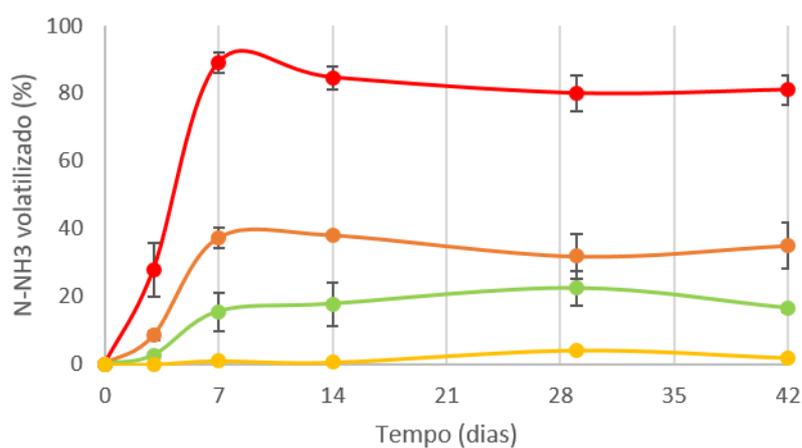
remineralização podem estar ocorrendo, fazendo com que o equilíbrio entre o  $\text{NH}_3$  emitido e o líquido varie ao longo do tempo (ou seja, parte da emissão seja recapturada pela ação continuada do micro-organismo). Ainda que não esteja clara a razão desta variação, é importante notar que os micro-organismos podem emitir outros voláteis que, interagindo na solução *trap* ( $\text{H}_2\text{BO}_3$ ), podem deslocar o equilíbrio levando à liberação do  $\text{NH}_3$  anteriormente capturado. Já no *A. citruli*, a quantidade emitida após 7 dias permanece aproximadamente constante, como esperado. A ureia possui alta solubilidade e conseqüentemente rápida hidrólise. Quando testada em sistemas com solo, sem a adição de outros micro-organismos, ela atinge cerca de 50% em 14 dias de incubação [5].

a) Teor de N-NH<sub>3</sub> (*Trichoderma Harzianum*)



● Urea ● TPS:Ur:Mel 2:1 ● TPS:Ur:Mel 1:2 ● Melamina

b) Teor N-NH<sub>3</sub> (*Acidovorax Citrulli*)



● Urea ● TPS:Ur:Mel 2:1 ● TPS:Ur:Mel 1:2 ● Melamina

FIGURA 5.16: Teor de volatilização de gases de amônia para presença do fungo a) *Trichoderma Harzianum*, e da bactéria b) *Acidovorax Citrulli*

O TPS:Ur:Mel 2:1 volatilizou 48% em 14 dias Fig. 5.16(a) e 38% em 7 dias Fig. 5.16(b). O tratamento com a bactéria *Acidovorax Citrulli* atingiu sua maior porcentagem em menos tempo que o fungo *Trichoderma Harzianum*. O TPS:Ur:Mel 1:2 apresentou o mesmo teor de volatilização para o fungo e para a bactéria, atingindo aproximadamente 20% em 14 dias. A maior volatilização do composto TPS:Ur:Mel 2:1 pode ser atribuído a maior quantidade de ureia na sua composição. Vale ressaltar que esse ensaio foi realizado em um sistema de alto estresse com a presença de micro-organismos com concentração de  $1.10^7$  células/mL o que acelerou o processo de volatilização.

Os teores de N mineral disponíveis no solo como amônio ( $\text{NH}_4$ ) são apresentados na Figura 5.17.

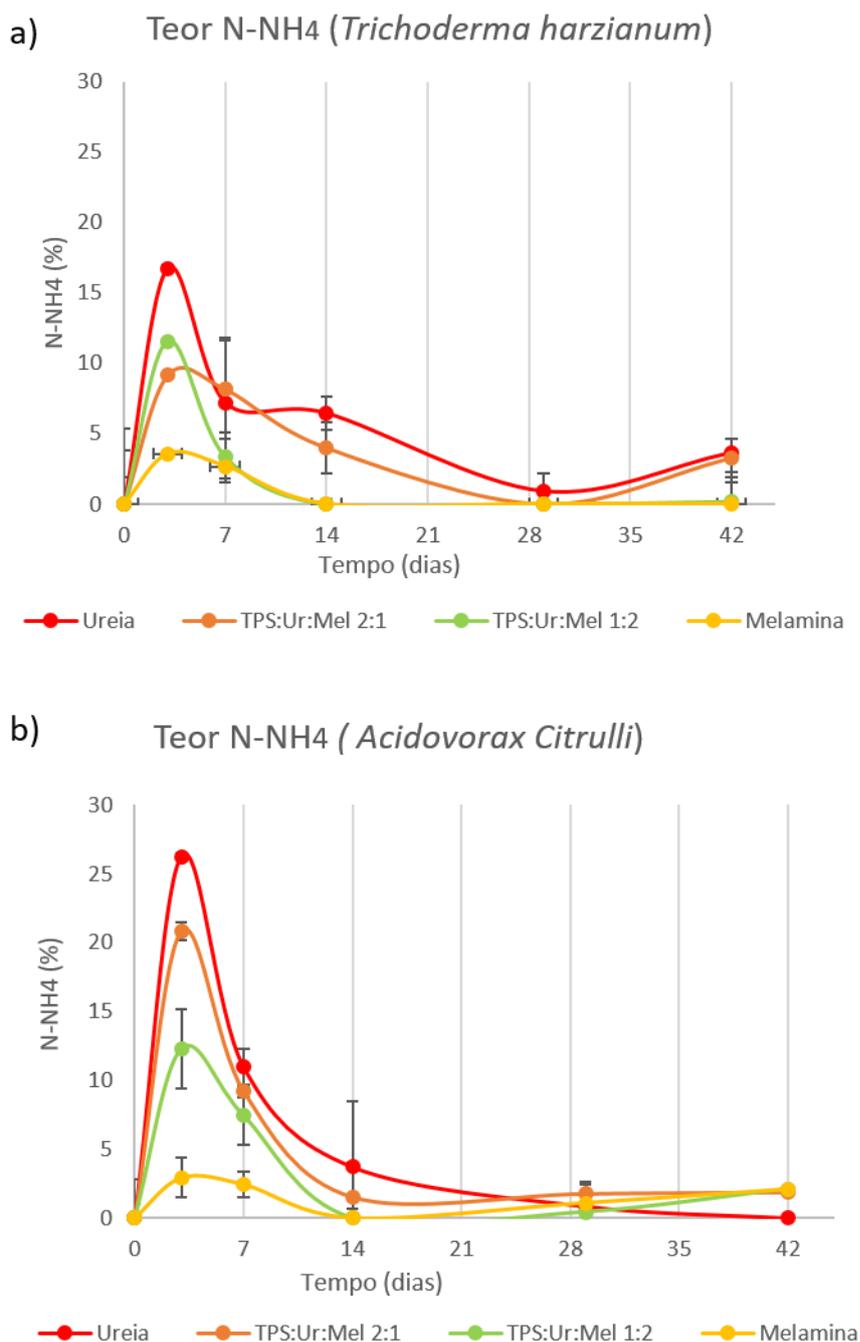


FIGURA 5.17: Teor de amônio presente no solo a) *Trichoderma Harzianum* b) *Acidovorax Citrulli*

Ao avaliar o amônio presente, vale ressaltar que por ter se utilizado um solo sem nenhuma atividade biológica, ou seja, sem nenhuma atividade da urease proveniente do solo, todo o amônio presente é devido a atividade do *Trichoderma Harzianum* e da *Acidovorax Citrulli*.

São comparadas as porcentagens presentes de  $\text{NH}_4$  dos materiais precursores; ureia e melamina e dos compósitos; TPS:Ur:Mel 1:2 e TPS:Ur:Mel 2:1 frente à presença do fungo *Trichoderma Harzianum* (a) e da bactéria *Acidovorax Citrulli* (b). Novamente a ureia mostrou teores maiores devido a sua alta solubilização, atingindo 16% Fig.5.17(a) e 26% em 3 dias Fig.5.17(b). Após os 3 primeiros dias houve uma diminuição no valor devido ao aumento de  $\text{NH}_3$  como já observado na Fig.5.16. Para o compósito TPS:Ur:Mel 1:2 o máximo teor de amônio também foi em 3 dias, aproximadamente 11% para os dois tratamentos. Para o compósito TPS:Ur:Mel 2:1 os valores variam devido a mudança da atividade microbológica na presença da *Acidovorax Citrulli* o teor de amônio foi de 20% enquanto no tratamento com *Trichoderma Harzianum* foi de 9%. A bactéria *Acidovorax Citrulli* foi anteriormente estudada em associação com outras bactérias para degradar a melamina, e mostrou ser resistente e efetiva na atividade de degradação com compostos nitrogenados o que explica a maior degradação dos compósitos frente a bactéria.[31,32]

Os extratos também foram analisados para quantificação de nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) e estão apresentados na Figura 5.18.

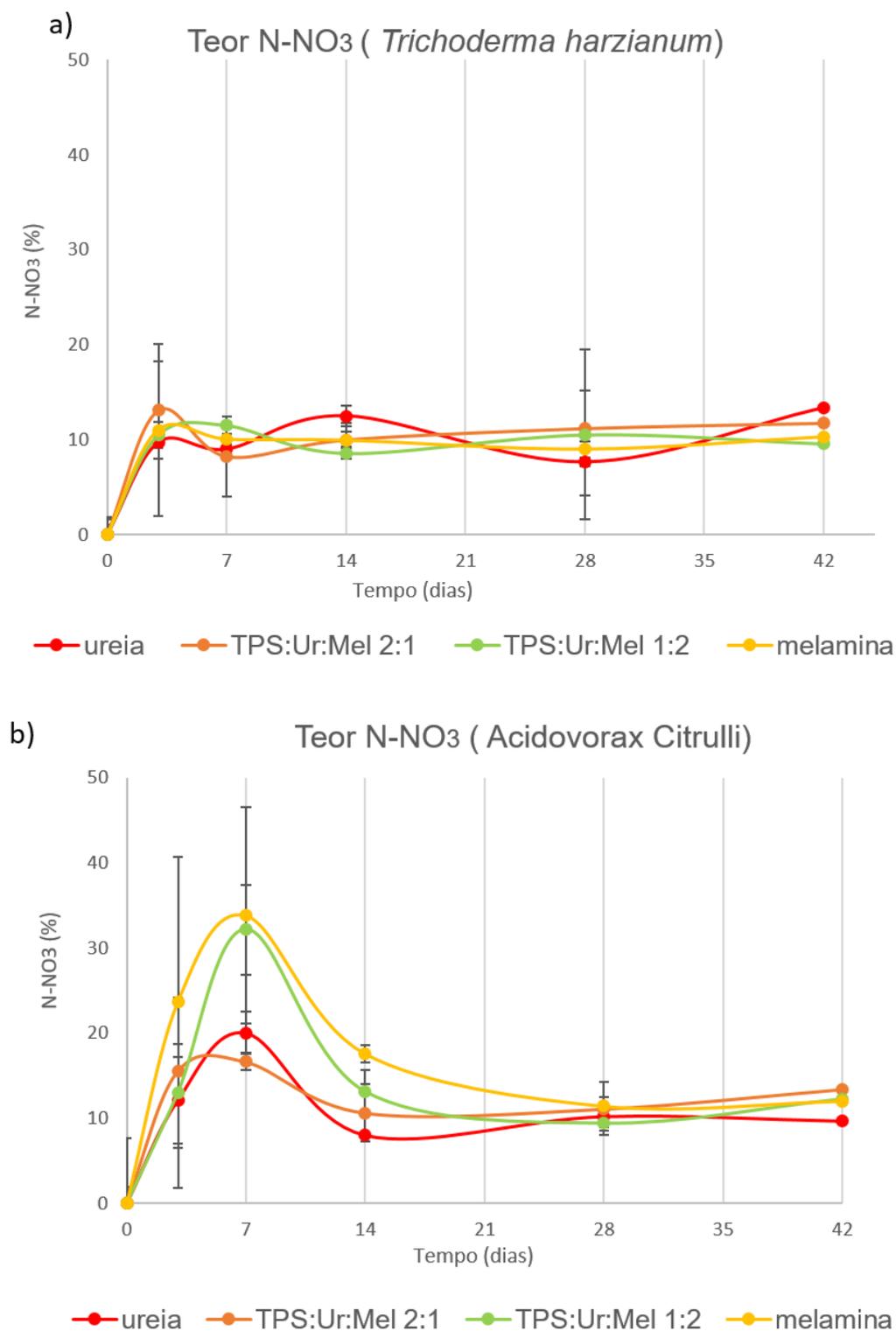


FIGURA 5.18: Teor de nitrato presente no substrato com a) *Trichoderma Harzianum*  
b) *Acidovorax Citrulli*.

A ureia com a presença do *Trichoderma harzianum* teve seu teor máximo em 14 dias com 12% de nitrato presente, comparativamente na Fig.5.16, o teor de amônio atingiu o máximo em 3 dias. A conversão em nitrato apresentou 10% enquanto que em 14 dias para amônio ainda na Fig.5.16 houve um decréscimo e consequentemente um maior teor de nitrato. Para o tratamento com a *Acidovorax Citrulli* seu máximo foi de 20% em 7 dias, mostrando uma melhor atividade microbiológica dessa bactéria para produção de nitrato. O compósito TPS:Ur:Mel 2:1 apresentou 13% de teor de nitrato em 3 dias, Fig.5.18a e cerca de 15% frente a *Acidovorax Citrulli*, Fig. 5.18b. Já o compósito TPS:Ur:Mel 1:2 mostrou teores elevados frente a *Acidovorax Citrulli* atingindo 30% em 7 dias e frente o *Trichoderma harzianum* 12% no mesmo período de tempo. A melamina usada isoladamente teve teor de 11% em 3 dias para *Trichoderma Harzianum*, enquanto para a presença da *Acidovorax Citrulli* teve teor de 35% em 7 dias. O alto teor de nitrato presente no tratamento da melamina com a presença da bactéria deve-se ao fato de que o compósito TPS:Ur:Mel 1:2 apresenta maior concentração de melamina em sua composição. Vale ressaltar também que a produção de amônio alcaliniza o meio o que é uma condição favorável para a bactéria *Acidovorax Citrulli*.

## 6. Conclusões

Os compósitos armazenados mostraram estabilidade em suas estruturas. O processo de extrusão para síntese dos compósitos foi eficiente para a polimerização, que levou a uma interação forte entre a melamina, a ureia e o amido.

Quando avaliada a dissolução de ureia em variações de pH, os compósitos mostraram menor teor de solubilidade quando comparados com a ureia pura, o que indica que estes compósitos fertilizantes mostraram um comportamento de liberação prolongada.

Ao analisar o comportamento com adição de micro-organismos, foi possível notar que a volatilização dos gases de amônia tiveram altos teores devido às condições extremas do ensaio. A atividade microbiológica aqui analisada é um potencial fator para a melhor compreensão da biodegradação da melamina presente nesses compósitos. A melamina usada isoladamente, embora não tenha mostrado altos teores de volatilização, não causou nenhum efeito quanto ao crescimento desses micro-organismos.

Para o teor de amônio presente na incubação dos materiais, foi notável a diferença entre a atividade do fungo *Trichoderma Harzianum* e da bactéria *Acidovorax Citrulli*. A bactéria apresentou maior porcentagem de amônio para a ureia pura e o compósito com maior teor de ureia, TPS:Ur:Mel 2:1, possivelmente devido a maior atividade da enzima urease.

A quantificação de nitrato presente indicou a maior diferença entre o fungo e a bactéria. O tratamento com a melamina e presença da *Acidovorax Citrulli* teve maior teor de nitrato presente do que todos os outros tratamentos. Essa bactéria já havia sido estudada em um consórcio de micro-organismos para biodegradação da melamina, porém não tinham sido identificados até o momento estudos usando-a isoladamente frente à melamina. Sendo assim, tais ensaios mostram um potencial para que se explore a *Acidovorax Citrulli* em meio com a melamina, para a compreensão.

Todos os ensaios conduzidos foram comparados com outros estudos realizados para os mesmos compósitos. Essa comparação foi de suma importância devido ao fato de neste presente estudo a presença de micro-organismos foi controlada, conhecida e quantificada previamente.

A melamina presente no compósito TPS:Ur:Mel 1:2 levou a uma menor porcentagem de liberação de ureia. Tais valores mostram uma forte interação nesses compósitos indicando benefícios na adição da melamina. Quando avaliado o teor de nitrato nos ensaios, a *Acidovorax Citrulli* mostrou um maior atividade para a melamina e o compósito TPS:Ur:Mel 1:2.

Todos os resultados ajudaram a avaliar o comportamento dos micro-organismos em relação a melamina. Destaca-se que a bactéria *Acidovorax Citrulli* mostrou resultados promissores que devem ainda ser mais explorados para melhor entendimento.

## 7. Sugestões para trabalhos futuros

Com base nos resultados obtidos e com o intuito de avaliar melhor o papel da melamina, estudos posteriores sugeridos são:

- a) Explorar diferentes teores de melamina presente em compósitos e usada isoladamente a fim de entender o comportamento dos micro-organismos em diferentes concentrações.
- b) Avaliar mais a fundo os mecanismos e atividades dos micro-organismos como por exemplo:
  - Fazer um ensaio de viabilidade de células após o período de incubação analisando tempos diferentes.
  - Caracterizar a biomassa produzida pelos micro-organismos
  - Realizar um mapeamento das secreções produzidos devido a atividade microbiológica.
- c) Estudo aprofundado da bactéria *Acidovorax Citrulli*, que mostrou um comportamento promissor frente a melamina usada isoladamente.
- d) Testes em campos para comparar resultados obtidos experimentalmente.

## 8. Referências

- [1] Rapid delivery systems for future food security, 2057 (n.d.). <https://doi.org/10.1038/s41587-021-01079-z>.
- [2] C. Rosenzweig, J. Elliott, D. Deryng, A.C. Ruane, C. Müller, A. Arneth, K.J. Boote, C. Folberth, M. Glotter, N. Khabarov, K. Neumann, F. Piontek, T.A.M. Pugh, E. Schmid, E. Stehfest, H. Yang, J.W. Jones, Assessing agricultural risks of climate change in the 21st century in a global gridded crop model intercomparison, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 111 (2014) 3268–3273. <https://doi.org/10.1073/pnas.1222463110>.
- [3] C.S. Snyder, T.W. Bruulsema, T.L. Jensen, P.E. Fixen, *Agriculture, Ecosystems and Environment* Review of greenhouse gas emissions from crop production systems and fertilizer management effects, 133 (2009) 247–266. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2009.04.021>.
- [4] X. Zhang, A plan for efficient use of nitrogen fertilizers, *News Views Nat.* 543 (2017) 322–323.
- [5] A.S. Giroto, G.G. Guimarães, L.A. Colnago, A. Klamczynski, G. Glenn, C. Ribeiro, Controlled release of nitrogen using urea-melamine-starch composites, *J. Clean. Prod.* 217 (2019) 448–455. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2019.01.275>.
- [6] A. FINK, *agrisexport*, (1992) 632.
- [7] A.J. Bloom, The increasing importance of distinguishing among plant nitrogen sources, *Curr. Opin. Plant Biol.* 25 (2015) 10–16. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2015.03.002>.
- [8] R.F. Follett, Chapter 2 . Transformation and Transport Processes of Nitrogen in Agricultural Systems, *Nitrogen Environ. Sources, Probl. Manag.* J.L. Hatf. R.F. Follett © 2008 Elsevier Inc. All Rights Reserv. (2008) 19–50.
- [9] Secretaria Especial de projetos estratégicos, Produção nacional de fertilizantes, [Www.Gov.Br/Planalto/Pt-Br/Assuntos/Assuntos-Estrategicos](http://Www.Gov.Br/Planalto/Pt-Br/Assuntos/Assuntos-Estrategicos). ET/DPE 01/ (n.d.).
- [10] S. Saggari, J. Singh, D.L. Giltrap, M. Zaman, J. Luo, M. Rollo, D.G. Kim, G. Rys, T.J. van der Weerden, Quantification of reductions in ammonia emissions from

- fertiliser urea and animal urine in grazed pastures with urease inhibitors for agriculture inventory: New Zealand as a case study, *Sci. Total Environ.* 465 (2013) 136–146. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2012.07.088>.
- [11] P. Cartes, A.A. Jara, R. Demanet, M. de la L. Mora, Efecto de la temperatura y dosis de fertilización con urea sobre la actividad ureasa y cinética de mineralización de nitrógeno en Andisoles del Sur de Chile, *Rev. La Cienc. Del Suelo y Nutr. Veg.* 9 (2009) 69–82. <https://doi.org/10.4067/S0718-27912009000100006>.
- [12] M.E. Trenkel, *Slow- and Controlled-Release and Stabilized Fertilizers: An Option for Enhancing Nutrient Use Efficiency in Agriculture*, 2nd ed., Paris, France, 2010.
- [13] Boletim técnico nº 4, (n.d.) 1–70.
- [14] A. Shaviv, R.L. Mikkelsen, Controlled-release fertilizers to increase efficiency of nutrient use and minimize environmental degradation - A review, *Fertil. Res.* 35 (1993) 1–12. <https://doi.org/10.1007/BF00750215>.
- [15] A. Shaviv, *Advances in Controlled Release of Fertilizers* 71, before printing., *Adv. Agron.* 71 (2001) 1–49. <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0065211301710115>.
- [16] B. Zhao, S. Dong, J. Zhang, P. Liu, Effects of Controlled-Release Fertiliser on Nitrogen Use Efficiency in Summer Maize, *PLoS One.* 8 (2013) 1–8. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0070569>.
- [17] N. Madusanka, C. Sandaruwan, N. Kottegoda, D. Sirisena, I. Munaweera, A. De Alwis, V. Karunaratne, G.A.J. Amaratunga, Urea–hydroxyapatite–montmorillonite nanohybrid composites as slow release nitrogen compositions, *Appl. Clay Sci.* 150 (2017) 303–308. <https://doi.org/10.1016/j.clay.2017.09.039>.
- [18] E.I. Pereira, A.R.A. Nogueira, C.C.T. Cruz, G.G.F. Guimarães, M.M. Foschini, A.C.C. Bernardi, C. Ribeiro, Controlled Urea Release Employing Nanocomposites Increases the Efficiency of Nitrogen Use by Forage, *ACS Sustain. Chem. Eng.* 5 (2017) 9993–10001. <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.7b01919>.
- [19] B. Ni, M. Liu, S. Lü, Multifunctional slow-release urea fertilizer from ethylcellulose and superabsorbent coated formulations, *Chem. Eng. J.* 155 (2009) 892–898. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2009.08.025>.

- [20] A.S. Giroto, R.H.S. Garcia, L.A. Colnago, A. Klamczynski, G.M. Glenn, C. Ribeiro, Role of urea and melamine as synergic co-plasticizers for starch composites for fertilizer application, *Int. J. Biol. Macromol.* 144 (2020) 143–150. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.12.094>.
- [21] V.F. Majaron, M.G. da Silva, R. Bortoletto-Santos, R. Klaic, A. Giroto, G.G.F. Guimarães, W.L. Polito, C.S. Farinas, C. Ribeiro, Synergy between castor oil polyurethane/starch polymer coating and local acidification by *A. niger* for increasing the efficiency of nitrogen fertilization using urea granules, *Ind. Crops Prod.* 154 (2020) 112717. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2020.112717>.
- [22] N. Watanabe, J.A. Lewis, G.C. Papavizas, Influence of Nitrogen Fertilizers on Growth, Spore Production and Germination, and Biocontrol Potential of *Trichoderma* and *Gliocladium*, *J. Phytopathol.* 120 (1987) 337–346. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0434.1987.tb00497.x>.
- [23] and Y.-G.Y. Lei Zhang, Jian Zhang, Zhao-Ji Li, Jian-Kai Cheng, Pei-Xiu Yin, New Coordination Motifs of Melamine Directed by N–H,,,X.pdf, (2007) 5838–5840. <https://doi.org/https://doi.org/10.1021/ic7005138>.
- [24] Y. Tyan, M. Yang, S. Jong, Melamine contamination, *Anal Bioanal Chem/Springer-Verlag.* (2009) 729–735. <https://doi.org/10.1007/s00216-009-3009-0>.
- [25] L. Angeles, Research Rewind, *Nat. Med.* “News Brief.” 15 (2009) 6–7. <https://doi.org/https://doi-org.ez31.periodicos.capes.gov.br/10.1038/nm0109-6>.
- [26] R.F. SCHOLL W, DAVIS ROE, BROWN EE, Melamine of Possible Plant Food Value, *Ind Eng. Chem.* (1937) 202–205. <https://doi.org/10.1021/ie50326a021>.
- [27] K. Donald E. Freepons, Wash., FERTILIZER PROCESSES AND COMPOST ONS USINGS-TRAZINES, United States Pat. 552,024 (1985).
- [28] R.D.H. And, H.F. STEPHENSON, Nitrification of Triazine Nitrogen, *Fertil. N I T R O G E N SOURCES.* (1964) 147–151.
- [29] K. Jutzi, A.M. Cook, R. Hutter, The degradative pathway of the s-triazine melamine, (1982) 679–684.
- [30] A.M. Cook, R. Hutter, s-Triazines as Nitrogen Sources for Bacteria, *J. Agrlc. Food Chem.* (1981) 1135–1143.
- [31] K. Takagi, K. Fujii, K.I. Yamazaki, N. Harada, A. Iwasaki, Biodegradation of melamine and its hydroxy derivatives by a bacterial consortium containing a

- novel *Nocardioides* species, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 94 (2012) 1647–1656. <https://doi.org/10.1007/s00253-011-3673-9>.
- [32] T. Hatakeyama, K. Takagi, Bacterial biodegradation of melamine-contaminated aged soil: influence of different pre-culture media or addition of activation material, *Environ. Sci. Pollut. Res.* 23 (2016) 14997–15002. <https://doi.org/10.1007/s11356-016-6616-2>.
- [33] D.R. Shelton, J.S. Karns, G.W.M.C. Carty, D.O.N.R. Durham, Metabolism of Melamine by *Klebsiella terrigena*, *Appl. Environ. Microbiol. - Am. Soc. Microbiol.* 63 (1997) 2832–2835.
- [34] A.M. Cook, P. Beilstein, H. Grossenbacher, R. Hotter, Ring cleavage and degradative pathway of cyanuric acid in bacteria, *Biochem. J.* 231 (1985) 25–30.
- [35] N.W. Schaad, E. Postnikova, A. Sechler, L.E. Claflin, A.K. Vidaver, J.B. Jones, I. Agarkova, A. Ignatov, E. Dickstein, B.A. Ramundo, Reclassification of subspecies of *Acidovorax avenae* as *A. Avenae* (Manns 1905) emend., *A. cattleyae* (Pavarino, 1911) comb. nov., *A. citrulli* Schaad et al., 1978) comb. nov., and proposal of *A. oryzae* sp. nov., *Syst. Appl. Microbiol.* 31 (2008) 434–446. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2008.09.003>.
- [36] A.S. dos A.M. Luciano de Aquino Melo, Alexandre Peron Mendes, Joalice Pereira dos Santos, Mancha aquosa do melão causada por *Acidovorax Avenae* subs *Citrulli*: caracterização de isolados, Embrapa re, Boletim de Pesquisa 14 e Desenvolvimento Boletim de Pesquisa, Brasília, 2004.
- [37] T.N. BURBRIDGE, C.H. HINE, A.F. SCHICK, A simple spectrophotometric method for the determination of acetaldehyde in blood., *J. Lab. Clin. Med.* 35 (1950) 983–987.
- [38] Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically ; Approved Standard — Ninth Edition, 2012.
- [39] A.J. Kempers, A. Zweers, Communications in Soil Science and Plant Analysis Ammonium determination in soil extracts by the salicylate method, (n.d.) 37–41.
- [40] J.E. Yang, E.O. Skogley, B.E. Schaff, J.J. Kirn, A Simple Spectrophotometric Determination of Nitrate in Water, Resin, and Soil Extracts, (1990).
- [41] M. Mitrus, L. Mościcki, Thermoplastic Starch, *Extrus. Tech. Appl. Theory Sustain.* (2011) 177–189. <https://doi.org/10.1002/9783527634088.ch14>.
- [42] Y. Zuo, J. Gu, H. Tan, Y. Zhang, Thermoplastic starch prepared with different

- plasticizers: Relation between degree of plasticization and properties, *J. Wuhan Univ. Technol. Mater. Sci. Ed.* 30 (2015) 423–428. <https://doi.org/10.1007/s11595-015-1164-z>.
- [43] J.J.G. Van Soest, J.F.G. Vliegthart, Crystallinity in starch plastics: Consequences for material properties, *Trends Biotechnol.* 15 (1997) 208–213. [https://doi.org/10.1016/S0167-7799\(97\)01021-4](https://doi.org/10.1016/S0167-7799(97)01021-4).
- [44] O. Sevenou, S.E. Hill, I.A. Farhat, J.R. Mitchell, Organisation of the external region of the starch granule as determined by infrared spectroscopy, *Int. J. Biol. Macromol.* 31 (2002) 79–85. [https://doi.org/10.1016/S0141-8130\(02\)00067-3](https://doi.org/10.1016/S0141-8130(02)00067-3).
- [45] I. Capron, P. Robert, P. Colonna, M. Brogly, V. Planchot, Starch in rubbery and glassy states by FTIR spectroscopy, *Carbohydr. Polym.* 68 (2007) 249–259. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2006.12.015>.
- [46] F.J. Warren, M.J. Gidley, B.M. Flanagan, Infrared spectroscopy as a tool to characterise starch ordered structure - A joint FTIR-ATR, NMR, XRD and DSC study, *Carbohydr. Polym.* 139 (2016) 35–42. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.11.066>.
- [47] Z. Wang, P. Lv, Y. Hu, K. Hu, Thermal degradation study of intumescent flame retardants by TG and FTIR: Melamine phosphate and its mixture with pentaerythritol, *J. Anal. Appl. Pyrolysis.* 86 (2009) 207–214. <https://doi.org/10.1016/j.jaap.2009.06.007>.
- [48] N.M. Pettit, A.R.J. Smith, R.B. Freedman, R.G. Burns, Soil urease: Activity, stability and kinetic properties, *Soil Biol. Biochem.* 8 (1976) 479–484. [https://doi.org/10.1016/0038-0717\(76\)90089-4](https://doi.org/10.1016/0038-0717(76)90089-4).
- [49] R.P. Chapman, P.R. Averell, R.R. Harris, Solubility of Melamine in Water, (1943) 5–6. <https://doi.org/10.1021/ie50398a003>.