

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA

ÁREA DE CONCENTRAÇÃO

CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE MATERIAIS

**ESTUDO DA BIODEGRADAÇÃO DA BLENDA POLI (ϵ -CAPROLACTONA)/ AMIDO MODIFICADO/PROTEÍNA ISOLADA DE SOJA EM DIFERENTES SOLOS:
CARACTERIZAÇÃO DOS PRODUTOS FORMADOS E AVALIAÇÃO DA
TOXICIDADE**

Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Engenharia Química como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Doutor em Engenharia Química.

Autora: Pilar Drummond Sampaio Corrêa Mariani

Orientadora: Profa. Dra. Lucia Helena Innocentini Mei

Co-Orientadora: Profa. Dra. Elke Jurandy Bran Nogueira Cardoso

Campinas – São Paulo

Fevereiro/2010

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA ÁREA DE ENGENHARIA E ARQUITETURA - BAE - UNICAMP

M337e	<p>Mariani, Pilar Drummond Sampaio Corrêa Estudo da biodegradação da blenda poli (e-caprolactona)/amido modificado/proteína isolada de soja em diferentes solos: caracterização dos produtos formados e avaliação da toxicidade / Pilar Drummond Sampaio Corrêa Mariani. --Campinas, SP: [s.n.], 2010.</p> <p>Orientadores: Lucia Helena Innocentini Mei, Elke Jurandy Bran Nogueira Cardoso. Tese de Doutorado - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química.</p> <p>1. Biodegradação. 2. Polímeros - Biodegradação. 3. Solos. 4. Amido. 5. Proteína Isolada de Soja. I. Mei, Lucia Helena Innocentini. II. Cardoso, Elke Jurandy Bran Nogueira. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia Química. IV. Título.</p>
-------	---

Título em Inglês: Study of biodegradation of poly (e-caprolactone) / modified starch / soy protein isolate in different soils: characterization of products formed and toxicity evaluation

Palavras-chave em Inglês: Biodegradation, Polymers biodegradation, Soil, Starch, Soy protein isolate

Área de concentração: Ciência e Tecnologia de Materiais

Titulação: Doutor em Engenharia Química

Banca examinadora: Elisabete Frollini, Luiz Antonio Pessan, Sandra Gomes de Moraes, Karen Segala

Data da defesa: 24/02/2010

Programa de Pós Graduação: Engenharia Química

Tese de Doutorado defendida por Pilar Drummond Sampaio Corrêa Mariani e aprovada dia 24 de fevereiro de 2010 pela banca examinadora constituída pelos Doutores:

Profa. Dra. Lucia Helena Innocentini-Mei (Orientadora)

(DTP-FEQ/Unicamp)

Profa. Dra. Elisabete Frollini (Titular)

(IQ-USP/São Carlos)

Profa. Dra. Sandra Gomes de Moraes (Titular)

(Unimep)

Prof. Dr. Luiz Antonio Pessan (Titular)

(DEMa/UFSCAR)

Dra. Karen Segala (Titular)

(DTP-FEQ/Unicamp)

Este exemplar corresponde à versão final da Tese de Doutorado em Engenharia Química.



Profa. Dra. Lucia Helena Innocentini Mei

(DTP-FEQ/Unicamp)

À minha família, meu alicerce.

Aos meus dois amores Custódio, meu marido, e Beatriz, razão da minha vida.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

À professora Dra. Lucia Helena Innocentini Mei pela orientação, pelo incentivo, pela confiança depositada, pela atenção e principalmente pela consideração e amizade.

À professora Dra. Elke Jurandy Bran Nogueira Cardoso pela co-orientação, pela consideração e amizade.

À Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz – USP, na pessoa de Profa. Dra. Elke Jurandy Bran Nogueira Cardoso, por conceder espaço de seu laboratório para a realização de parte deste trabalho.

Ao Instituto de Química - UNICAMP, na pessoa de Prof. Dr. Marco Aurélio De Paoli, por conceder o espaço de seu laboratório de processamento para a realização de parte desse trabalho.

À técnica do laboratório de processamento do Instituto de Química, Lea, pela paciência e colaboração nas etapas de extrusão, inúmeras tentativas de injeção e ensaios mecânicos dos materiais.

Aos técnicos, secretárias e amigos do DTP, LUC: Disney, Maria Teresa, Kelly, Andréa e Fernando (GPC) pela colaboração na realização das análises.

Aos técnicos, estagiários e amigos do Laboratório de Microbiologia do Solo do Departamento de Ciência do Solo - ESALQ/USP: Denise de Lourdes Colombo Mescolotti, Luis Fernando Baldesin, Júlia, Leandro, Henrique, Priscila, Simone, André, Alexandre, Alessandra, Mylenne,

Marina, Carlão, Dilmar, Carol pelo auxílio na realização dos experimentos, coletas de solos e acima de tudo pela atenção e amizade.

Ao Rafael Vasconcellos pela ajuda na realização das análises estatísticas.

À técnica do Laboratório de Análises de Sementes do Departamento de Produção Vegetal-ESALQ/USP Helena Pescarim Chamma pelo auxílio na realização das análises de crescimento vegetal.

À profa. Dra. Sandra Gomes de Moraes (UNIMEP) pela ajuda na realização da análise de cromatografia gasosa.

Ao Prof. Dr. Jairo Antônio Mazza (Departamento de Ciência do Solo/ESALQ-USP) pelo auxílio na determinação dos solos a serem utilizados.

A Union Carbide do Brasil pelo fornecimento da Poli (ϵ -caprolactona) e a Corn products do Brasil pelo suprimento do amido utilizado neste trabalho.

Aos meus amigos e companheiros de grupo Maria Trindade, Maria Gabriela N. Campos, André Giraldi, Gustavo Spina, Cleber, Thiago, Giovana, Katlen, Fabiana, Patrícia obrigada pela amizade e companheirismo.

As amigas de estrada Kayna Agostini e Patrícia Moraes pelo companheirismo, amizade e pelos bate-papos que tornaram as viagens mais curtas.

Ao meu irmão Vitor que me ajudou muito no desenvolvimento deste trabalho, principalmente nos momentos difíceis da minha vida.

Ao meu marido Custódio que sempre me apoiou e incentivou com muito amor, carinho, paciência e compreensão.

Aos meus pais Otávio e Marta, meus exemplos de vida, e aos meus irmãos Vitor e Hermano pelo apoio, incentivo e, principalmente, pelo amor e carinho em todas as horas.

À minha grande obra, Beatriz, razão da minha vida.

Ao CNPq pelo apoio financeiro a esta pesquisa.

Ao Departamento de Tecnologia de Materiais/FEQ–UNICAMP por conceder-me a oportunidade da realização dos meus estudos.

A todas as pessoas que estiveram envolvidas diretamente e indiretamente, colaborando para a concretização deste trabalho.

A todos o meu muito obrigado.

SUMÁRIO

SUMÁRIO	IX
NOMENCLATURA E ABREVIACÕES	XI
ÍNDICE DE FIGURAS	XIII
ÍNDICE DE TABELAS	XVI
RESUMO	17
ABSTRACT	18
CAPÍTULO 1 – INTRODUÇÃO E OBJETIVOS	19
1.1 - INTRODUÇÃO	19
1.2 – OBJETIVOS	20
CAPÍTULO 2 – ESTADO DA ARTE E REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	21
2.1 - ESTADO DA ARTE	21
2.2 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	24
2.2.1 -PLÁSTICOS AMBIENTALMENTE DEGRADÁVEIS (PADs)	24
2.2.1.1 - <i>Classificação dos PADs</i>	25
2.2.1.2 - <i>Mecanismos de degradação dos PADs</i>	27
2.2.2 – BIODEGRADAÇÃO	30
2.2.2.1 - <i>Fatores que podem afetar a biodegradação de polímeros</i>	32
2.2.2.2 - <i>Biodegradação dos polímeros em solo</i>	33
2.2.3 - O SOLO	34
2.2.3.1 - <i>Fatores ambientais ativos</i>	35
2.2.3.2 - <i>Fatores subterrâneos</i>	35
2.2.4 - AVALIAÇÃO DA BIODEGRADAÇÃO: BALANÇO ENTRE LIBERAÇÃO DE CO ₂ /CONSUMO DE O ₂ E BIOMASSA MICROBIANA	37
2.2.5 - BIODEGRADAÇÃO DE POLIÉSTERES	39
2.2.6 - BLENDAS POLIMÉRICAS BIODEGRADÁVEIS	39
2.2.6.1 - <i>Poli (ε-caprolactona) / Amido</i>	41
2.2.6.2 - <i>Blendas Biodegradáveis à base de proteína isolada de soja</i>	43
2.2.7 - INTERAÇÃO PADs X AMBIENTE: EFEITOS ECOTOXICOLÓGICOS NO PROCESSO DE BIODEGRADAÇÃO	44
CAPÍTULO 3 – MATERIAIS E MÉTODOS	46
3.1 – MATERIAIS	46
3.2 - COMPOSIÇÃO E PREPARAÇÃO DAS BLENDAS	47
3.3 – PROCESSAMENTO	47
3.4 - CARACTERIZAÇÃO DAS FORMULAÇÕES	48
3.4.1 - ANÁLISE ELEMENTAR	48
3.4.2 - CALORIMETRIA EXPLORATÓRIA DIFERENCIAL (DSC)	48
3.4.3 - ANÁLISE TERMOGRAVIMÉTRICA (TGA)	49
3.4.4 - MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)	49

3.4.5 - ENSAIOS MECÂNICOS.....	49
3.4.6 - CROMATOGRAFIA DE PERMEAÇÃO EM GEL (GPC)	50
3.5 - BIODEGRADAÇÃO EM SOLO.....	50
3.5.1 – RESPIROMETRIA	53
3.5.2 - DETERMINAÇÃO DO CARBONO DA BIOMASSA MICROBIANA (CBM)	54
3.5.3 - IDENTIFICAÇÃO DOS MICRORGANISMOS DEGRADADORES	55
3.5.4 - EXTRAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DOS PRODUTOS DA DEGRADAÇÃO.....	56
3.6 – AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE.....	56
3.6.1 - TESTE DE GERMINAÇÃO.....	56
3.6.2 - MASSA SECA DA PARTE AÉREA.....	57
3.7 - ANÁLISE ESTATÍSTICA	57
CAPÍTULO 4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	58
4.1 - CARACTERIZAÇÃO DAS FORMULAÇÕES.....	58
4.1.1 - ANÁLISE ELEMENTAR	58
4.1.2 - CROMATOGRAFIA DE PERMEAÇÃO EM GEL (GPC)	59
4.1.3 - CALORIMETRIA DIFERENCIAL EXPLORATÓRIA (DSC)	60
4.1.4 - ANÁLISE TERMOGRAVIMÉTRICA (TGA).....	61
4.1.5 - MORFOLOGIA.....	63
4.1.6 - PROPRIEDADES MECÂNICAS	66
4.2 - BIODEGRADAÇÃO EM SOLO – FASE I.....	67
4.2.1 - C BIOMASSA MICROBIANA – FASE I	74
4.2.2 - MASSA MOLECULAR MÉDIA.....	77
4.2.3 - MORFOLOGIA.....	81
4.2.4 - MICRORGANISMOS ISOLADOS DOS MATERIAIS INCUBADOS	86
4.2.5 - IDENTIFICAÇÃO DOS PRODUTOS INTERMEDIÁRIOS	87
4.2.6 - TESTE DE TOXICIDADE.....	94
4.3 - BIODEGRADAÇÃO EM SOLO – FASE II.....	96
4.3.1 - C BIOMASSA MICROBIANA – FASE II	99
CAPÍTULO 5 - CONCLUSÕES.....	102
CAPÍTULO 6 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	103
ANEXO I	111
ANEXO II	116
ANEXO III.....	118
ANEXO IV	120

NOMENCLATURA E ABREVIASÕES

Símbolo	Descrição	Unidade
ΔH_m	Entalpia de fusão	$J\text{g}^{-1}$
ASTM	Sociedade Americana de Testes e Materiais	**
BDA	Batata Dextrose Ágar	**
C/N	Carbono/Nitrogênio	**
CBM	Carbono da Biomassa Microbiana	$(\mu\text{gC.g}^{-1}\text{solo})$
CEN	Comitê Europeu de Normas	**
C_f	Carbono extraído das amostras fumigada	μg
C_{nf}	Carbono extraído das amostras não fumigadas	μg
DSC	Calorimetria Exploratória Diferencial	**
DSC	Calorimetria Exploratória Diferencial	**
GPC	Cromatografia de Permeação em Gel	**
ISO	Organização Internacional de Padronização	**
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura	**
MO	Matéria Orgânica	**
M_pCO_2	Massa de dióxido de carbono produzido	mg
M_tCO_2	Massa de dióxido de carbono total teórico	mg
PADs	Polímeros ou plásticos ambientalmente degradáveis	**
PCL	Poli (ϵ -caprolactona)	**
PE	Polietileno	**
PHAs	Poli (hidroxi alcanoato)	**
PHB	Poli (hidroxi butirato)	**
PLA	Poli (ácido lático)	**
PIS	Proteína Isolada de Soja	**
PP	Polipropileno	**
SB	Soma de bases	**
T	Capacidade de troca catiônica (CTC)	**
TGA	Análise Termogravimétrica	**

THF	Tetrahidrofurano	**
Tm	Temperatura de fusão	°C
UV	Ultravioleta	**
V	Saturação de bases	**
W	Fração mássica	%
Xc	Grau de cristalinidade	%

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. Fórmula estrutural do Poli (ϵ - caprolactona).....	21
FIGURA 2. Segmentação do mercado de polímeros no Brasil (fonte: pradella, 2006).....	24
FIGURA 3. Degradação de Polisopreno por fotólise (a) e por ozonólise (b)	29
FIGURA 4. Reação de hidrólise de um poliéster.....	29
FIGURA 5. Reação aeróbia (a) e anaeróbia (b) da biodegradação de um polímero (Zee, 2005).	31
FIGURA 6. Exemplo do ciclo de biodegradação de materiais poliméricos (adaptado de lucas e col., 2008).....	32
FIGURA 7. Estrutura da amilose: unidades de glicose unidas por ligações glicosídicas α 1,4....	41
FIGURA 8. Estrutura da amilopectina: unidades de glicose unidas por ligações glicosídicas α 1,4 e com pontos de ramificação α 1,6	41
FIGURA 9. Comportamento térmico das formulações obtido por tga: (a) F1, (b) F2, (c) F3 e (d) F4.....	62
FIGURA 10. Micrografia da seção transversal da fratura da formulação F1, magnitude 500x....	63
FIGURA 11. Micrografia da seção transversal da fratura da formulação: F2, magnitude 500x...	64
FIGURA 12. Micrografia da seção transversal da fratura da formulação: F3, magnitude 500x...	64
FIGURA 13. Micrografia da seção transversal da fratura da formulação: F4, magnitude 500x...	65
FIGURA 14. Micrografia da seção transversal da fratura da formulação: F4, magnitude 1000x.	65
FIGURA 15. Comportamento das blendas F1, F2, F3 e F4 e da celulose incubadas por 180 dias no solo de textura arenosa com adição de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$	69
FIGURA 16. Comportamento das blendas F1, F2, F3 e F4 e da celulose incubadas por 180 dias no solo de textura arenosa sem adição de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$	69
FIGURA 17. Comportamento das blendas F1, F2, F3 e F4 e da celulose incubadas por 180 dias no solo de textura argilosa com adição de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$	70
FIGURA 18. Comportamento das blendas F1, F2, F3 e F4 e da celulose incubadas por 180 dias no solo de textura argilosa sem adição de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$	70
FIGURA 19. C biomassa microbiana durante a incubação das blendas no solo arenoso com adição de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$	75
FIGURA 20. C biomassa microbiana durante a incubação das blendas no solo arenoso sem adição de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$	75
FIGURA 21. C biomassa microbiana durante a incubação das blendas no solo argiloso com adição de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$	76
FIGURA 22. C biomassa microbiana durante a incubação das blendas no solo argiloso sem adição de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$	76
FIGURA 23. Micrografias obtidas por MEV das superfícies da F1 antes (a) e após 14 dias de incubação nos diferentes tratamentos: b) arenoso sem adição de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, c) arenoso com adição de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, d) argiloso sem adição de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, e) argiloso com adição de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$	82

FIGURA 24. Micrografias obtidas por MEV das superfícies da F2 antes (a) e após 14 dias de incubação nos diferentes tratamentos: b) arenoso sem adição de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, C) Arenoso com adição de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, D) Argiloso sem adição de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, E) Argiloso com adição de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$	84
FIGURA 25. Micrografias obtidas por MEV das superfícies da F3 antes (a) e após 14 dias de incubação nos diferentes tratamentos: B) Arenoso sem adição de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, C) Arenoso com adição de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, D) Argiloso sem adição de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, E) Argiloso com a adição de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$	85
FIGURA 26. Micrografias obtidas por MEV (aumento=1000x) das fraturas das formulações F1 e F3: A) F1- arenoso sem adição de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, B) F3 - arenoso sem adição de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$	86
FIGURA 27. Micrografias obtidas por MEV da superfície da formulação F3: A) F3 - argiloso com adição de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ (aumento=2000x), B) F3 – arenoso sem adição de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$	86
FIGURA 28. Colônias dos fungos isolados dos materiais incubados em solo: A) <i>Fusarium</i> sp. - 1, B) <i>Fusarium</i> sp. - 2, C) <i>Fusarium</i> sp. - 3, D) <i>Trichoderma</i> sp.	87
FIGURA 29. Cromatogramas dos materiais não incubados em solo: A) F1, B) F2 E C) F3.	89
FIGURA 30. Cromatogramas dos materiais incubados em solo de textura arenosa sem adição de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$: A) F1, B) F2 e C) F3.....	90
FIGURA 31. Cromatogramas dos materiais incubados em solo de textura arenosa com adição de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$: A) F1, B) F2 e C) F3.....	91
FIGURA 32. cromatogramas dos materiais incubados em solo de textura argilosa sem adição de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$: A) F1, B) F2 e C) F3.....	92
FIGURA 33. Cromatogramas dos materiais incubados em solo de textura argilosa com adição de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$: A) F1, B) F2 e C) F3.....	93
FIGURA 34. Teste de toxicidade realizado com os diferentes tratamentos após 180 dias de incubação: A) Solo argiloso e B) Solo arenoso.....	94
FIGURA 35. C Biomassa microbiana durante a incubação dos materiais F2 e F3 nos solos 1-5 sem adição de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$	100
FIGURA 36. C Biomassa microbiana durante a incubação dos materiais F2 e F3 nos solos 1-5 com adição de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$	100
FIGURA 37. Cromatograma da análise de cromatografia de permeação em gel para a amostra de PCL puro antes do processamento	111
FIGURA 38. Cromatograma da análise de cromatografia de permeação em gel para a amostra de PCL puro (F1) após o processamento	111
FIGURA 39. Cromatograma da análise de cromatografia de permeação em gel para a blenda de PCL/Amido (F2) após o processamento	112
FIGURA 40. Cromatograma da análise de cromatografia de permeação em gel para a blenda de PCL/Amido/PIS (F3) após o processamento	112
FIGURA 41. Cromatograma da análise de cromatografia de permeação em gel para a blenda de PCL/Amido/PIS (F4) após o processamento	113

FIGURA 42. Cromatograma da análise de cromatografia de permeação em gel para a amostra de PCL puro (F1) após 14 dias de incubação no solo arenoso sem adição de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$	113
FIGURA 43. Cromatograma da análise de cromatografia de permeação em gel para a amostra de PCL/Amido (F2) após 14 dias de incubação no solo arenoso sem adição de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$	114
FIGURA 44. Cromatograma da análise de cromatografia de permeação em gel para a amostra de PCL/Amido/PIS (F3) após 14 dias de incubação no solo arenoso sem adição de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$	114
FIGURA 45. Cromatograma da análise de cromatografia de permeação em gel para a amostra de PCL/Amido/PIS (F4) após 14 dias de incubação no solo arenoso sem adição de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$	115
FIGURA 46. Derivada primeira da análise termogravimétrica da amostra de PCL puro (F1)...	116
FIGURA 47. Derivada primeira da análise termogravimétrica da amostra de PCL/Amido (F2)....	116
FIGURA 48. Derivada primeira da análise termogravimétrica da amostra de PCL/Amido/PIS (F3).....	117
FIGURA 49. Derivada primeira da análise termogravimétrica da amostra de PCL/Amido/PIS (F4).....	117
FIGURA 50. Termograma da amostra de PCL puro (F1).....	118
FIGURA 51. Termograma da amostra de PCL/Amido (F2).....	118
FIGURA 52. Termograma da amostra de PCL/Amido/PIS (F3)	119
FIGURA 53. Termograma da amostra de PCL/Amido/PIS (F4)	119

ÍNDICE DE TABELAS

TABELA 1. Matérias-primas utilizadas na confecção de pads (Krzan e col., 2006).....	26
TABELA 2. Aminoácidos presentes na proteína isolada de soja.....	46
TABELA 3. Identificação e composição das formulações de PCL/Amido com e sem PIS.....	47
TABELA 4. Características físicas dos solos utilizados nos experimentos de biodegradação de blendas a base de PCL/Amido	51
TABELA 5. Características químicas dos solos utilizados nos experimentos de biodegradação de blendas a base de PCL/Amido	51
TABELA 6. Nitrogênio nas formas amoniacal e nítrico dos solos utilizados nos experimentos de biodegradação de blendas à base de PCL/Amido	52
TABELA 7. Carbono e nitrogênio totais e relação C/N dos solos utilizados nos experimentos de biodegradação de blendas à base de PCL/Amido	52
TABELA 8. Alteração da relação C/N das formulações de acordo com a incorporação de proteína isolada de soja.....	58
TABELA 9. Massa molecular ponderal média (Mw) e índice de polidispersividade (Mw/Mn) do PCL não extrudado e da fração PCL das quatro formulações obtidas.....	59
TABELA 10. Parâmetros térmicos e cristalinidade do PCL nas formulações a base de PCL/Amido e PCL/Amido/Proteína Isolada de Soja.....	61
TABELA 11. Propriedades mecânicas das formulações à base de PCL e Amido.....	66
TABELA 12. Mineralização média das quatro formulações incubadas nas diferentes condições.	73
TABELA 13. Porcentagem de C assimilado e mineralizado (triplicata) das blendas, após 180 dias de incubação nos solos de textura arenosa e argilosa, com e sem adição de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$	77
TABELA 14. Variação da massa molecular média do material F1 submetido ao ensaio de biodegradação em solo arenoso e argiloso, com e sem adição de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$	79
TABELA 15. Variação da massa molecular média do material F2 submetido ao ensaio de biodegradação em solo arenoso e argiloso, com e sem adição de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$	80
TABELA 16. Variação da massa molecular média do material F3 submetido ao ensaio de biodegradação em solo arenoso e argiloso, com e sem adição de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$	80
TABELA 17. Variação da massa molecular média do material F4 submetido ao ensaio de biodegradação em solo arenoso e argiloso, com e sem adição de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$	81
TABELA 18. Média da porcentagem de germinação de plântulas de couve-flor e da massa seca da parte aérea em relação aos solos, formulações e adição ou não de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$	95
TABELA 19. Mineralização dos materiais incubados por 180 dias em função do solo e sua relação C/N, com ou sem adição de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$	98
TABELA 20. Porcentagem de C assimilado e mineralizado.....	101

RESUMO

O desenvolvimento de polímeros biodegradáveis tem como objetivo contribuir com a redução do volume de lixo plástico descartado no meio ambiente. Em vista disso, a utilização de polímeros naturais na confecção de blendas tem proporcionado o aproveitamento de recursos de fontes renováveis como é o caso do amido e da soja. Nesse trabalho, dando continuidade às pesquisas realizadas anteriormente no grupo de materiais biodegradáveis da Profa. Lucia H. Innocentini-Mei (FEQ/UNICAMP), foram utilizadas blendas a base de poli (ϵ -caprolactona), amido de milho modificado, proteína isolada de soja (PIS) e sorbitol. As blendas foram preparadas através de extrusão em extrusora mono-rosca e prensagem a quente e as amostras assim obtidas foram submetidas à caracterização e estudo da biodegradação em diferentes solos, com o apoio do Laboratório de Microbiologia do solo da ESALQ/USP, sob a supervisão da Profa. Elke J.B. Cardoso.

A caracterização dos materiais obtidos deu enfoque às propriedades térmicas, mecânicas, morfológicas e capacidade de biodegradação em solos de diferentes texturas, e com ou sem a adição de N-fertilizante. Observou-se que a incorporação de amido modificado e proteína isolada de soja foram responsáveis pela redução das propriedades térmicas e mecânicas dos materiais, mas, para muitas aplicações estas propriedades não são requisitos indispensáveis.

Com relação à proteína isolada de soja, esta proporcionou a redução da relação carbono/nitrogênio (C/N) da blenda como esperado, atributo que foi decisivo durante o processo de biodegradação das formulações em diferentes solos. A mineralização das formulações foi maior em solo de textura arenosa, com maior conversão de carbono a dióxido de carbono (CO₂); por outro lado, o solo de textura argilosa não apresentou taxas altas de conversão de carbono a dióxido de carbono para as blendas, mas foi mais eficiente na formação de biomassa microbiana, comparado ao solo arenoso.

Palavras-chave: Blendas, Poli (ϵ -caprolactona), Amido, Proteína Isolada de Soja, Biodegradação, Solo.

ABSTRACT

The development of biodegradable polymers came to reduce the volume of plastic waste discarded in the environment. As a result, the use of natural polymers in the manufacture of blends has provided the use of renewable resources such as starch and soy. In this work, continuing the research done previously in the biodegradable materials group of School of Chemical Engineering School at State University of Campinas/ Brazil, supervised by Prof. Lucia H. Innocentini-Mei, blends of poly (ϵ -caprolactone)/modified starch, soy protein isolate (SPI) and sorbitol were prepared by extrusion in single-screw extruder and hot pressing machine. The samples obtained were subjected to characterization and study of biodegradation in different soils, with the support of the Laboratory of Soil Microbiology (ESALQ/USP), under the supervision of Professor Elke J. B. N. Cardoso.

The characterization of the material has focused on thermal, mechanical and morphological properties, and also on the biodegradation capacity in soils of different textures, and with or without the addition of N-fertilizer. It was observed that the incorporation of modified starch and soy protein isolate were responsible for the reduction of thermal and mechanical properties of materials but, for many applications, these properties are not necessities.

With respect to soy protein isolate (SPI), it reduced the carbon / nitrogen (C/N) of the blend as expected, an attribute which was decisive in the process of biodegradation of the studied formulations in different soils. Mineralization of the formulations was higher in sandy soil, with the higher conversion of carbon to carbon dioxide (CO₂) compared to the clay soil, which did not show high rates of conversion but was more efficient in the formation of microbial biomass.

Key words: Blends, Poli (ϵ -caprolactone), Starch, Soy Protein Isolate (SPI), Biodegradation, Soil.

CAPÍTULO 1 – INTRODUÇÃO E OBJETIVOS

1.1 - Introdução

Segundo os últimos dados do IBGE (2000), o principal destino do lixo doméstico no Brasil ainda é de lixões a céu aberto e aterros. Cerca de 70% do lixo coletado diariamente é disposto em aterros sanitários e controlados, 20% em lixões, 3% em estações de compostagem e apenas 1% é destinado para estações de triagem. Sotero (2000) relata que são despejados no meio ambiente cerca de 300 mil toneladas/dia de resíduo urbano, sendo 19% deste valor correspondente aos plásticos descartados. O acúmulo de lixo proveniente de materiais plásticos tem tornado os locais de descarte limitados (Deng e col., 2006). Jayasekara e col. (2005) comentam que os polímeros sintéticos são resíduos sólidos considerados como os maiores poluentes ambientais. O aumento descontrolado de resíduos plásticos no ambiente, provenientes principalmente das áreas de embalagens e de agricultura, causa a impermeabilização do solo e aumento do volume de lixo (Kapanen e col., 2008).

Uma das alternativas viáveis e mundialmente aceitas para a redução desse lixo plástico que, na maioria das vezes, contamina os mananciais de águas, é o desenvolvimento de polímeros ou plásticos ambientalmente degradáveis (PADs). Como os polímeros convencionais, os PADs são materiais capazes de sofrer alguma forma de degradação (térmica, oxidativa, mecânica e/ou biológica) após o seu descarte; porém, apresentam a vantagem adicional de não sofrerem nenhuma transformação durante o uso. Recentemente, o uso dos PADs tem sido ampliado, desde a agricultura a produtos de consumo e implantes na área médica (Krzan e col., 2006). No caso da família dos polímeros biodegradáveis e compostáveis, que são passíveis de ser transformados em dióxido de carbono (CO_2), água e biomassa, por meio da ação aeróbica de microrganismos em ambientes biologicamente ativos, pode-se classificar os diferentes tipos em grupamentos primário e/ou secundários (Swain e col., 2004). O primário leva em consideração a origem da matéria-prima, que pode ser de fonte renovável ou fóssil. Os secundários visam classificar os PADs de acordo com a forma de obtenção dos mesmos; isto é, pela via química sintética ou pela via biotecnológica.

Este fato, aliado a novas políticas de gerenciamento de resíduos, têm proporcionado o desenvolvimento de materiais poliméricos biodegradáveis ou polímeros ambientalmente degradáveis (PADs).

1.2 – Objetivos

O presente trabalho teve como objetivo principal desenvolver blendas compostas de poli (ϵ -caprolactona) (PCL), Amido de milho modificado, proteína isolada de soja (PIS) de modo a obter materiais com diferentes relações carbono/nitrogênio (C/N), bem como avaliar a biodegradação e a ausência de toxicidade após a decomposição dos mesmos em solos de diferentes texturas, e com ou sem a adição de fertilizantes para a correção da relação C/N.

Os objetivos específicos deste trabalho foram:

- Caracterizar os diferentes tipos de solo quanto aos fatores determinantes da biodegradação (umidade, pH, relação C/N, nutrientes minerais);
- Desenvolver as blendas e processá-las por extrusão e prensagem a quente e caracterizar os materiais obtidos;
- Investigar a biodegradação das blendas em solos de diferentes texturas, com ou sem a adição de fertilizante para a correção da relação C/N, estabelecendo uma relação entre a liberação de dióxido de carbono e a formação de carbono (C) da biomassa;
- Avaliar a biodegradação dos materiais através do acompanhamento da redução da massa molecular média e da morfologia da superfície durante a incubação em solo;
- Identificar os possíveis produtos, de baixa massa molecular, liberados durante o processo de biodegradação das blendas a base de PCL/Amido de milho modificado/proteína isolada de soja;
- Isolar e identificar o gênero dos microrganismos participantes da decomposição das blendas nos diferentes solos;
- Avaliar a toxicidade dos produtos da biodegradação, através de testes de crescimento vegetal no solo que contenha tais resíduos.

CAPÍTULO 2 – ESTADO DA ARTE E REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 - Estado da Arte

Muitos polímeros, incluindo poliamidas, polietileno, policarbonato, entre outros, são altamente resistentes ao ataque microbiano. Entretanto, existem alguns polímeros sintéticos que são susceptíveis à degradação biológica (Fried, 1995). Dentre os mais propensos, polímeros contendo uma funcionalidade éster, em particular os alifáticos, são potencialmente biodegradáveis. Vários autores defendem que a biodegradação destes polímeros ocorre tanto pelo ataque dos grupamentos ésteres por esterases não específicas, produzidas pela microbiota do solo, quanto por ataque hidrolítico concomitante (Lenz, 1993).

Dentre alguns dos poliésteres sintéticos biodegradáveis, o poli (ϵ -caprolactona) (PCL) (Figura 1), derivado de fonte fóssil, tem sido muito utilizado como polímero matriz no desenvolvimento de novos materiais, como o Mater-Bi® (material a base de PCL e amido) produzido pela Novamont. Dentre suas propriedades destacam-se a alta flexibilidade, biodegradabilidade, biocompatibilidade e facilidade no processamento. (Wu, 2003; Filipczak e col., 2006).

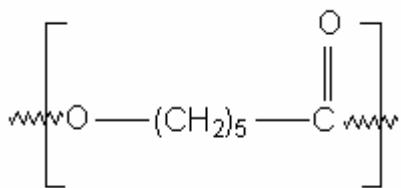


Figura 1. Fórmula estrutural do Poli (ϵ - caprolactona).

Embora essas características sejam de extrema importância, é evidente que, ao misturar o PCL a materiais de fontes renováveis, tem-se um produto final ambientalmente sustentável e, simultaneamente, a preservação de recursos fósseis. Os polímeros de fontes renováveis, ou biopolímeros, são conhecidos pela hidrofilicidade, biodegradação acelerada e baixas propriedades mecânicas (Yu e col., 2006). Dentre os biopolímeros mais conhecidos estão os polissacarídeos (amido, celulose, quitina, quitosana, entre outros); polipeptídeos (proteínas em geral, gelatina, caseína, albumina) e poliésteres bacterianos (família dos Poli (hidroxialcanoatos)) (Chandra e

Rustgy, 1998). Dentre os polissacarídeos, o amido natural, modificado e/ou termoplástico, tem sido muito utilizado no desenvolvimento de novas blendas (Matzinos e col., 2002; Dean e col., 2007; Bastioli, 1998; Averous e col., 2000; Singh e col., 2003).

Dentre diversos benefícios obtidos pela incorporação de amido em matrizes poliméricas sintéticas, a biodegradação é a característica mais importante quando se deseja produzir materiais de vida útil curta, como as embalagens, cujo descarte inadequado traz problemas para o ambiente. Ishiaku e col. (2002) observaram um aumento da biodegradação da blenda de PCL e amido de sago, na forma granular, quando comparado ao amido termoplástico. Mariani e col. (2007) também notaram o aumento da biodegradação da blenda de PCL, amido de milho modificado e Edenol, um óleo de soja epoxidado, em relação ao PCL puro.

Embora a incorporação do amido torne evidente a aceleração da taxa de biodegradação, César e col. (2009) sugerem que a alta relação C/N (900/1) da blenda PCL/amido de milho modificado/Edenol pode limitar a biodegradação, provavelmente pela insuficiência de nitrogênio, necessário para o metabolismo microbiano. Segundo Oliveira e col. (1999), resíduos com relação C/N maior que 20 têm baixa percentagem de mineralização.

Uma das alternativas viáveis para a redução dessa relação C/N é a incorporação de um polímero de fonte renovável contendo nitrogênio em sua formulação. Dentre as diversas biomacromoléculas existentes, as proteínas extraídas de plantas ocupam um lugar de destaque na produção de polímeros biodegradáveis. Estas proteínas são conhecidas como: zeína (milho), glúten (trigo), proteína de soja e proteína do amendoim (Swain e col., 2004). Segundo Tummala e col. (2006), a proteína de soja está disponível em três formas diferentes: farinha de soja (52% de proteína), concentrado de soja (65% de proteína) e isolado de soja (90% de proteína)

De acordo com Schmidt e Soldi (2006), a proteína de soja pode ser transformada em plástico por meio de extrusão, com o uso de plastificantes como glicerol e sorbitol. Bastioli (2005) constatou que a biodegradação de um material polimérico não é determinada apenas pela sua composição química e propriedades físicas, mas também pelo ambiente a que este material é exposto. Se este ambiente for inadequado, a biodegradação não ocorre, e o material se comporta como seus análogos convencionais.

O estudo de biodegradação de blendas poliméricas à base de PCL/Amido em diferentes ambientes, como solos de texturas e quantidades de matéria orgânica diferentes, ainda não foi abordado ou aprofundado. Como o solo é um meio para a produção de alimentos para os seres

humanos e animais, entende-se que, a ausência de resíduos e de efeitos negativos (toxicidade) devido à disposição de resíduos plásticos seja um conceito presente nos estudos de decomposição de novos materiais (Innocenti, 2005). Essa avaliação é de extrema importância para materiais que venham a ser aplicados na agricultura, além da questão de gerenciamento de resíduos. De fato essa abordagem também é importante no auxílio à elaboração e atualização de normas e testes padronizados, já que as existentes não fazem referência ao tipo de solo utilizado.

2.2 - Revisão Bibliográfica

2.2.1 -Plásticos Ambientalmente Degradáveis (PADs)

Com o tempo, o plástico gradativamente substituiu muitos materiais naturais e atualmente faz parte do cotidiano da população mundial. Propriedades como estabilidade e durabilidade foram melhoradas continuamente, tornando esses materiais resistentes aos diversos fatores ambientais. O aumento na produção de polímeros comerciais, principalmente para embalagens, indústrias e agricultura, tem despertado a atenção mundial para o fato do acúmulo e da poluição causada pelo descarte de lixo proveniente de materiais plásticos (Deng e col., 2006, Shah e col., 2008). Segundo Jayasekara e col. (2005), os polímeros sintéticos são resíduos sólidos considerados como os maiores poluentes ambientais. Kapanen e col. (2008) ressaltam que o aumento descontrolado de resíduos plásticos no ambiente, provenientes principalmente das áreas de embalagens e de agricultura, causam a impermeabilização do solo e aumento do volume de lixo. Este fato, aliado a novas políticas de gerenciamento de resíduos, têm proporcionado o desenvolvimento de materiais poliméricos biodegradáveis ou polímeros ambientalmente degradáveis (PADs). Esses novos materiais visam substituir os plásticos bioestáveis na área da agricultura, embalagens alimentícias e não alimentícias, e itens descartáveis em geral (Chiellini e col., 2007). Através da figura 2 é possível observar o mercado de polímeros no Brasil, com potencial para substituição por plásticos ambientalmente degradáveis (Pradella, 2006).

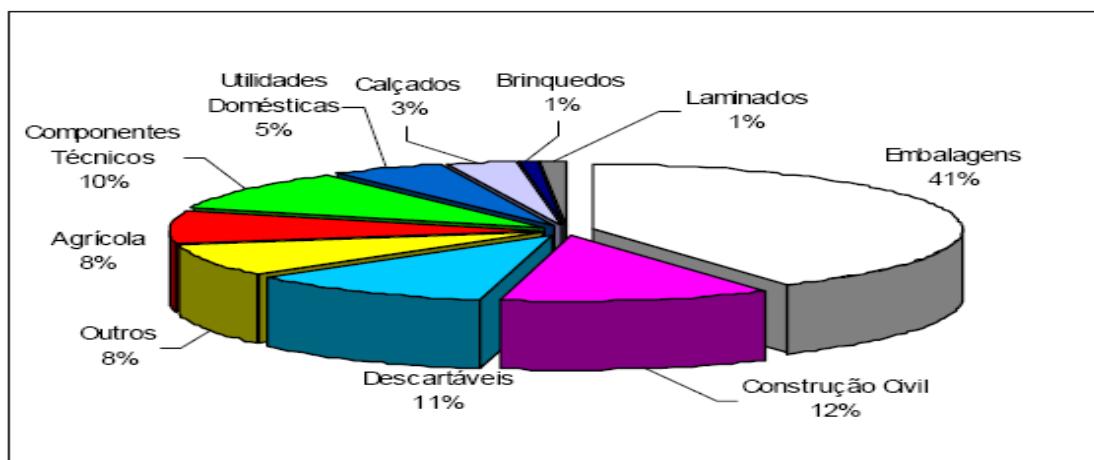


Figura 2. Segmentação do mercado de polímeros no Brasil (Fonte: Pradella, 2006).

Deste modo, os PADs compreendem uma nova geração de polímeros ambientalmente sustentáveis, sendo alguns já comercialmente viáveis e desenvolvidos para se manterem estáveis durante sua vida útil e, serem degradados em um curto período de tempo após o descarte (Mohanty e col., 2002). Segundo Krzan e col. (2006), um plástico ambientalmente degradável deve apresentar, após degradação significativa, produtos finais compatíveis com o ambiente, ou seja, CO₂, água, e biomassa microbiana.

De acordo com Tokiwa e Calabia (2007) as principais vantagens na utilização dos PADs são:

- 1- Podem ser compostados juntamente com resíduos orgânicos e devolvidos ao solo, podendo ser utilizados como adubos orgânicos;
- 2- Não só irá reduzir os danos causados em animais marinhos e aves como ingestão de materiais plásticos devido ao descarte dos mesmos, como também a diminuição do custo da remoção dos resíduos plásticos do ambiente;
- 3- A decomposição irá ajudar a aumentar a longevidade e a estabilidade dos aterros por reduzir o volume de lixo;
- 4- Podem ser reciclados como os plásticos convencionais ou para obtenção de monômeros e oligômeros úteis, através de tratamento microbiológico e enzimático.

Krzan e col. (2006) concluem que as maiores barreiras para a difusão dos PADs são:

- 1- Alto custo devido ao baixo volume de produção e alto investimento em pesquisa e desenvolvimento;
- 2- Falta de mercado e políticas de incentivo ao uso de matérias “ambientalmente corretas”;
- 3- Sensibilização e aceitação pública limitada.

2.2.1.1 - Classificação dos PADs

Os PADs podem ser sintetizados a partir de fontes renováveis ou fontes fósseis, e, de acordo com Miertus e Ren (2003) e Krzan e col. (2006), as matérias-primas podem ser obtidas a partir das seguintes rotas: biosintética (fermentação por microrganismos), como a família dos PHAs (Polihidroxialcanoatos); química (síntese química e processos de polimerização), como o PLA (Poli-ácido lático); aplicação direta de materiais naturais com ou sem modificação química (fibras ou extratos), como o amido, a celulose, as fibras naturais e os óleos e proteínas.

Os PADs podem ser classificados de acordo com a origem da matéria-prima, sendo divididos principalmente em origem biológica e sintética (Averous e Boquillon, 2004; Krzan, e col., 2006). A Tabela 1 apresenta as diferentes matérias-primas utilizadas na confecção de PADs.

Tabela 1. Matérias-primas utilizadas na confecção de PADs (Krzan e col., 2006)

Matérias Primas para PADs			
Origem Biológica	e/	ou	Origem Sintética
Proteínas			Poliésteres alifáticos
Albumina			Poli(ácido glicólico)-PGA
Caseína			Poli(ácido lático)- PLA
Colágeno/gelatina			Poli(lactato-co-glicolato) - PLAGA
Fibrinogénio/fibrina			Poli(β -hidróxi alcanoato) - PHA
Glúten de trigo, Proteína de soja, Zeína			Poli(β -hidróxi butirato)- PHB
			Poli(β -hidróxi butirato-co-valerato)- PHBV
Polissacarídeos			Poli(β -ácido málico) -PMLA
Animal			Poli(ϵ -caprolactona)-PCL
Heparina			Poli(alquíleno succinato)
Ácido hialurônico			Poli(p-dioxanona)- PDO
Quitina/Quitosana			
Vegetal			Poli(etileno tereftalato) modificado
Celulose e derivados			
Lignina			Copolíesteres
Amido e derivados			Ecoflex, EastarBio, Biomax
Fermentação Microbiana			Poli(álcool vinílico)
Dextrana			
Xantana			Poliamidas
Pullulan			Copoliamidas
			Poli(éster amidas)
Algas/extractos de Plantas			Poli(amino ácidos)
Pectina			
Inulina			Pseudo Poli(α-amino ácidos)
Alginato			Poli(α -amino ácido éster)
Carragenina			Poli(éster-uréias)
Agar			Poli(iminocarbonatos)
Gomas			
Xiloglucano			Polianidridos
Levan			
			Poli(etileno glicol)/Poli(ortoéster)s
			Poliuretanos- PU
			Poli(éster uretano)- PEU
			Poli(éter uretano)- EU
			Poli(uretano uréia)s- PUU
			Poliolefinas

Vale ressaltar que algumas matérias-primas, como as poliolefinas, são aqui descritas como PADs em função da possibilidade de sofrerem degradação abiótica, como é o caso dos polímeros contendo aditivos foto ou termo sensíveis. Como a degradação abiótica precede a degradação

biótica, as poliolefinas se enquadram dentro dos PADs, já que esse é o mecanismo de degradação dos mesmos (Scott e Wiles, 2001).

2.2.1.2 - Mecanismos de degradação dos PADs

Os PADs são materiais desenvolvidos para sofrer algum tipo de degradação, abiótica, biótica ou uma combinação das duas, após o seu descarte. Segundo Shah e col. (2008), qualquer alteração química ou física no polímero é resultante de fatores ambientais como: luz, calor, umidade, condições químicas e atividade biológica. Processos que induzem alteração nas propriedades dos polímeros devido a interações físicas, químicas e/ou biológicas resultando na quebra de ligações e transformações químicas são categorizados como mecanismos de decomposição polimérica.

Os diferentes tipos de degradação dos PADs, bem como os parâmetros necessários para que ocorram, de acordo com Grima e col. (2002), Krzan e col. (2006), Singh e Sharma (2008) e Shah e col. (2008), são:

- 1. Fotodegradação:** Muitos polímeros são susceptíveis à oxidação, particularmente em temperaturas elevadas ou durante a sua exposição à radiação UV. As radiações UV-B (~295-315 nm) e UV-A (315-400 nm) são responsáveis pela fotodegradação direta (fotólise e fotooxidação). A radiação UV fornece energia necessária para a quebra da ligação C-C; no entanto, o comprimento de onda mais prejudicial para um determinado plástico depende das ligações presentes e, portanto, a degradação máxima ocorre em diferentes comprimentos de onda para diferentes tipos de plásticos. Assim a degradação máxima para o polipropileno (PP) ocorreria a 370 nm e para o polietileno (PE) por volta de 300 nm, por exemplo. A luz visível (400-760 nm), por sua vez, induz a degradação polimérica através do aquecimento; e a radiação do infravermelho (760-2500 nm) acelera a oxidação térmica.

A presença de aditivos fotossensíveis, os quais, quando expostos à radiação UV, liberam radicais livres que quebram as ligações poliméricas ao acaso, tornando-as suscetíveis à oxidação em condições aeróbias, acelerando a fragmentação dos plásticos.

- 2. Degradção mecânica:** Ocasionada por processo que envolve solicitação mecânica sobre o material, tal como alto cisalhamento, provocando a quebra de suas cadeias poliméricas. A

degradação mecano-química envolve também as reações químicas subsequentes à quebra das cadeias poliméricas por força.

3. **Degradação térmica:** Ocorre quando calor apropriado proveniente do próprio processamento ou de outras fontes fornece a energia necessária para promover a cisão de ligação das moléculas e consequente oxidação do carbono da cadeia polimérica, reagindo com outras e promovendo a perda das propriedades iniciais do polímero. A degradação térmica resulta em redução da massa molecular média e, portanto: perda de resistência, alterações na cor entre outras. Sob condições normais, a degradação térmica e a fotodegradação são similares e podem ser classificadas como degradação oxidativa. A principal diferença entre elas é a seqüência de etapas de iniciação que levam ao ciclo de auto-oxidação. Outra diferença é que a degradação térmica ocorre em toda massa da amostra polimérica enquanto que, na fotodegradação, as reações ocorrem apenas na superfície do material.
4. **Degradação oxidativa:** Trata-se de um processo que é normalmente associado aos descritos anteriormente (fotodegradação e degradação térmica) e envolve a reação do oxigênio com o radical polimérico formado. Sob o ponto de vista macroscópico, a oxidação se manifesta como perda de propriedades mecânicas e fragmentação de um filme polimérico de polietileno (PE), por exemplo; já microscopicamente ocorre a quebra das ligações das cadeias das regiões semicristalinas e aumento da hidrofilicidade da superfície do filme (Koutny e col., 2006). Em geral, o mecanismo de degradação oxidativa é via radical livre sendo iniciado por clivagens térmicas ou fotolíticas de ligações. Os radicais livres formados podem reagir com o oxigênio para produzir peróxidos e hidroperóxidos, como mostrado pelo exemplo da degradação fotolítica do polisopreno na Figura 3:

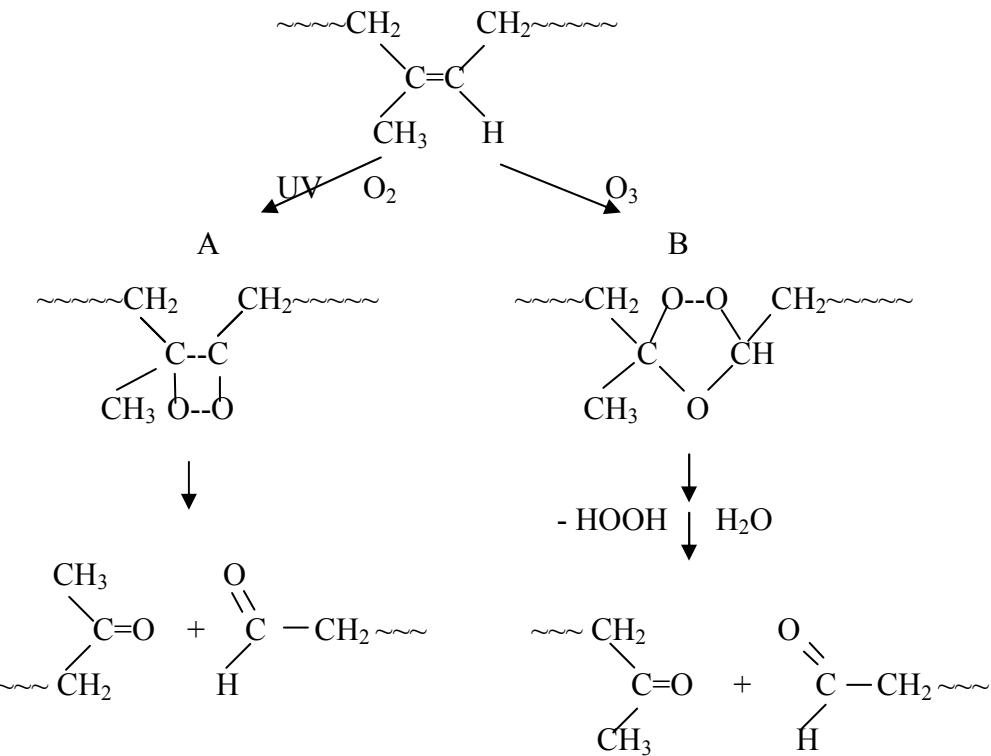


Figura 3. Degradção de polisopreno por fotólise (A) e por Ozonólise (B).

5. Degradação hidrolítica: Susceptível de acontecer quando há a presença de grupamentos hidrolisáveis como ésteres, anidridos, amidas. Esses grupos hidrolisáveis podem ser encontrados em polissacarídeos, como amido; nos poliésteres, como PHB e PCL; nas proteínas como as de soja, de milho; nos polianidridos, nos policarbonatos, nas poliamidas e poliuretanos, dentre outros. Esses polímeros absorvem a umidade do ambiente e sofrem clivagem hidrolítica das cadeias, que pode ser acelerada por agentes químicos ou por enzimas.

No caso da hidrólise química, a reação pode ser catalisada por compostos ácidos ou básicos. A Figura 4 apresenta uma reação de hidrólise de um poliéster, onde o subproduto da reação sendo ácido pode acelerar a hidrólise por autocatálise.



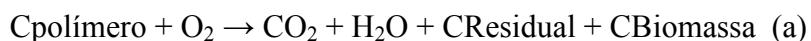
Figura 4. Reação de hidrólise de um poliéster.

Diferentemente da hidrólise química, a biológica é catalisada por enzimas. Diversas enzimas podem atuar na reação, dependendo do tipo de ligação a ser hidrolisada, e os produtos da reação das duas formas de hidrólise são os mesmos, sendo diferenciadas apenas pelo catalisador envolvido na reação.

6. Biodegradação: A quebra das ligações poliméricas é associada à ação das enzimas (catalisadores naturais) presentes nos organismos vivos. Esse processo é extremamente afetado pela quantidade e tipo de microrganismos disponíveis e de suas atividades pois estes são sensíveis a parâmetros ambientais como: temperatura, umidade, pH, relação carbono/nitrogênio (C/N) e quantidade de oxigênio disponível. O processo pode ocorrer dentro ou fora da célula (endo ou exo-biodegradação) ou, eventualmente, através da combinação dos dois. É importante enfatizar que biodegradação e biodegradabilidade não são atributos absolutos do material escolhido, já que estão diretamente relacionados à condição ambiental em que este está sendo depositado.

2.2.2 – Biodegradação

Em princípio qualquer substância orgânica é biodegradável, ou seja, o carbono orgânico de qualquer substância, após uma série de processos de degradação (abióticos ou bióticos), independentemente do tempo, pode ser oxidado em dióxido de carbono através da respiração microbiana (Innocenti, 2003) e, na ausência de oxigênio são produzidos metano e CO₂ (Khare e Deshmukh, 2006). A biodegradação de um polímero pode ser melhor visualizada através das reações aeróbica e anaeróbica apresentadas nas Figuras 5a e 5b (Grima, e col., 2002), respectivamente. Esse processo de conversão do carbono orgânico em carbono inorgânico é chamado de mineralização. Na realidade, nem sempre o processo de biodegradação leva à mineralização completa do substrato, outros fatores ambientais como temperatura, água, irradiação, entre outros, também podem resultar na mineralização; entretanto, independentemente da rota de degradação, o resultado essencial da mineralização é o fechamento do ciclo biogeoquímico do carbono (Innocenti, 2003, Krzan e col., 2006).



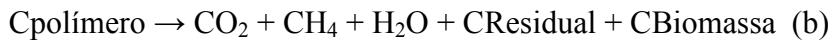


Figura 5. Reação aeróbia (a) e anaeróbia (b) da biodegradação de um polímero (Zee, 2005).

A afirmação de que todo composto orgânico é biodegradável pode ser contraditória quando se avalia os plásticos comuns utilizados atualmente, que persistem no ambiente por tempo indeterminado; entretanto o que diferencia um material biodegradável de outro é a escala de tempo de biodegradação. De fato, a desintegridade e a biodegradabilidade de um material são primordiais para evitar seu acúmulo no solo. Ainda assim, o termo biodegradação não é muito informativo, já que não indica o ambiente específico, a velocidade e a extensão de biodegradação do material (Innocenti, 2003).

De acordo com Lucas e col. (2008), a biodegradação de materiais poliméricos não pode mais ser resumida apenas numa ação que resulta em mineralização, reciclagem de C e formação de biomassa; mas num processo que envolve diferentes etapas (Figura 6) e que pode cessar em qualquer uma delas:

- **Biodeterioração:** ação combinada da comunidade microbiana, outros organismos decompositores e/ou fatores abióticos que resulta na fragmentação inicial do material;

- **Despolimerização:** os microrganismos secretam agentes catalíticos (enzimas) capazes de clivar as moléculas poliméricas, reduzindo progressivamente a massa molecular média do polímero e gerando oligômeros, dímeros e monômeros;

- **Recepção:** algumas moléculas são reconhecidas pelos receptores das células microbianas e atravessam a membrana plasmática, já outras permanecem no ambiente extracelular;

- **Assimilação:** no citoplasma, as moléculas transportadas integram o metabolismo microbiano para produzir energia, nova biomassa e numerosos metabólitos primários e secundários.

- **Excreção:** alguns metabólitos simples e complexos podem, concomitantemente, ser excretados e atingir o ambiente extracelular (ácidos orgânicos, aldeídos, terpenos, antibióticos, entre outros).

-Mineralização: algumas moléculas simples como CO₂, N₂, CH₄, H₂O e diferentes sais do metabólito intracelular originado do material, em processo de biodegradação, são oxidados e liberados no ambiente.

Dessa forma, o termo biodegradação indica a predominância da atividade biológica no processo; entretanto, na natureza, os fatores bióticos e abióticos atuam sinergicamente para decompor a matéria orgânica.

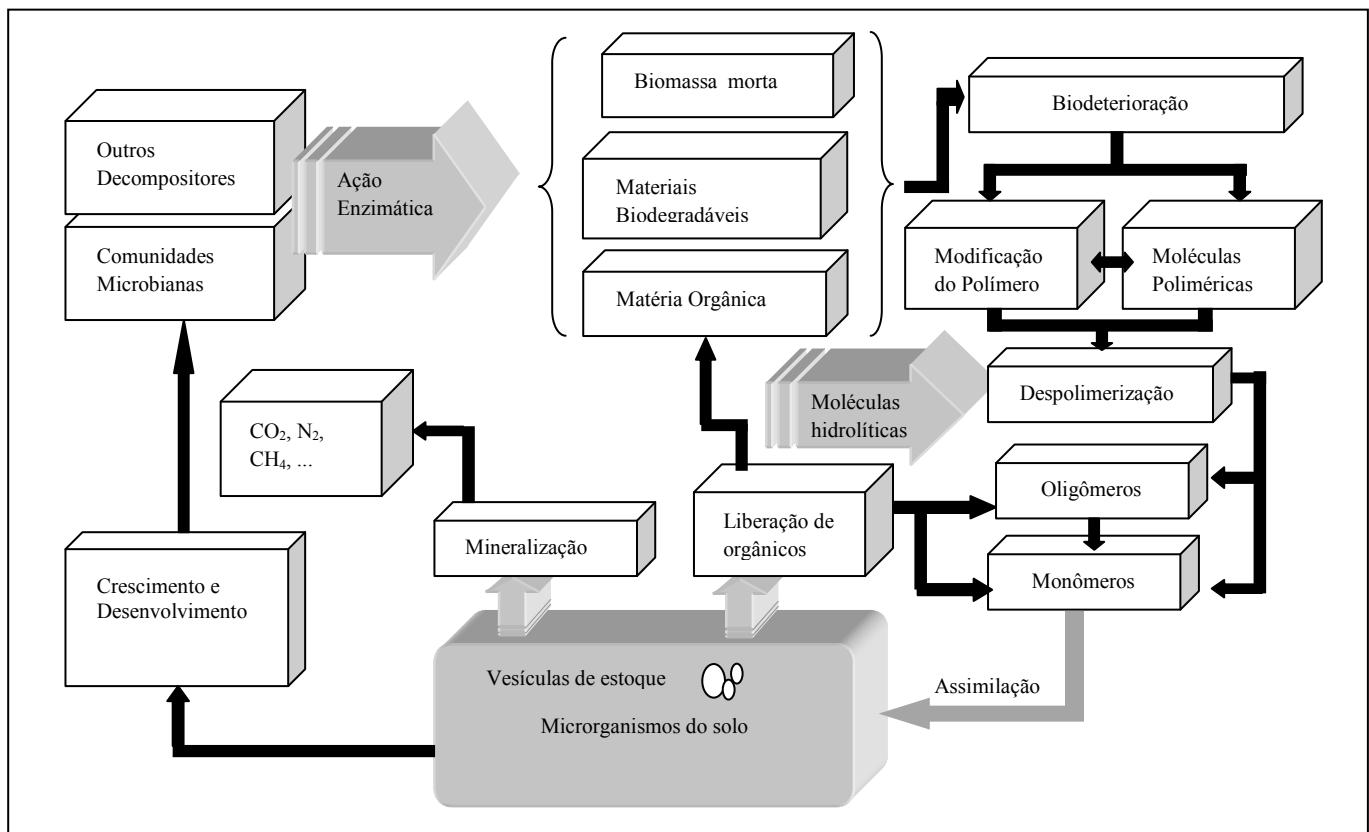


Figura 6. Exemplo do ciclo de biodegradação de materiais poliméricos (adaptado de Lucas e col., 2008).

2.2.2.1 - Fatores que podem afetar a biodegradação de polímeros

Além dos fatores ambientais, as propriedades físicas e químicas dos polímeros podem afetar seus mecanismos de degradação.

Segundo Moreira e Siqueira (2006), as principais características químicas de um xenobiótico em relação à degradação, e que determinam seu comportamento no solo, seu grau de toxicidade, sua rota metabólica e a sua absorção pelos microrganismos são: tamanho da molécula, sua estrutura química, conformação, carga da molécula e grupamentos funcionais. Destaca-se também a acessibilidade de água e enzimas à matriz polimérica, já que inicialmente a degradação é catalisada por enzimas extracelulares; assim, o estado físico e a área superficial do material são de extrema importância (Zee, 2005). César e col. (2009), em estudo de biodegradação em solo realizado com blenda de poli (ϵ -caprolactona)/amido, em diferentes granulometrias, demonstraram que quanto maior a área de superfície de contato, maior a velocidade de degradação.

A biodegradabilidade também é afetada pela hidrofilicidade e cristalinidade do polímero. Materiais semicristalinos dificultam a acessibilidade das enzimas nas regiões cristalinas, as quais iniciam sua atividade catalítica nas regiões amorfas. A massa molecular média é outro fator que compromete a biodegradação, principalmente por afetar a acessibilidade das enzimas aos sítios catalíticos (sítios que irão sofrer hidrólise catalisada pelas enzimas), a flexibilidade da cadeia e a cristalinidade entre outros (Zee, 2005). Hoshino e col. (2001) e Grima e col. (2002) sugerem que os polímeros são compostos, normalmente, de átomos de carbono, hidrogênio e oxigênio, dessa forma, a falta de nitrogênio também pode ser um fator limitante para a biodegradação, pois o mesmo é essencial para síntese protéica e a falta dele pode inibir o crescimento microbiano.

2.2.2.2 - Biodegradação dos polímeros em solo

Os produtos poliméricos, como os plásticos, podem chegar aos solos de forma intencional ou não. Assim, na prática, duas rotas determinam o solo como destino final dos materiais à base de polímeros biodegradáveis. Uma delas é a rota agrícola (adição de fertilizante à base de composto orgânico produzido a partir de materiais plásticos compostáveis; filmes de cobertura ou mulches; tubetes para mudas de plantas, entre outros) e a segunda compreende a disposição final de lixo (Innocenti, 2005).

2.2.3 - O Solo

O solo é um ecossistema complexo e, de acordo com Monteiro (1997), em termos físicos ele é composto de material mineral (argila, silte e areia), poros cheios de ar ou água, e matéria orgânica. A matéria orgânica é um componente importante e ativo e pode ser dividida em três frações: 1) componente macroscópico, particulado, composto de restos de plantas e animais em decomposição; 2) Vários compostos orgânicos simples disponíveis, oriundos dos resíduos vegetais e animais (carboidratos, aminoácidos, proteínas); 3) componente complexo, macromolecular e largamente aromático, também conhecido por húmus, resistente à degradação. O solo também pode ser considerado como um vasto local de reciclagem, uma vez que recebe e reduz continuamente compostos de carbono e os oxida a CO₂ e água.

Moreira e Siqueira (2006) propuseram que o solo, como habitat, é um sistema heterogêneo, descontínuo e estruturado, formado por um conjunto de micro-habitats diferentes, com características químicas, físicas e comunidades biológicas diferenciadas.

Segundo Innocenti (2005), o solo varia de lugar para lugar, e é afetado por diversos parâmetros incontroláveis, como:

1. **Temperatura:** dependente do clima da região e das flutuações sazonais;
2. **Quantidade de água:** dependente das chuvas (fator climático) e irrigação, que é influenciada pela capacidade máxima de absorção de água;
3. **Composição Química:** compostos minerais e matéria orgânica;
4. **Fatores geográficos:** determinam a composição e estrutura do solo;
5. **pH:** A maioria dos solos possuem pH entre 4,0 e 8,5, mas a decomposição de matéria orgânica, a chuva ácida, entre outros, podem contribuir para baixar o pH do solo.

Todos esses fatores atuando em conjunto, e em diferentes combinações, criam ambientes completamente diferentes que afetam diretamente a ecologia do solo. Como consequência, a microbiota e a atividade de biodegradação podem variar de solo para solo, e de estação para estação.

Dentro deste contexto, Moreira e Siqueira (2006) discutem que a decomposição de um resíduo orgânico é diretamente influenciada pelas condições físicas e químicas do mesmo. De acordo com estudos realizados por Eya e col. (1994), foi encontrada diferença de até sete vezes

na perda de massa de um material enterrado em diferentes tipos de solo. Nishioka e col. (1994) estudaram a biodegradação do Bionolle® (polímero biodegradável à base de poli(butileno succinato)) em diferentes solos e concluíram que a taxa de biodegradação depende não só da família, como também da razão entre população de microrganismos/solo e do tipo de solo utilizado.

Em estudo realizado com pesticidas, Monteiro (1997) também observou que o tipo de solo tem influência direta na intensidade da degradação, evidenciando a importância da interação solo-produto na degradação de xenobióticos.

2.2.3.1 - Fatores ambientais ativos

De acordo com Innocenti (2005), os fatores ambientais ativos associados às fases de biodegradação no solo são classificados em fatores superficiais e subterrâneos, ou seja, a primeira fase corresponde à ação do sol e de outros fatores climáticos, e a segunda à ação dos microrganismos. Normalmente os fatores superficiais correspondem à fase funcional como no caso dos filmes de cobertura agrícola (mulches) e, portanto, a degradação nessa etapa é considerada um fator negativo.

2.2.3.2 - Fatores subterrâneos

Os fatores subterrâneos, no caso de biodegradação, são descritos para a camada superior do perfil do solo, também conhecido como horizonte A, correspondente a uma espessura de 10-30 cm, onde há o desenvolvimento das raízes, acúmulo de matéria orgânica, nutrientes, água e, portanto, onde há atividade biológica máxima (Innocenti, 2005, Manahan, 1997). Moreira e Siqueira (2006) e Innocenti (2005) citam os seguintes fatores como mais importantes:

1. Textura do solo:

A textura do solo é uma propriedade usada para descrever a proporção relativa dos diferentes tamanhos dos grãos das partículas minerais do solo, responsável por classificar a parte mineral do solo em areia, silte ou argila e que, por sua vez, de acordo com a proporção de cada um, determina a classe textural do solo.

Os solos são agrupados em três classes de textura (Embrapa, 2003):

Textura arenosa: Possui teor de areia superior a 70% e argila inferior a 15%, é permeável, leve, de baixa capacidade de retenção de água e de baixo teor de matéria orgânica.

Textura média: Solo que apresenta certo equilíbrio entre os teores de areia, silte e argila. Apresenta boa capacidade de retenção de água.

Textura argilosa: Solo com teor de argila superior a 35%. Possui baixa permeabilidade e alta capacidade de retenção de água além de apresentar maior força de coesão entre as partículas, o que dificulta a penetração de água, e ser altamente suscetível à compactação.

2. Estrutura do solo:

As partículas minerais do solo, estabilizadas em agregados de formas e arranjos diferentes, e com poros entre si, formam a estrutura do solo. Para os fatores textura e estrutura do solo, o principal efeito abiótico na degradação de polímeros é que a textura pode aumentar a abrasão, causando a degradação mecânica; e a porosidade, responsável pela circulação de água e ar, determina as melhores ou piores condições bióticas.

3. Temperatura:

A temperatura do solo é importante, visto que regula os processos químicos e biológicos (crescimento microbiano e atividades enzimáticas). A mobilidade das cadeias poliméricas também está associada à temperatura do solo, o que pode afetar a biodegradação, já que a alta mobilidade facilitará o contato entre as ligações químicas susceptíveis e os sítios ativos das enzimas. Li e Vert (1995) afirmam que a difusão de água e a hidrólise são facilitadas quando o processo de biodegradação ocorre a uma temperatura acima da temperatura de transição vítreia (T_g), mas quando a temperatura é abaixo da T_g , a biodegradação é reduzida já que as cadeias poliméricas, nessa temperatura, não possuem mobilidade. Segundo Day e col. (1998), apud Grima e col., 2002 a biodegradação do PLA - Poli (ácido láctico) - em sistema de compostagem é diretamente influenciada pela temperatura. Para esse polímero, ensaios com temperatura acima da temperatura de transição vítreia é obrigatório para que haja aumento da degradação das cadeias poliméricas e redução da massa molecular média.

4. Matéria orgânica e nutrientes:

A matéria orgânica do solo é importante porque serve como reserva de nutrientes (principalmente N e P), que estimulam indiretamente a biodegradação e também para melhorar a estrutura do solo. A matéria orgânica pode afetar diretamente a absorção de água em solos ácidos, além de atuar como tampão mantendo o pH em condições aceitáveis para a atuação enzimática.

5. Água:

A água é essencial para a atividade microbiana do solo. Ela se aloja entre os poros do mesmo, competindo com os gases ali presentes. Em termos abióticos, a água favorece a hidrólise e, consequentemente, a redução da massa molecular média de polímeros hidrolisáveis; também favorece a biodegradação por controlar o crescimento microbiano; entretanto, pode ter efeito negativo quando em excesso, já que torna o ambiente anaeróbio.

6. pH:

Este parâmetro afeta sobremaneira a atividade catalítica dos microrganismos do solo. Solos ácidos, por exemplo, reduzem o desenvolvimento de bactérias e favorecem o crescimento de fungos. Com isso pode haver redução na fixação de nitrogênio e, por consequência, uma redução na biodegradação.

7. Gases:

A quantidade de gás do solo é proporcional à quantidade de água, já que ambos competem pelos mesmos poros; assim, a concentração de O₂ presente diminui com o aumento da quantidade de água. Solos saturados de água dificultam a troca de gases impedindo a degradação aeróbica.

2.2.4 - Avaliação da biodegradação: balanço entre liberação de CO₂/consumo de O₂ e biomassa microbiana.

Segundo Shah e col. (2008), o consumo de oxigênio e a formação de dióxido de carbono são bons indicadores de biodegradação polimérica sob condições aeróbias, já que os

microrganismos consomem o oxigênio para oxidar o carbono e formar o CO₂, produto metabólico principal. A avaliação da biodegradação, através da determinação do CO₂ liberado, já é uma técnica bastante difundida (também conhecida como respirometria) e está presente nas diversas normas ISO, ASTM, CEN entre outras (Mei e Mariani, 2005), para estudos em meio líquido e em matrizes sólidas como solo, vermiculita e composto. Entretanto, para Chiellini e col. (2007), é preciso considerar que os microrganismos heterotróficos (organismos que assimilam carbono de fontes orgânicas) metabolizam o C em CO₂ e na produção de nova biomassa microbiana.

Moreira e Siqueira (2006) sintetizaram esse processo complexo. Segundo eles, conforme o C do resíduo em estudo é oxidado, biomassa é inicialmente sintetizada em maior quantidade, tendendo ao decréscimo com o tempo, quando ocorre a reciclagem do C da biomassa originária do resíduo. Sabe-se que, afora as características físicas do meio de incubação, os atributos químicos e a concentração do substrato podem causar modificação significativa na comunidade microbiana, favorecendo as espécies degradadoras de substâncias húmicas, autóctones, ou os microrganismos oportunistas conhecidos como zimógenos. Esses dois tipos de microrganismos do solo são caracterizados pela diferença na eficiência metabólica, razão entre o C assimilado na célula microbiana e o oxidado na forma de CO₂.

Os microrganismos zimógenos apresentam baixa eficiência metabólica, não são capazes de degradar substâncias húmicas e a sua viabilidade cessa quando o C do substrato é exaurido. Consequentemente, quando as espécies oportunistas prevalecem, apenas uma pequena quantidade do C é incorporado em nova biomassa e grande quantidade de CO₂ é liberado (Chiellini e col., 2007).

Moreira e Siqueira (2006) observaram, num solo poluído com metais pesados, grande redução na biomassa microbiana, na densidade de fungos e bactérias, e aumento no quociente metabólico (liberação de CO₂ por unidade de biomassa por tempo) em relação ao solo sem contaminação. Desse modo eles confirmaram uma situação de estresse dos microrganismos, por conta dos metais pesados, que passaram a consumir mais energia para a sua manutenção.

Chiellini e col. (2007) advertem que a avaliação da biodegradação de um polímero deve ser feita através do balanço de carbono; ou seja, a determinação do C da amostra em análise que realmente é convertido em CO₂ e em biomassa microbiana, com a finalidade de evitar erros de interpretação das análises.

Para o caso em que haja sobra de material (resíduo do polímero) no solo, Jayasekara e col. (2005) entendem que a biodegradação deve ser expressa em função da conservação de carbono, ou seja, $C_{total} = CO_2 + C_{biomassa} + C_{residual}$ (para condições aeróbias).

2.2.5 - Biodegradação de poliésteres

Os polímeros sintéticos potencialmente biodegradáveis, que mais respondem pela ação espontânea dos microorganismos do meio ambiente, são os poliésteres alifáticos com ligações hidrolisáveis ao longo da cadeia polimérica. Os poliésteres vêm sendo estudados desde 1970 na área médica e, a partir de 1990, vem sendo utilizados também na área de embalagens (Bohlmann, 2005).

Os quatro poliésteres alifáticos mais conhecidos, intencionalmente desenvolvidos para sofrerem biodegradação são: poli(3-hidroxibutirato) - (PHB), poli(ϵ -caprolactona) - (PCL), poli(butileno succinato) - (PBS), poli(ácido lático) - (PLA). Embora sejam sintéticos, podem derivar de fonte fóssil e/ou renovável (Tokiwa e Calabia, 2007).

Segundo Bohlmann (2005), o aspecto mais importante da biodegradação dos poliésteres é a susceptibilidade à degradação hidrolítica, a qual ocorre em duas etapas distintas. A primeira delas, não enzimática, consiste da quebra hidrolítica aleatória das ligações ésteres; a segunda etapa, também não enzimática, tem início quando a massa molecular média do polímero diminui ao ponto dessa clivagem aleatória produzir um oligômero pequeno o suficiente para se difundir pelo polímero. Conforme a massa molecular média se aproxima de 10.000, os microrganismos passam a digerir os monômeros, produzindo água e dióxido de carbono, em ambiente aeróbio.

A velocidade de biodegradação dos poliésteres alifáticos é dependente de diversos fatores (Tokiwa e Calabia, 2007):

1. Estrutura altamente ordenada e suas propriedades físicas: cristalinidade, estrutura dos cristais, esferulitos, orientação molecular e temperatura de fusão.
2. Estrutura química e morfologia da superfície.

2.2.6 - Blendas Poliméricas Biodegradáveis

As blendas são misturas físicas de dois ou mais polímeros. Nessa mistura não há ligação química e o produto final resulta numa combinação de propriedades. Elas podem se apresentar na forma de um sistema homogêneo, monofásico ou heterogêneo, multifásico com polímeros sintéticos ou outros polímeros naturais (Mano e Mendes, 1999). Assim, a característica mais importante de uma blenda é o comportamento das fases, ou seja, as blendas poliméricas podem apresentar miscibilidade, separação de fases ou miscibilidade parcial (Lloyd, 2007). Segundo Oréfice e col. (2004) as propriedades de uma blenda dependem da composição do sistema, da compatibilidade de seus componentes, do processamento e da morfologia.

De acordo com Chandra e Rustgi, (1998) as blendas biodegradáveis podem ser compostas por polímeros inertes como o polietileno (PE), por exemplo, e biopolímeros, como é o caso da blenda de PE/amido. Outra possibilidade é a formação de blendas à base de termoplásticos não biodegradáveis (polietileno, poliestireno, poli (cloreto de vinila) e biodegradáveis (PCL, polihidróxialcanoatos), sendo que a taxa de biodegradação dessas blendas pode variar de acordo com a compatibilidade dos componentes e do processamento.

As blendas à base de polímeros biodegradáveis são desenvolvidas com a finalidade de melhorar as propriedades físicas, químicas, mecânicas e, principalmente, aumentar a taxa de biodegradação. Em algumas formulações obtém-se ainda a redução do custo total do material (Ishiaku e col., 2002).

Entre a maioria dos polímeros biodegradáveis comercialmente disponíveis, blendas à base de poliésteres alifáticos e amido têm recebido atenção especial dos pesquisadores na última década (Yavuz e Babaç, 2003; Franco e col., 2004).

Atualmente, amidos de diferentes origens têm sido investigados como um dos componentes naturais em blendas biodegradáveis, devido à grande disponibilidade no mercado interno. O amido é um biopolímero formado por uma combinação física de duas estruturas, amilose e amilopectina. Em ambas, as unidades de glicose são unidas por ligações glicosídicas α 1,4, como mostra a Figura 7. A amilose é uma molécula essencialmente linear; enquanto que, a amilopectina contém cerca de 5% de ramificações α 1,6, como ilustrado na Figura 8. As cadeias ramificadas da amilopectina estão presentes na forma de dupla hélice resultando em estruturas cristalinas (Jane, 1995). O amido pode ser extraído de diferentes origens botânicas, assim a composição em termos de amilose e amilopectina pode variar de uma espécie para outra. O

amido de milho, por exemplo, contém aproximadamente 30% de amilose e 70% de amilopectina (Avella e col., 2002).

O amido é encontrado na forma granular semicristalina e possui propriedades mecânicas impróprias para uso em engenharia, porém, apresenta como atrativos uma alta biodegradabilidade e baixo custo. Além disso, o amido, quando degradado ou incinerado recicla o dióxido de carbono atmosférico que é fixado nas plantas produtoras de amido, evitando o aumento do aquecimento global (Bastioli, 2005).

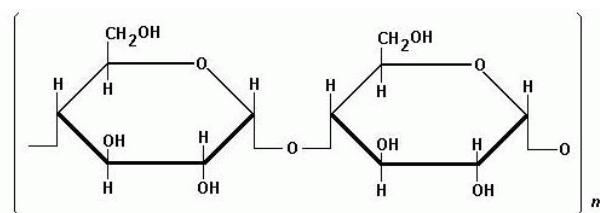


Figura 7. Estrutura da amilose: Unidades de glicose unidas por ligações glicosídicas α 1,4.

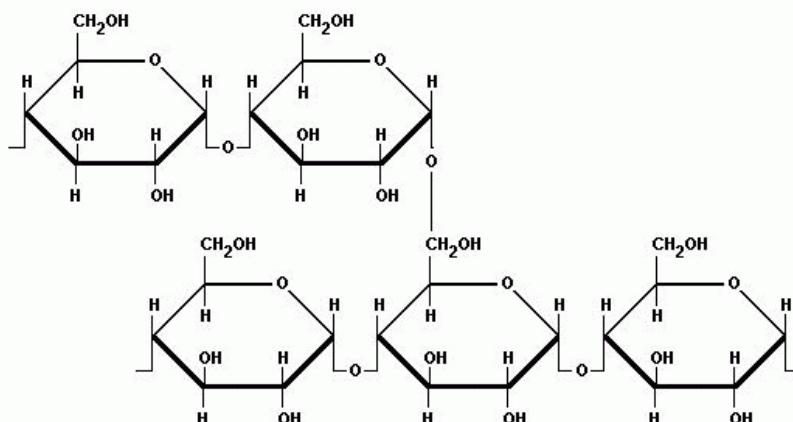


Figura 8. Estrutura da amilopectina: Unidades de glicose unidas por ligações glicosídicas α 1,4 e com pontos de ramificação α 1,6.

2.2.6.1 - Poli (ϵ -caprolactona) / Amido

Dentre os polímeros sintéticos biodegradáveis que vêm sendo estudados em blendas, está o poli (ϵ -caprolactona) (PCL), um poliéster alifático semicristalino, sintetizado através da

polimerização da ϵ -caprolactona, que possui boas propriedades mecânicas e alta compatibilidade com outros polímeros, entretanto a sua biodegradabilidade é lenta e o seu custo é alto.

Com o objetivo de aumentar a taxa de biodegradação do PCL, bem como de reduzir o custo total do material e aumentar a quantidade de material de fonte renovável, têm sido desenvolvidos compostos e blendas em diversas proporções de PCL e Amido (granular, termoplástico e modificado) (Bastioli, 1998; Averous e col.; 2000; Singh e col., 2003; Mariani e col.; 2007; Shin e col.; 2008).

Segundo Mariani e col., 2007, em trabalho realizado com a blenda de poli(ϵ -caprolactona)/amido modificado (50% de PCL, 35% de amido e 15% de óleo de soja epoxidado, %p/p), o amido foi responsável por aumentar a velocidade de biodegradação já que para o PCL puro a biodegradação foi de 50% e para a blenda 71%, em 180 dias de incubação em solo agrícola. Tokiwa e Calabia (2007) discutem que a degradação por lipase da blenda PCL/amido aumenta com o aumento da quantidade de amido na blenda, o que pode ser atribuído à maior área de superfície de contato do PCL após a mistura com o amido, aumentando acessibilidade da enzima.

De acordo com Murphy e col. (1996), a poli(ϵ -caprolactona) pode ser degradada por diversos microrganismos, incluindo alguns fitopatógenos (organismos patogênicos que atacam plantas). A grande maioria de fitopatógenos possui uma enzima (depolimerase) conhecida como cutinase, responsável por degradar o polímero que forma a parte estrutural da cutícula da planta, a qual exerce um papel importante nas propriedades de barreira da mesma. Fungos fitopatogênicos do gênero *Fusarium* secretam a depolimerase que hidrolisa o poliéster insolúvel em produtos solúveis em água. Assim, Murphy e col. (1996) determinaram que, em condições ótimas para a atividade enzimática, a *Fusarium* PCL depolimerase necessária para a degradação do PCL é a cutinase.

Ishii e col. (2008) isolaram diferentes linhagens fúngicas degradadoras de Poli (butileno succinato) (PBSU), dentre elas: *Aspergillus niger*, *Aspergillus fumigatus*, *Isaria fumosoroseus* e *Fusarium solani*. Essas linhagens também apresentaram degradação de PCL, podendo assim ser consideradas como um subgrupo das linhagens degradadoras de PCL. Já o gênero *Trichoderma* é representado por fungos não patogênicos, são habitantes do solo e exercem atividade antagônica a vários fitopatógenos, incluindo o gênero *Fusarium* (Menezes, 2009).

De fato, de acordo com Nishide e col. (1999), os fungos são os principais microrganismos responsáveis pela degradação de plásticos, como PCL, no solo, já que estes, quando incubados

em solo contendo fungicida, não apresentam degradação e quando em solos contendo antibióticos a biodegradação dos mesmos não é afetada.

2.2.6.2 - Blendas Biodegradáveis à base de proteína isolada de soja

A partir do início do século 20 as proteínas começaram a serem consideradas como matéria-prima com potencial para a manufatura de plásticos e desde 1980, as pesquisas acadêmicas com proteínas como base para materiais biodegradáveis de fontes renováveis ganharam espaço (Guilbert e Cuq, 2005).

Proteínas são heteropolímeros compostos de 20 aminoácidos diferentes, que variam suas características polares e apolares. Os aminoácidos possuem grupamentos que podem interagir formando ligações de hidrogênio; ligações iônicas; interações não polares e ligações covalentes, conferindo às proteínas potencial considerável para a formação de várias interações (Guilbert e Cuq, 2005).

Dentre as proteínas de origem vegetal, utilizadas na confecção de polímeros biodegradáveis, pode-se citar: Zeína (milho), Glúten (trigo), Proteína Isolada de Soja (PIS) e Proteína de amendoim (Swain e col., 2004). Assim como as outras, a proteína isolada de soja contém 90% de sua massa seca de proteína e é composta por 18 aminoácidos diferentes, com vários graus de polaridade. (Mohanty e col., 2002; Lehninger e col., 2005). Segundo Zhao e col. (2008), o caráter anfótero das proteínas permite sua migração entre interfaces polares-apolares como ar - água ou óleo – água.

A proteína isolada de soja, como outras proteínas, tem a vantagem de poder ser processada por extrusão como um termoplástico, utilizando plastificantes como o glicerol e o sorbitol, entre outros (Schmidt e Soldi, 2006; Zhou e col., 2008). Como relata Wang (1999), a PIS tem baixa fluidez, que pode ser melhorada com a adição de amido. Devido ao seu comportamento quebradiço, as pesquisas acadêmicas têm sido direcionadas para a blendagem da PIS com poliésteres biodegradáveis, como o Poli (ϵ -caprolactona), para obter materiais com boa compatibilidade e, por consequência, com melhores propriedades (Mungara e col., 2002; Deng e col., 2006).

Mungara e col. (2002), em trabalho realizado com blendas a base de proteína de soja, concluíram que as blendas de poliésteres alifáticos/proteína de soja apresentam boa processabilidade e baixa absorção de água.

2.2.7 - Interação PADs x ambiente: Efeitos ecotoxicológicos no processo de biodegradação

Uma das características mais importantes dos plásticos ambientalmente degradáveis (PADs) é que eles não devem interferir na ecologia e nem no crescimento de plantas e macrorganismos do solo (Scott, 2003).

Como os PADs são desenvolvidos para se decomporem por meio dos microrganismos presentes no ambiente, então é certo que esses polímeros terão certa interação com o ecossistema, já que os resíduos da degradação e os metabólitos podem ser produzidos e/ou enriquecidos no local (Fritz, 2005).

Karlsson e Albertsson (1995) e Kapanen e col. (2008) relatam que a avaliação da biodegradação apenas pela metodologia da respirometria pode não ser suficiente, uma vez que produtos como monômeros, solventes, iniciadores e aditivos, dentre outros, podem ser liberados durante o processo e causar sérios danos ao interagir com o meio ambiente. Segundo Fritz (2005), resíduos não degradados também podem ser a causa de toxicidade em função de seu acúmulo no ambiente.

Outro efeito negativo bastante relatado, de acordo com Fritz (2005), é causado pela presença de substâncias biodegradáveis que, durante o crescimento de plantas, podem liberar metabólitos tóxicos devido à decomposição inicial. A redução no crescimento vegetal também pode estar associada à atividade microbiana durante a decomposição de resíduos orgânicos, a qual pode ser indiretamente responsável pela alteração do pH e da demanda de O₂; entretanto, tais efeitos temporários podem ser revertidos assim que a biodegradação cessa. Deste modo, fica evidente que a avaliação da toxicidade do solo por meio de crescimento vegetal, após um processo de biodegradação, é um teste importante para a certificação de que este não tenha sido comprometido em termos de fertilidade, e que não houve liberação de substâncias tóxicas.

Em estudos realizados por Hakkarainen e Albertsson (2002), filmes de poli(ϵ -caprolactona) submetidos à biodegradação em meio líquido não apresentaram produtos de baixa

massa molecular média como o ácido 6-hidroxihexanóico, ou seu similar cílico desidratado (caprolactona), nem dímeros e trímeros cílicos após 14 dias de incubação, sugerindo que foram assimilados pelos microrganismos.

CAPÍTULO 3 – MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 – Materiais

Os materiais utilizados no desenvolvimento deste trabalho foram:

- Poli (ϵ -caprolactona) (PCL) P-787 fornecida pela Union Carbide do Brasil: massa molecular ponderal média 67.400 Da, temperatura de fusão \approx 60 °C e temperatura de transição vítreia \approx - 60 °C
- Amido de milho modificado SNOW-FLAKE® 6704, Corn Products Brasil;
- Proteína Isolada de Soja, Nutraceutics, com composição de aminoácidos apresentada na Tabela 2.
- Plastificante D-Sorbitol, Synth.
- Celulose microcristalina, Vetec.

Tabela 2. Aminoácidos presentes na Proteína Isolada de Soja.

Aminoácidos	Aminoácido/Proteína (mg g ⁻¹)
Arginina	71,0
Ácido Aspártico	107,0
Cisteína	12,0
Ácido Glutâmico	18,0
Glicina*	37,0
Histidina	24,0
Isoleucina *	38,0
Leucina*	69,0
Lisina	57,0
Metionina*	12,0
Fenilalanina*	48,0
Prolina*	47,0
Serina	5,0
Treonina	32,0
Triptofano*	9,0
Tirosina	36,0
Valina*	4,0

*Apolar (adaptado de Swain e col., 2004; Lehninger e col., 2005; Nutraceutics)

3.2 - Composição e preparação das blendas

As blendas foram constituídas de diversas formulações, onde se variaram as concentrações de PCL, amido e sorbitol, em um homogeneizador de alta rotação e cisalhamento, o qual foi utilizado devido à limitação de matéria-prima, já que este possibilita o preparo de pequenas quantidades de amostras.

Posteriormente o material foi prensado a quente, sendo selecionada a melhor formulação, aqui denominada F2, a qual apresentou superfície de fratura mais homogênea após a caracterização morfológica obtida por microscopia eletrônica de varredura. Usando a formulação 2 (F2) como base, iniciou-se a obtenção das formulações 3 e 4, com adição de proteína isolada de soja. As formulações utilizadas neste trabalho são apresentadas na Tabela 3.

Tabela 3. Identificação e composição das formulações de PCL/Amido com e sem PIS.

Formulações	PCL (%)	Amido (%)	Sorbitol (%)	Proteína Isolada de Soja (%)
F1	100,0	0,0	0,0	0,0
F2	40,0	40,0	20,0	0,0
F3	40,0	36,5	20,0	3,5
F4	40,0	29,0	20,0	11,0

3.3 – Processamento

Os componentes de cada formulação foram previamente pesados e homogeneizados manualmente. Cada mistura foi adicionada lentamente na zona de alimentação da extrusora mono-rosca horizontal, modelo: WEX-30/34D, série 298.11.02 da Wortex Plásticos, e rosca duplo filete, diâmetro= 30,0, L/D= 34/1, do Laboratório de Processamento do Depto. de Tecnologia de Polímeros da FEQ/Unicamp. O perfil de temperatura utilizado em suas seis zonas de aquecimento foi: 65/75/70/65/60/50 °C, e com velocidade de rotação da rosca de 20,0 rpm. Após esta etapa, cada formulação foi prensada, em prensa a 110 °C e 2200 psi, para

favorecer a abertura dos grãos de amido. As chapas de cada formulação foram então cortadas com moldes ASTM D 412 para ensaio mecânico e mantidas a 24 °C e 50% de umidade, conforme estabelece a norma.

3.4 - Caracterização das formulações

3.4.1 - Análise Elementar

A análise quantitativa de carbono, hidrogênio e nitrogênio das formulações, necessária para fazer a correção da relação C/N nos ensaios de biodegradação e para a padronização da quantidade de C adicionado ao solo, foi realizada em equipamento Perkin Elmer – Series II 2400, na Central Analítica do Instituto de Química da Unicamp.

3.4.2 - Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

As quatro formulações estudadas foram submetidas à técnica de calorimetria exploratória diferencial (DSC), a qual foi utilizada para a aquisição de importantes parâmetros térmicos como temperatura de fusão (T_m) e entalpia de fusão (ΔH_m) dos materiais obtidos. Os parâmetros térmicos foram determinados com o auxílio de um equipamento de calorimetria exploratória diferencial (DSC) da TA Instruments, modelo 2920, do Depto. de Tecnologia de Polímeros da FEQ/Unicamp, sob fluxo de nitrogênio e rampa de aquecimento de $10\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$. O grau de cristalinidade (X_c) foi calculado a partir da equação 1, descrita por Zhao e col., (2008):

$$X_c = \Delta H_m / (\Delta H_m^0 \times W) \times 100\% \quad (\text{Equação 1})$$

Sendo:

X_c = cristalinidade da amostra;

ΔH_m = entalpia de fusão experimental (Jg^{-1});

ΔH_m^0 = entalpia de fusão do PCL 100% cristalino ($\Delta H_m^0 = 136\text{ Jg}^{-1}$) (Avella e col., 2002);

W = fração mássica do componente PCL na formulação.

3.4.3 - Análise Termogravimétrica (TGA)

O comportamento térmico das formulações, submetidas ao aquecimento até a degradação de toda matéria orgânica, foi estudado em um analisador termogravimétrico, da TA Instruments (Modelo 2950, TGA), do Depto. de Tecnologia de Polímeros da FEQ/Unicamp. As análises foram realizadas com 20 mg de cada amostra, e aquecidas de 25°C a 550°C, a uma taxa de aquecimento de $10\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$, sob atmosfera de nitrogênio com fluxo de purga de 100 mL/min.

3.4.4 - Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A avaliação da morfologia da superfície e da seção transversal da amostra obtida após fratura criogênica, para as formulações 1-4, foi realizada em microscópio eletrônico de varredura Leica LEO 440i, do Laboratório de Recursos Analíticos e de Calibração (LRAC)/Faculdade de Engenharia Química da Unicamp. As condições utilizadas foram: 15 kV e 120 mA.

As amostras foram afixadas em suportes metálicos e cobertas com uma fina camada de ouro, por 180 s, num POLARON SC 7620 *Sputter Coater*.

Essa técnica também foi utilizada para avaliar a biodegradação da superfície das amostras testadas.

3.4.5 - Ensaios Mecânicos

As propriedades mecânicas das formulações à base de PCL/Amido foram medidas de acordo com a norma ASTM D412, em uma máquina de ensaio universal, EMIC DL 2000, do Bloco G do Instituto de Química/Unicamp. A umidade relativa e a temperatura do ambiente, durante a realização dos ensaios, foram mantidas a 50% e 24 °C, respectivamente, conforme dita a norma. Para cada formulação ensaiada foram utilizados, no mínimo, cinco corpos-de-prova. Nesse ensaio foi possível obter as propriedades de resistência à tração, alongamento e módulo elástico E.

3.4.6 - Cromatografia de Permeação em Gel (GPC)

A massa molecular média do PCL nas formulações, antes e após a biodegradação, foi obtida através da técnica de Cromatografia de Permeação em Gel (GPC), por meio do equipamento GPC avançado Viscotek, TDA 302 (*triple detector array*) da Faculdade de Engenharia Química da Unicamp. O sistema utilizado consiste de: um módulo solvente/amostra – Viscotek GPC máx VE-2001, Módulo Detectores - Viscotek TDA 302 (refractômetro, viscosímetro e *light scattering 90°*) e o Software Viscotek OmniSec v.4.1.0.224.

Condições Experimentais:

Preparo das amostras - As formulações foram solubilizadas em Tetrahidrofurano (THF), numa concentração de 4,5 mg mL⁻¹ (para o cálculo da concentração foi utilizada a fração mássica de PCL em cada formulação).

Injeção das amostras – As amostras foram injetadas em duas colunas (7,8 mm x 30 cm) ViscoGel I-MBHMW-3078 (Massa Molecular de até 10 milhões). A temperatura foi de 30 °C, o fluxo de 1,0 mL min⁻¹, sendo a fase móvel o solvente THF, filtrado e degaseificado. Foram utilizados na calibração dos detectores os seguintes padrões: Poliestireno (polyCal) de 115 e 400 K.

3.5 - Biodegradação em solo

Os ensaios de biodegradação em solo foram realizados no Laboratório de Microbiologia do Solo - Esalq/Usp. Foram utilizados para a realização deste ensaio, cinco solos com características diferentes, coletados em áreas distintas dos municípios de São Pedro e Piracicaba (São Paulo), todos eles sob a mesma vegetação, ou seja, gramínea. As amostras dos solos foram coletadas numa profundidade de 0-10 cm. Na primeira fase do estudo de biodegradação das formulações obtidas, foram utilizados apenas dois solos, de texturas diferentes, coletados no mês de novembro de 2007. Na segunda fase, foram utilizados cinco solos, dentre eles os dois anteriormente citados, todos coletados em novembro de 2008.

Os atributos químicos e físicos dos solos foram obtidos de acordo com as metodologias propostas por Raji e col. (2001) e Embrapa (1997), respectivamente. Os solos foram identificados com os números 1, 2, 3, 4 e 5 para facilitar os ensaios realizados posteriormente, sendo os solos 1

e 3 utilizados na primeira fase. As Tabelas 4, 5, 6 e 7 apresentam as características físicas e químicas dos solos utilizados no presente estudo.

Tabela 4. Características físicas dos solos utilizados nos experimentos de biodegradação de blendas a base de PCL/Amido.

Solo	CLASSIFICAÇÃO	AREIA (%)	SILTE (%)	ARGILA (%)	CLASSE TEXTURAL
1	Neossolo Quartzarênico	92,0	2,0	6,0	Arenosa
2	Latossolo Vermelho Amarelo Distrófico	80,0	2,0	18,0	Média-Arenosa
3	Nitossolo Vermelho Eutroférico	36,0	8,0	56,0	Argilosa
4	Argissolo Vermelho	68,0	4,0	28,0	Média-Argilosa
5	Cambissolo Háplico	76,0	4,0	20,0	Média- Arenosa

Tabela 5. Características químicas dos solos utilizados nos experimentos de biodegradação de blendas a base de PCL/Amido.

Solo*	pH	M.O.	P	K	Ca	Mg	H+Al	SB	T	V
	H ₂ O	g dm ⁻³	mg dm ⁻³				mmolc dm ⁻³			%
1	5,3	16	74	1,1	13	4	22	18,1	40,1	45
2	5,5	21	5	0,8	10	5	28	15,8	43,8	36
3	5,1	45	54	1,4	54	27	34	82,4	116,4	71
4	5,9	22	8	2,7	69	9	25	80,7	105,7	76
5	5,3	22	4	1,9	20	6	38	27,9	65,9	42

Onde: M.O. = matéria orgânica, P = fósforo, K = potássio, Ca = cálcio, Mg = magnésio, H + Al = Hidrogênio e Alumínio, SB = Soma de bases (Ca+K+Mg), T = Capacidade de troca catiônica (CTC), V = Saturação de bases.

Solo*: Solo 1= Neossolo Quartzarênico; Solo 2= Latossolo Vermelho Amarelo Distrófico, Solo 3= Nitossolo Vermelho Eutroférico, Solo 4= Argissolo Vermelho, Solo 5= Cambissolo Háplico.

Tabela 6. Nitrogênio nas formas amoniacial e nítrico dos solos utilizados nos experimentos de biodegradação de blendas à base de PCL/Amido.

Solo	N- amoniacial (ppm)	N – nítrico (ppm)
Neossolo Quartzarênico	126,0	120,0
Latossolo Vermelho Amarelo Distrófico	70,0	67,0
Nitossolo Vermelho Eutroférreico	115,0	104,0
Argissolo Vermelho	112,0	110,0
Cambissolo Háplico	123,0	125,0

Tabela 7. Carbono e Nitrogênio totais e relação C/N dos solos utilizados nos experimentos de biodegradação de blendas à base de PCL/Amido.

Solo	C total (g kg⁻¹)	N total (g kg⁻¹)	C/N
Neossolo Quartzarênico	9,28	0,25	37,12
Latossolo Vermelho Amarelo Distrófico	12,18	0,14	87,00
Nitossolo Vermelho Eutroférreico	26,10	0,22	118,64
Argissolo Vermelho	12,76	0,22	58,00
Cambissolo Háplico	12,76	0,25	51,04

3.5.1 – Respirometria

O teste realizado foi baseado no método da respirometria, segundo a norma ASTM D 5988 – 03 (*Standard test method for determining aerobic biodegradation in soil of plastic materials or residual plastic materials after composting*) e na metodologia proposta por Anderson (1982). As duas metodologias são utilizadas no ensaio com o intuito de aperfeiçoar a captura do CO₂ liberado pelos microrganismos durante a biodegradação do polímero, já que pela norma ASTM D 5988-03, a solução alcalina de hidróxido de bário (BaOH) é indicada para capturar o CO₂, que, pode formar um filme na superfície, impedindo a absorção do CO₂. Dessa forma, foi feita a adaptação da metodologia de Anderson (1982), que utiliza solução de hidróxido de sódio (NaOH) para a mesma finalidade.

Para a realização da primeira fase deste experimento os ensaios foram divididos em: solos de textura argilosa e arenosa, com e sem adição de solução de fosfato de amônio ((NH₄)₂HPO₄) (4,72 g L⁻¹), solução indicada pela norma ASTM para o ajuste da relação C/N do material para 20:1. Para cada condição foram adicionadas as quatro formulações, além da celulose microcristalina, utilizada como referência em testes de biodegradação. Todos os ensaios foram feitos em triplicatas.

Para cada solo e condição (com e sem solução de fosfato de amônio) foram utilizados frascos de vidro de 2,0 L, com tampas vedantes, contendo 300,0 g de solo peneirado a 2,0 mm e a dose de C adicionada na forma de plástico foi de 1,2 mg C g⁻¹ solo. Este valor corresponde ao valor intermediário do sugerido pela norma ASTM D 5988-03 já que, segundo César e col. (2009), doses muito baixas ou muito altas podem superestimar ou subestimar a mineralização, ou seja, a baixa quantidade de C adicionada ao solo pode acelerar a biodegradação, enquanto que o contrário pode ocorrer quando há uma alta quantidade de carbono. César e col. (2009) apresentam dados em que valores intermediários de C produzem resultados mais confiáveis de mineralização das formulações à base de PCL/amido. A umidade dos solos foi corrigida a 60% da capacidade máxima de retenção de água, e a solução de fosfato de amônio, utilizada para ajustar a relação C/N em 20:1, variou de acordo com a relação carbono/nitrogênio de cada formulação.

Para a segunda fase, as condições experimentais foram as mesmas da primeira, porém foram selecionadas apenas as formulações 2 e 3, em função da ausência e presença de nitrogênio,

respectivamente, e pela formulação 3 ter apresentado as melhores propriedades mecânicas. Os cinco solos utilizados (vide Tabela 4) também foram subdivididos em: com e sem adição de solução de fosfato de amônio ($4,72 \text{ g L}^{-1}$).

A quantificação do dióxido de carbono (CO_2) liberado pela biodegradação dos materiais incubados, nos diferentes tratamentos, foi realizada por meio da utilização de pequenos recipientes contendo solução de $\text{NaOH} 0,5 \text{ M}$, colocados dentro dos frascos de vidro com o solo e os materiais incubados, a fim de capturar o CO_2 produzido durante a respiração dos microrganismos.

A sala para respirometria foi mantida a 28°C e, em intervalos de 2 ou 3 dias, o recipiente com a soda foi retirado e 1,0 mL de solução saturada de cloreto de bário (BaCl_2) foi adicionado para a precipitação do carbonato. A solução excedente de $\text{NaOH} 0,5 \text{ M}$ foi então titulada com $\text{HCl} 0,5 \text{ M}$. Imediatamente depois, o recipiente com o mesmo volume de $\text{NaOH} 0,5 \text{ M}$ recém preparado foi adicionado para novo período de incubação. Essas avaliações foram feitas duas vezes por semana, nos primeiros 90 dias, passando a uma vez por semana nos últimos 90 dias.

A mineralização (quantidade de $\text{C}_{\text{polímero}}$ convertido em CO_2) das formulações foi calculada conforme a Equação 2:

$$\text{Mineralização (\%)} = \frac{\text{MpCO}_2}{\text{MtCO}_2} \times 100 \quad (\text{Equação 2})$$

onde:

MpCO_2 = Massa de dióxido de carbono produzido (mg)

MtCO_2 = Massa de dióxido de carbono total teórico (mg)

3.5.2 - Determinação do carbono da biomassa microbiana (CBM)

O carbono referente à biomassa microbiana foi obtido antes e após a biodegradação dos materiais através da metodologia de Fumigação-Extração (Vance, Brooks e Jenkinson, 1987), no Laboratório de Microbiologia do Solo - Esalq/Usp. Esta técnica envolve a eliminação da microbiota do solo por fumigação com clorofórmio, de modo que o carbono liberado pela morte dos microrganismos pode ser determinado por extração.

Para cada tratamento (tipo de solo, com e sem solução de fosfato de amônio, materiais e períodos distintos) foram retiradas duas alíquotas de 10 g de terra. A primeira foi fumigada por 24 horas em dessecador contendo um bêquer com clorofórmio e a segunda (não-fumigada) foi mantida em temperatura ambiente pelo mesmo período. Ambas foram submetidas à extração com K₂SO₄ 0,5 M em agitador contínuo por 30 minutos e, posteriormente, filtradas em papel filtro Whatman faixa azul (diâmetro = 12,5 cm). Uma sub-amostra (8 mL) da solução extraída foi misturada com 2 mL de K₂Cr₂O₇ 0,0667 M e 15 mL de H₂SO₄ e H₃PO₄ (2:1) e mantidas em banho aquecido a 90 °C por 30 minutos para oxidar o carbono.

Após o resfriamento, foram adicionados 25 mL de H₂O deionizada. O excesso de dicromato foi titulado com sulfato ferroso amoniacial 0,0333 M e ferroína como indicador, revelando a quantidade de dicromato utilizado na oxidação e, assim, a quantidade de carbono extraído.

A biomassa microbiana foi calculada pela Equação 3:

$$\text{CBM} (\mu\text{g C g}^{-1}\text{solo}) = \frac{(C_f - C_{nf})}{K_{ec}} \quad (\text{Equação 3})$$

onde:

CBM= Carbono da Biomassa Microbiana

C_f e C_{nf}= Carbono extraído das amostras fumigada e não fumigada, respectivamente;

K_{ec} = Constante que representa a proporção do total do carbono microbiano extraído após fumigação. O valor de K utilizado no presente estudo foi de 0,33.

3.5.3 - Identificação dos microrganismos degradadores

O Isolamento e identificação dos microrganismos degradadores dos materiais obtidos foram realizados no Laboratório de Microbiologia do Solo - Esalq/Usp.

Pequenos pedaços dos materiais incubados nos solos foram dispostos em placas de Petri contendo meio de cultura batata dextrose Agar (BDA) e, após serem mantidos em sala a 28 °C por 48-72 h, os fungos crescidos foram isolados e, com o auxílio de microscópio óptico foram identificados quanto ao gênero.

3.5.4 - Extração e Identificação dos produtos da degradação

As amostras retiradas dos solos, nos diferentes intervalos de tempo, para o primeiro experimento de biodegradação, foram submetidas à extração dos produtos intermediários, conforme metodologia proposta por Hakkainen e Albertsson (2002).

Pedaços de 100 mg de cada amostra foram mantidos em 1,0 mL de éter etílico por uma hora.

Os produtos da degradação foram identificados por um cromatógrafo a gás acoplado a um espectrômetro de massa: CG/EM modelo HP5970B, HP do Instituto de Química/Unicamp.

As condições utilizadas nas análises foram:

Coluna: 30 m x 0,25 mm x 0,25 um, fase estacionária: CWax-20 da Ohio Valley, Injetor: 220 °C, Gás de arraste: He (99.9995% de pureza), pressão constante 80 kPa.

Detector: MSD (Detector seletivo de massas), 240 °C, Corte de solvente: 4 minutos.

Método: temperatura inicial 40 °C, tempo inicial 1 minuto, 8 °C min⁻¹, 240 °C tempo final 15 minutos.

3.6 – Avaliação da toxicidade

3.6.1 - Teste de Germinação

A toxicidade do solo, após a biodegradação dos materiais, foi avaliada através de teste de germinação, de acordo com a norma ASTM E 1963 – 02 (*Standard guide for conducting terrestrial plant toxicity test*). A espécie vegetal escolhida foi a *Brassica oleraceae*, nome popular: couve-flor. As sementes de couve-flor foram cedidas pelo laboratório de Análise de Sementes (ESALQ/USP) e os testes de germinação foram conduzidos no mesmo laboratório.

200 g de terra proveniente dos ensaios de biodegradação (solo arenoso e argiloso, com e sem adição de fosfato de amônio e repetições, do primeiro teste de biodegradação) foram adicionados em caixas de acrílico medindo 11,0 × 11,0 × 3,5 cm. Em cada caixa foram semeadas 40 sementes, numa profundidade de 0,5 cm. Os solos incubados sem os materiais durante o ensaio de biodegradação foram utilizados como controle.

Para a correção da umidade foi utilizada a metodologia da capacidade máxima de retenção de água, sendo adicionado o equivalente a 60% da capacidade de retenção de água nas caixas

contendo o solo arenoso e argiloso. As caixas foram dispostas em um germinador LAB-TECH INC, modelo D-7440, com fotoperíodo: 16 h sem luz à 20 °C e 8 h com luz à 30 °C.

A contagem das plântulas germinadas ocorreu no 5°, 7° e 14° dia, após a montagem do experimento, sendo expressa como porcentagem de germinação.

3.6.2 - Massa seca da parte aérea

Vinte plântulas emergidas de cada tratamento foram colhidas no 14° dia, após o início do experimento, lavadas e separadas as partes aérea (descartaram-se as raízes, as folhas e os restos de sementes). Estas foram então secas em estufa com ventilação forçada de ar a 70 °C. A massa seca da parte aérea foi determinada após 24 h.

3.7 - Análise Estatística

Os resultados obtidos nos ensaios de propriedades mecânicas, biodegradação (experimentos I e II), germinação e massa seca da parte aérea foram submetidos a tratamentos estatísticos, os quais foram baseados em análise de variância (ANOVA) e diferença entre médias pelo teste de Tukey, com nível de significância a 5%. Os dados foram analisados pelo software “SAS for Windows” (SAS, 2000).

CAPÍTULO 4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste trabalho foram preparadas blendas de PCL/Amido de milho modificado/proteína isolada de soja, de modo a obter materiais com diferentes relações carbono/nitrogênio (C/N). As blendas obtidas foram caracterizadas quanto às propriedades térmicas, mecânicas e morfológicas e, posteriormente quanto à biodegradação e ausência de toxicidade dos materiais (acompanhada pela germinação de sementes de *Brassica oleraceae*) após a decomposição dos mesmos em solos de diferentes texturas, com ou sem a adição de fertilizantes para a correção da relação C/N.

4.1 - Caracterização das formulações

4.1.1 - Análise elementar

A análise elementar dos materiais comprovou que o ajuste da relação C/N da formulação F2 foi obtido após a incorporação da proteína isolada de soja (PIS), como pode ser observado na Tabela 8, onde as formulações F3 e F4 apresentam diferentes relações C/N.

Tabela 8. Alteração da relação C/N das formulações de acordo com a incorporação de proteína isolada de soja.

Formulação	% C	% N	C/N
	Média	Média	
F1	63,39	0,00	-
F2	49,09	0,00	-
F3	49,10	0,60	81,83
F4	48,75	1,73	28,18

De acordo com Kihel (2002), a relação C/N ideal para a biodegradação de resíduos orgânicos em sistema de compostagem é de 30:1, pois o tempo necessário para que ocorra a decomposição e a consequente mineralização é governado pela relação entre C e N da matéria. Assim a formulação F4 foi a que apresentou relação C/N mais próxima do ideal.

4.1.2 - Cromatografia de Permeação em Gel (GPC)

A massa molecular ponderal média (Mw) do PCL, antes do processamento, e da fração de PCL das formulações (F1-F4) após o processamento, foi obtida através da técnica de cromatografia de permeação em gel (GPC). Observa-se, pela Tabela 9, que o processamento foi responsável pela redução da massa molecular média do PCL, bem como a adição das diferentes proporções de amido, PIS e sorbitol nas formulações, sendo a formulação F4, com maior quantidade de PIS, a que apresentou redução brusca na massa molecular média. Como a PIS também possui aminoácidos hidrofilicos, esta pode favorecer a presença de água e consequentemente a hidrólise das cadeias de PCL.

O índice de polidispersividade da fase PCL tende a aumentar nas diferentes formulações, indicando a presença de um maior número de cadeias poliméricas de menor tamanho resultantes da cisão das cadeias durante o processamento.

Tabela 9. Massa Molecular ponderal média (Mw) e índice de polidispersividade (Mw/Mn) do PCL não extrudado e da fração PCL das quatro formulações obtidas.

Formulações	Mw (Da)	Mw/Mn
PCL (não extrudado)	67.432	1,7
F1	54.671	3,0
F2	58.910	2,0
F3	51.884	2,4
F4	46.523	2,4

É importante ressaltar que o amido de milho modificado SNOW-FLAKE® 6704 e a proteína isolada de soja não apresentaram picos nos cromatogramas obtidos por GPC quando solubilizados em Tetrahidrofuran, sendo considerada apenas a fração de PCL das blendas como solúvel em THF. Os cromatogramas das análises podem ser visualizados no Anexo I deste trabalho.

4.1.3 - Calorimetria Diferencial Exploratória (DSC)

A Tabela 10 apresenta os parâmetros térmicos obtidos por DSC do PCL nas quatro formulações utilizadas no presente estudo.

É possível observar que a temperatura de fusão do PCL diminui com a adição de amido, proteína isolada de soja e sorbitol, independentemente da proporção.

Quando os componentes de uma formulação correspondem a polímeros semi-cristalinos, a diminuição da temperatura de fusão é um método freqüentemente utilizado para estudar a miscibilidade entre os componentes, visto que quando ocorre alguma miscibilidade entre eles, há a diminuição da temperatura de fusão no equilíbrio (Kumar e Gupta, 1988). Outra possibilidade é a presença de impurezas, que em nossos sistemas podem ser atribuídas à outra fase presente (amido e/ou PIS) que, embora tenha baixa miscibilidade, pode se inserir entre as cadeias da fase cristalina e interferir na cristalização e perfeição dos cristais.

De acordo com Choi e col. (2006), a temperatura de fusão deve ser constante na ausência de interações entre os constituintes da blenda.

No caso da entalpia de fusão, pode-se observar uma redução significativa nas blendas F2, F3 e F4 em relação ao PCL puro (F1); entretanto, esse parâmetro tende a aumentar, para F3 e F4 em relação a F2, com o aumento da quantidade de PIS incorporada, provavelmente pela redução na quantidade de amido. Em estudo sobre as propriedades físicas de blendas de PCL/Amido com e sem anidrido maleico, Wu (2003) observou a redução da cristalinidade das blendas, o que atribuiu à dificuldade das cadeias poliméricas se rearranjarem na presença dos grãos de amido.

Zhong e Sun (2001), em estudo realizado com blendas à base de PCL/PIS, através da técnica da calorimetria diferencial exploratória, observaram redução na entalpia de fusão e na cristalinidade das blendas com o aumento da quantidade de PIS incorporada. Assim, sugere-se que a tendência de aumento da entalpia de fusão e da cristalinidade, de acordo com o aumento da quantidade de PIS e redução de amido nas blendas obtidas no presente estudo, esteja relacionada ao aumento da compatibilidade entre o PCL e alguns aminoácidos hidrofóbicos da proteína isolada de soja.

Tabela 10. Parâmetros térmicos e cristalinidade do PCL nas formulações a base de PCL/Amido e PCL/Amido/Proteína Isolada de Soja.

Formulações	T_m (°C) ¹	ΔH_m (Jg ⁻¹) ²	Xc (%) ³
F1	64,3	81,1	59,7
F2	60,7	30,0	55,1
F3	60,0	34,4	63,2
F4	60,8	42,0	77,1

1 = Temperatura de fusão, 2 = Entalpia de fusão, 3 = Grau de cristalinidade.

Como sugere Canevarolo (2006), a cristalização pode ser favorecida pela existência de grupos que promovam fortes ligações intermoleculares secundárias, tais como grupos polares ou que permitam a formação de pontes de hidrogênio entre as moléculas. As curvas obtidas na análise de calorimetria exploratória diferencial (DSC) podem ser visualizadas no anexo II do presente trabalho.

4.1.4 - Análise termogravimétrica (TGA)

A Figura 9 apresenta as curvas obtidas por meio de análise termogravimétrica (TGA), as quais representam o comportamento térmico das formulações em função da temperatura. É possível observar que as Figuras 9b, 9c e 9d, as quais representam as blendas contendo amido modificado (F2) e amido modificado e PIS (F3 e F4), apresentam o mesmo perfil de decomposição, sendo a perda de massa inicial na faixa de 100 - 120 °C, o que, de acordo com Dean e col. (2007), pode ser atribuído à água, já que os biopolímeros adicionados às formulações são hidrofílicos. Em relação às formulações F2, F3 e F4 observam-se também duas regiões distintas de degradação, as quais podem ser relacionadas à decomposição do amido. Como a perda de massa inicial do PCL se dá a 370 °C (Figura 9a), conclui-se que a adição do amido é responsável pela redução na estabilidade térmica da blenda, pois, segundo Avella e col. (2002), a temperatura de degradação térmica do amido é 260 °C.

Observa-se também que a adição da PIS não causou nenhuma alteração na degradação térmica das formulações F3 e F4, quando comparadas à F2, já que apresentam o mesmo comportamento térmico, sugerindo que a incorporação de proteína isolada de soja não afeta a

estabilidade térmica da formulação. Segundo Soares e col. (2005), o amido é responsável pela redução da estabilidade térmica quando incorporado em filmes de PIS.

Observou-se que há presença de resíduos em temperaturas acima de 450 °C, sendo o maior resíduo encontrado para a formulação F4 (11%), a qual apresenta a maior quantidade de PIS. De acordo com Dean e col. (2007), blends de PCL e amido produzem cerca de 5% de resíduo a temperaturas acima de 450 °C, e segundo Soares e col. (2005), esse resíduo pode ser atribuído aos compostos inorgânicos derivados da degradação térmica.

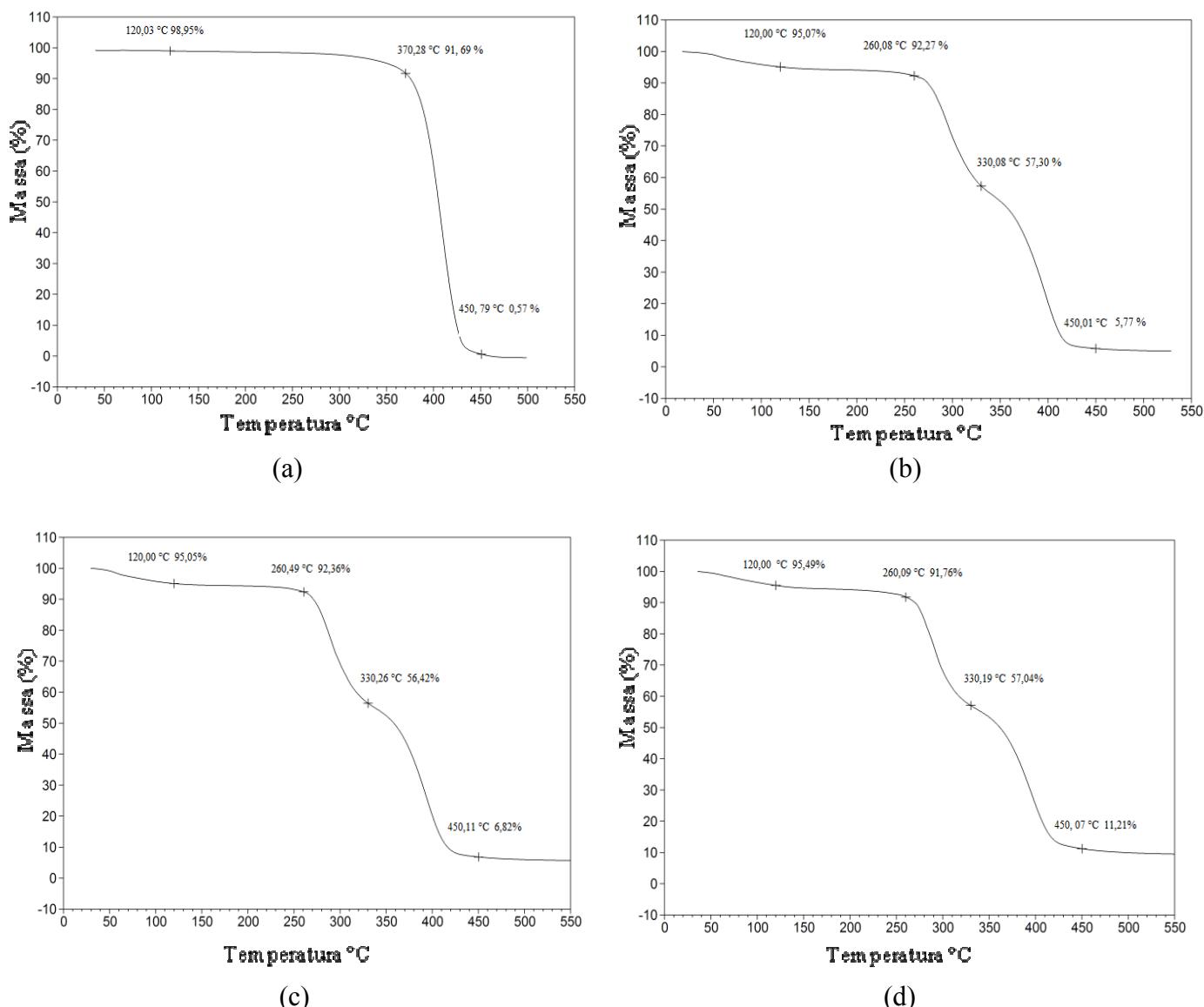


Figura 9. Comportamento térmico das formulações obtido por TGA: (a) F1, (b) F2, (c) F3 e (d) F4.

A derivada primeira das curvas termogravimétricas apresentadas na Figura 9 pode ser visualizada no Anexo III deste trabalho.

4.1.5 - Morfologia

As micrografias da seção transversal das amostras crio-fraturadas, obtidas por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) (Figuras 10-13), mostram que a adição de amido (Figura 11) ou da associação amido/PIS à matriz PCL, em diferentes concentrações (Figuras 12 e 13), reduz a fase homogênea representada pelo PCL puro (Figura 10), mas, por outro lado, apresenta uma dispersão homogênea do amido e do amido/PIS na matriz. Também foi possível observar, através da Figura 13, que o aumento de PIS incorporada causa uma segregação de fases nítida (Vide círculos Figura 13), quando comparada com a Figura 12, onde a porcentagem de PIS foi menor. A segregação de fases na formulação 4 pode ser melhor visualizada através da micrografia apresentada na Figura 14.

Como comentado por vários autores, a baixa adesão dos grãos de amido na matriz de PCL é uma indicação de uma interação interfacial muito pobre, o que pode causar a redução das propriedades mecânicas das blendas [Wang (1999); Ishiaku e col. (2002); Wu (2003) e Odusanya e col. (2003)].

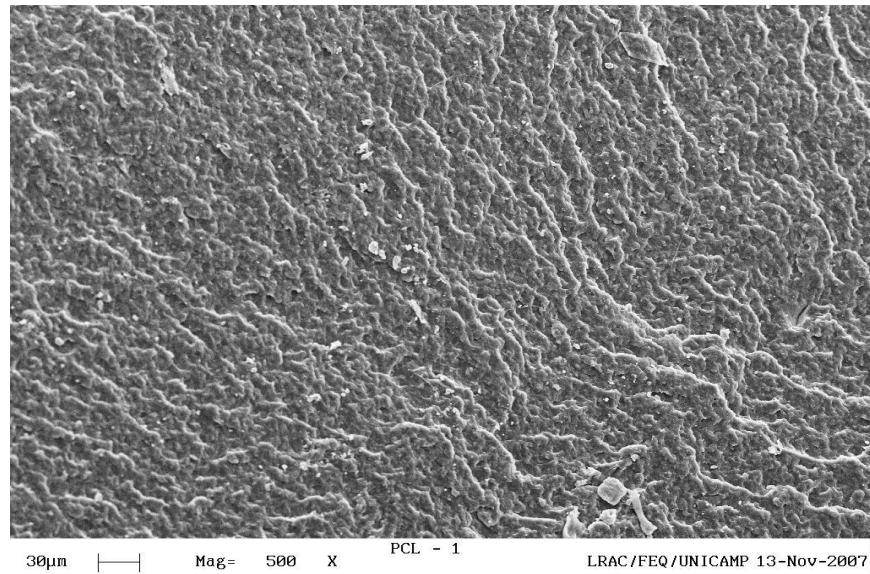


Figura 10. Micrografia da seção transversal da fratura da formulação F1, magnitude 500x.

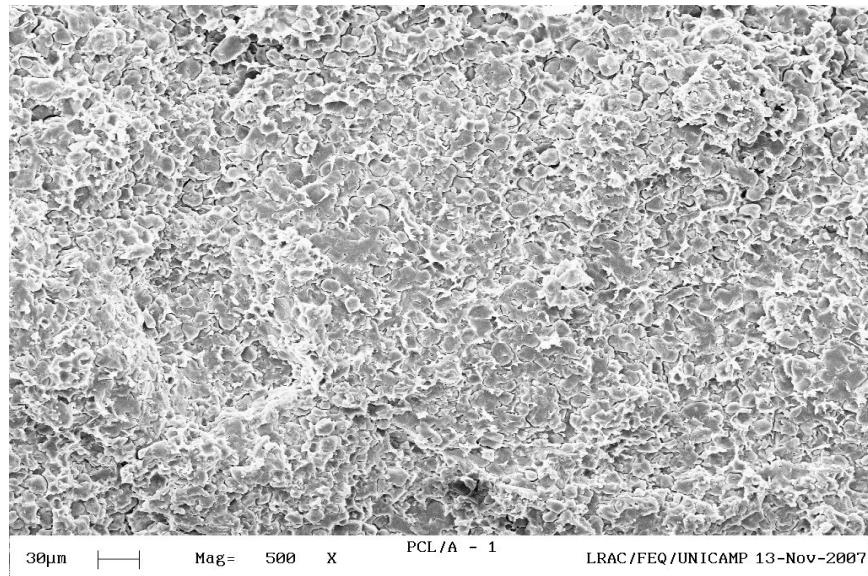


Figura 11. Micrografia da seção transversal da fratura da formulação: F2, magnitude 500x.

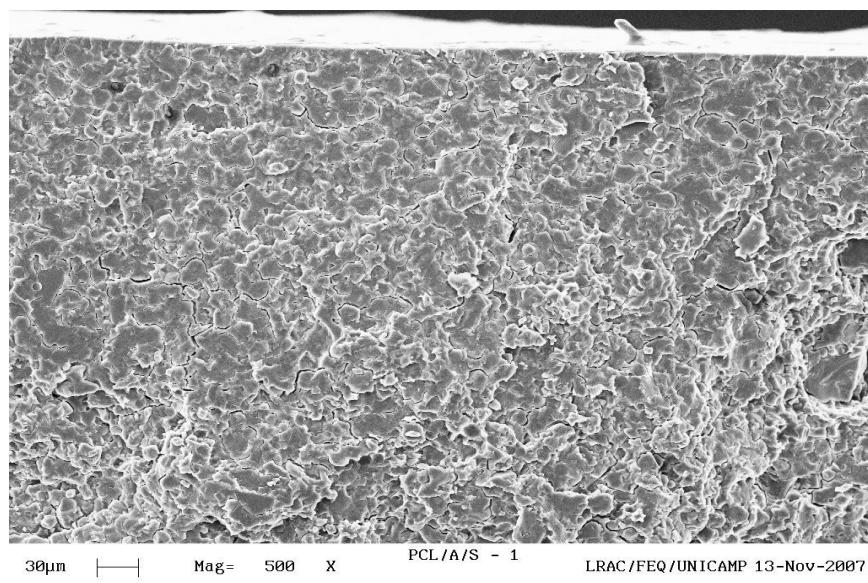


Figura 12. Micrografia da seção transversal da fratura da formulação: F3, magnitude 500x.

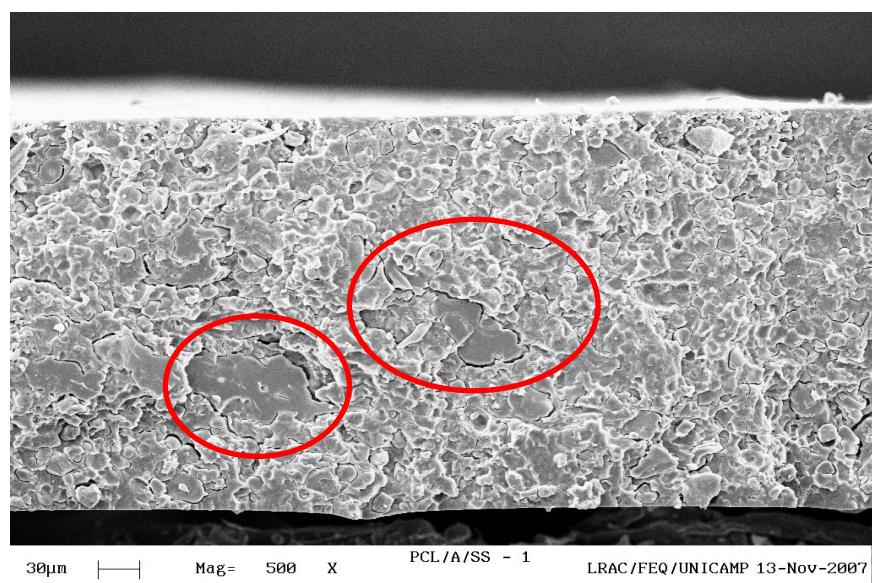


Figura 13. Micrografia da seção transversal da fratura da formulação: F4, magnitude 500x.

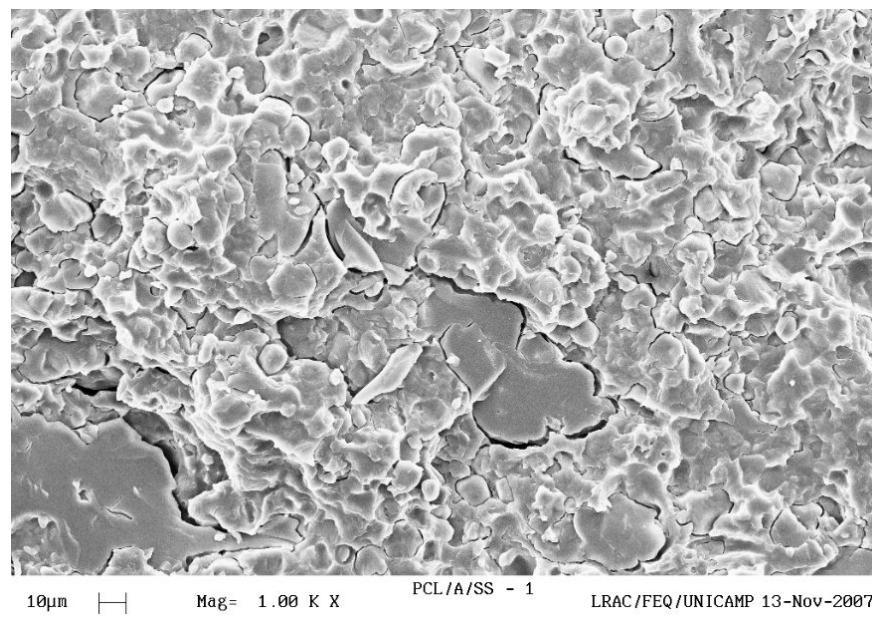


Figura 14. Micrografia da seção transversal da fratura da formulação: F4, magnitude 1000x.

4.1.6 - Propriedades Mecânicas

As blendas à base de PCL/Amido estudadas apresentaram redução significativa nas propriedades mecânicas, como resistência à tração, alongamento e módulo elástico, quando comparadas ao PCL puro, motivando uma análise estatística desses atributos que foi realizada apenas para as formulações F2, F3 e F4 (Tabela 11). É possível observar a redução drástica nos parâmetros quando amido e sorbitol, na presença ou ausência de PIS, são adicionados nas formulações F2, F3 e F4. A adição do amido (F2) e da associação amido/PIS (F3 e F4) ao PCL reduziram a resistência à tração e a porcentagem de alongamento em cerca de 70% e 60%, respectivamente. Em trabalho realizado com blendas de PCL e amido de sagu, Odusanya e col. (2003) concluíram que não há interação química forte entre esses dois componentes, o que acarreta na formação de espaços vazios nas interfaces. Tais espaços são responsáveis pelas falhas no material, o que causa a redução na resistência durante a deformação mecânica. Segundo Wu (2003), quanto maior é a fase dispersa, menor é a resistência da blenda, devido às fracas interações interfaciais.

Num trabalho realizado com blendas de amido e diferentes proteínas, Wang (1999) observou que o amido é bastante quebradiço e possui propriedades mecânicas pobres, mas quando misturado a proteínas, essas propriedades são melhoradas.

A presença de PIS na formulação F3 foi responsável pelo aumento da resistência à tração e do alongamento, a qual diferiu significativamente ($P < 0,002$ e $P < 0,034$, respectivamente) das demais formulações. Já para o parâmetro módulo, a formulação F4 foi significativamente maior ($P < 0,013$) que a formulação F3.

Tabela 11. Propriedades mecânicas das formulações à base de PCL e amido.

Formulação	Resistência à Tração (MPa)	Alongamento (%)	Módulo Elástico (MPa)
F1	$24,9 \pm 2,1$	$5,5 \pm 0,7$	$230,9 \pm 49,4$
F2	$4,6 \pm 1,1^a$	$1,8 \pm 0,3^a$	$141,9 \pm 9,5^{ab}$
F3	$7,6 \pm 0,9^b$	$2,4 \pm 0,1^b$	$108,9 \pm 20,6^a$
F4	$5,7 \pm 1,2^a$	$1,9 \pm 0,4^{ab}$	$158,6 \pm 31,3^b$

Médias com letras sobrescritas diferentes, na mesma coluna, diferem entre si (Tukey, $P < 0,05$)

De acordo com Guilbert e Cuq (2005), as propriedades mecânicas dos materiais à base de proteínas podem ser parcialmente relacionadas à distribuição e à intensidade de interações intra e intermoleculares, que ocorrem nas estruturas primárias e espaciais, bem como interações com outros componentes. Efeitos de interações dependem da probabilidade de ocorrência e da energia envolvida, e, consequentemente, as propriedades mecânicas são relativamente dependentes dessas interações. Assim, quando a energia das ligações que estabilizam a conformação polimérica é alta, os materiais são basicamente muito resistentes e relativamente elásticos. Ao contrário, quando as principais relações inter-proteína envolvidas são de baixa energia, então os materiais resultantes são altamente dúcteis. Observou-se no presente trabalho que a concentração de proteína isolada de soja pode alterar as propriedades mecânicas das blendas, provavelmente em função das diferentes ligações que podem ocorrer entre os componentes.

Embora as blendas tenham apresentado baixas propriedades mecânicas, em algumas aplicações não há necessidade de alta resistência, como no caso de tubetes para mudas de plantas.

4.2 - Biodegradação em solo – Fase I

Nesta fase estudou-se o efeito da variação de textura do solo, com e sem a adição de fertilizante nitrogenado para correção do solo, além das diferentes formulações e suas relações C/N.

É possível observar, pelas Figuras 15, 16, 17 e 18, que o comportamento dos diferentes materiais, durante o período de incubação, variou com a textura do solo e com a adição, ou não, de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$. No solo arenoso com a adição de fertilizante (Figura 15), as quatro blendas apresentaram comportamento parecido com a curva de crescimento microbiano, na qual a primeira etapa chamada de fase log ou exponencial é onde ocorre o crescimento em taxa acelerada dos microrganismos, posteriormente há a fase de estabilização, a qual é marcada pelo não crescimento da população já que os nutrientes começam a ficar escassos e os produtos tóxicos tornam-se abundantes.

Por fim a fase chamada declínio onde os microrganismos começam a morrer não foi atingida no presente trabalho.

No solo arenoso sem a adição de fertilizante (Figura 16) os materiais que não continham N na forma de PIS (F1 e F2) apresentaram comportamento diferente, ou seja, a mineralização ocorreu

numa taxa mais lenta e constante, resultando num processo linear. Dessa forma observou-se que aos 60 dias de incubação a mineralização das formulações no solo arenoso com fertilizante foi praticamente o dobro da outra condição (solo arenoso sem adição de fertilizante), embora a mineralização total (após 180 dias de incubação) tenha sido menor.

Um comportamento comum observado, para os dois solos com ou sem adição de N fertilizante, foi que a amostra com menor relação C/N (F4) apresentou mineralização acelerada, em relação às outras, nos primeiros 60 dias de incubação, corroborando os resultados da literatura a respeito da relação direta entre mineralização e razão carbono/nitrogênio do material. De acordo com Moreira e Siqueira (2006), dependendo da relação carbono/nitrogênio (C/N) do material pode haver esgotamento do N, para $C/N > 30$, ou mineralização se $C/N < 20$.

Após esse período, a porcentagem de emanação de C-CO₂ ficou praticamente estável; sendo o tratamento “Argiloso sem adição de (NH₄)₂HPO₄”, (Figura 18), aquele em que a F4 apresentou maior mineralização, em relação às outras formulações, do início até o final do experimento.

Observou-se, também, que a adição da solução de fosfato de amônio, nos dois solos, foi responsável pela redução na mineralização total (após 180 dias de incubação) das formulações, sendo a celulose microcristalina (material utilizado como referência) a que mais apresentou essa tendência.

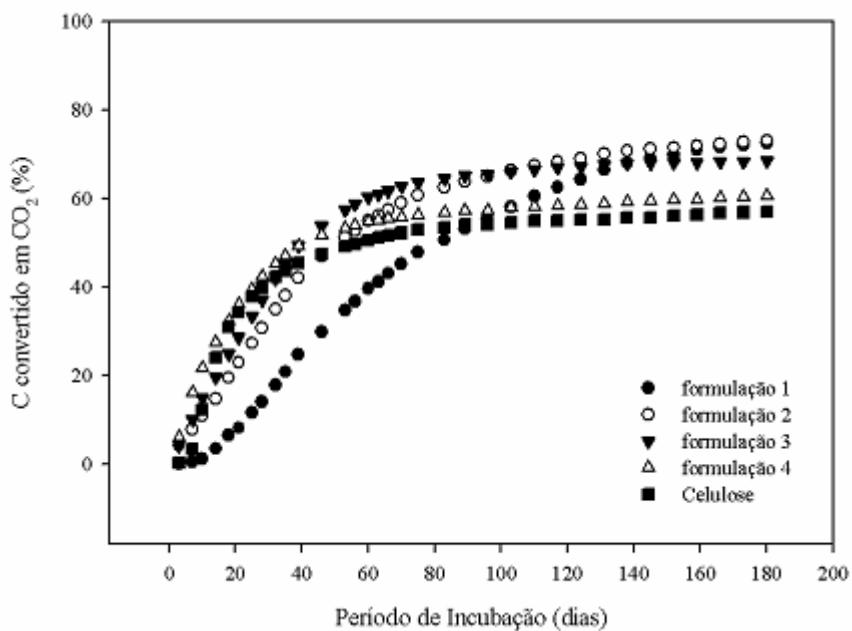


Figura 15. Comportamento das blendas F1, F2, F3 e F4 e da celulose incubadas por 180 dias no solo de textura arenosa com adição de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$.

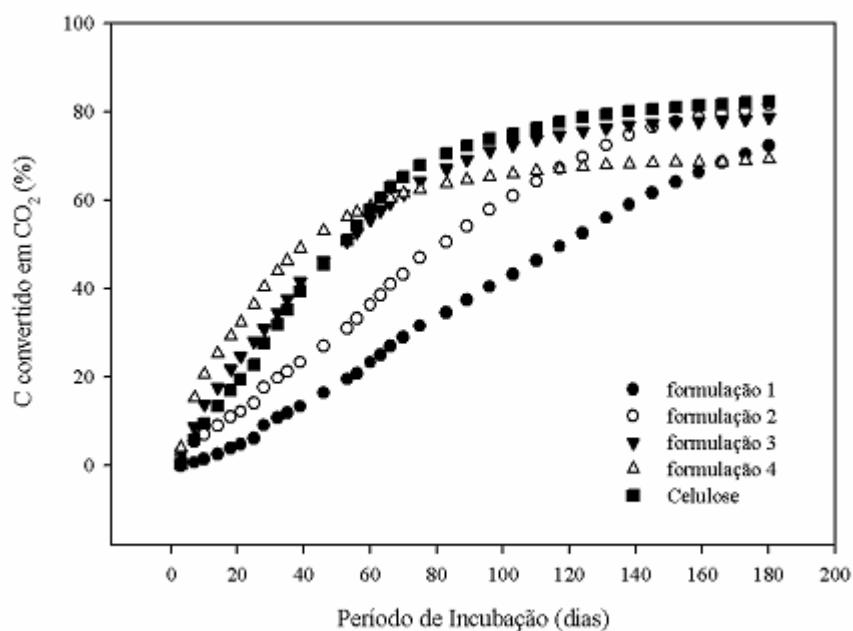


Figura 16. Comportamento das blendas F1, F2, F3 e F4 e da celulose incubadas por 180 dias no solo de textura arenosa sem adição de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$.

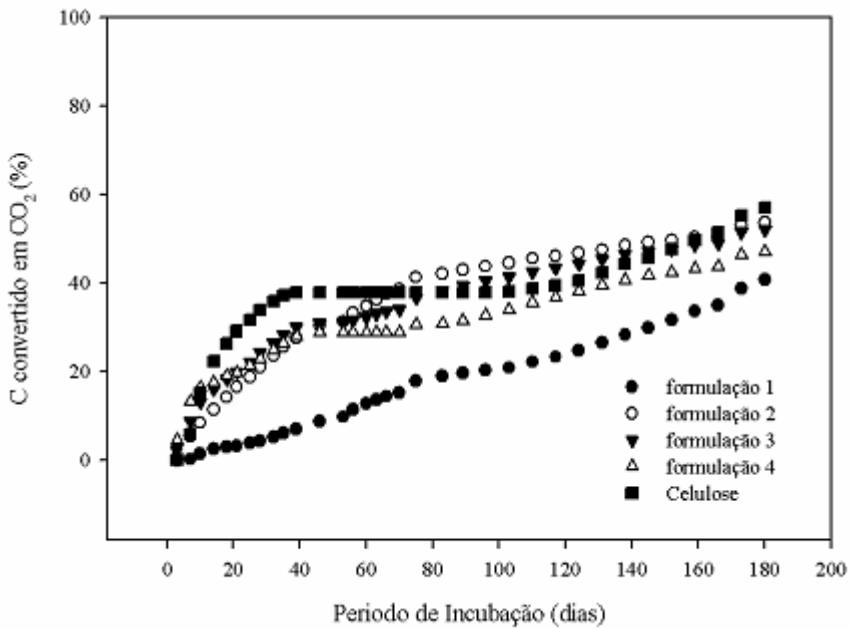


Figura 17. Comportamento das blendas F1, F2, F3 e F4 e da celulose incubadas por 180 dias no solo de textura argilosa com adição de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$.

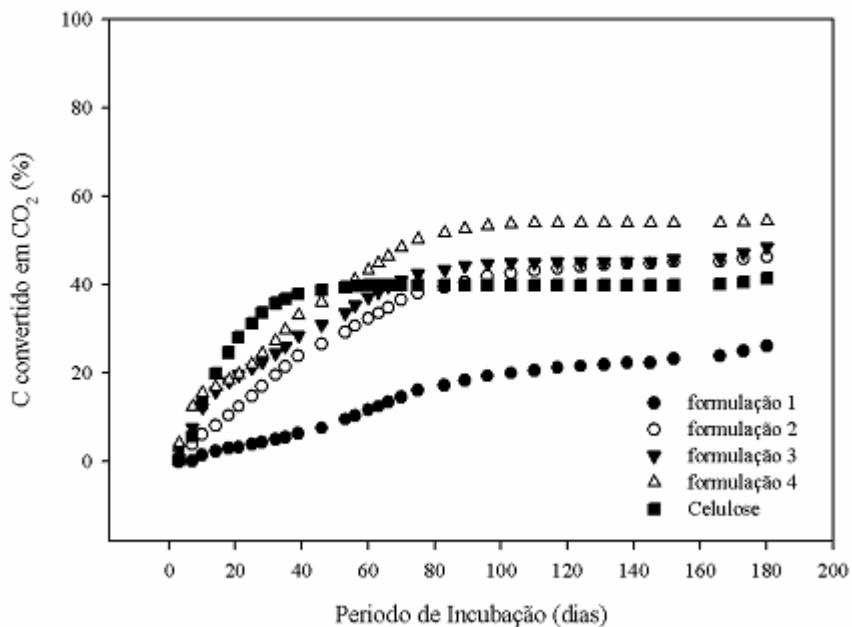


Figura 18. Comportamento das blendas F1, F2, F3 e F4 e da celulose incubadas por 180 dias no solo de textura argilosa sem adição de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$.

Na Tabela 12 consta a mineralização acumulada, após 180 dias de incubação, obtida para todos os tratamentos.

A condição 1 -“Arenoso sem adição de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ ” foi a que apresentou maior mineralização para todos os materiais estudados, em relação às outras condições estudadas, sendo o destaque para a F2 (81%), que não apresentou diferença significativa em relação à F3 (78%), porém foi significativamente diferente ($P < 0,0001$) das demais (F1 e F4), (72% e 69%). A celulose microcristalina, nesse caso, validou o experimento já que atingiu 82,43% de mineralização em 180 dias. A F4, com menor relação C/N, apresentou o menor valor de biodegradação, contrariando o esperado; no entanto uma das hipóteses sugeridas é que a incorporação de N na formulação tenha favorecido o aumento da biomassa microbiana, como será discutido mais adiante no ítem Biomassa Microbiana.

Segundo Chiellini e col. (2007), é necessário considerar que, em condições aeróbias, o consórcio microbiano heterotrófico metaboliza o carbono orgânico em dióxido de carbono e produção de novas células da biomassa.

A condição 2 -“Arenoso com adição de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ ”, exceto para a F1 (72%), todas as outras blendas, inclusive a celulose, apresentaram valores de transformação de C para CO_2 mais baixos que os obtidos na condição 1. Os materiais também não apresentaram diferença significativa entre eles, sendo o F2 (73%) o que obteve maior mineralização. Como na metodologia apresentada pela norma ASTM D 5988-03 é necessária a adição de solução de fosfato de amônio para a correção da relação C/N do material que será incubado e não é considerada a quantidade de N disponível no solo, sugere-se que a adição de fertilizante, para o solo arenoso, esteja reduzindo a relação C/N do mesmo e consequentemente, inibindo a mineralização dos materiais. A alta concentração de N para solos que já possuem relação C/N ideal para a biodegradação (na faixa de 30:1) torna indiferente a incorporação de N na forma de PIS nos materiais.

Para o solo argiloso, a adição de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ (tratamento 3) favoreceu a mineralização das blendas, as quais apresentaram valores de biodegradação maiores quando comparados ao tratamento 4 (argiloso sem adição de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$), mas inferiores aos tratamentos 1 e 2, identificando assim a diferença entre as texturas dos solos utilizados nos testes respirométricos. Monteiro (1997), em estudo sobre degradação de pesticidas, observou que os piretróides apresentaram maior mineralização, cerca de 70% a mais, em solo com textura arenosa. Nos dois

casos, a celulose não atingiu a mineralização necessária para a validação do teste. O material F4 (menor relação C/N) apresentou maior mineralização (57%), em relação aos demais, nos dois tratamentos com solo argiloso, mostrando que a baixa relação C/N do material foi essencial para aumentar o desempenho, em termos de biodegradação, da formulação à base de PCL/Amido, conforme sugerido por César e col. (2009).

Segundo Moreira e Siqueira (2006), além da disponibilidade de O₂, para que ele não seja o fator limitante da biodegradação, a relação C/N do material também é de extrema importância. Para lodos de refinarias de petróleo, a biodegradação é favorecida quando a relação C/N do material é 9:1, assim o tipo de solo, teor de matéria orgânica e aplicação de N precisam ser devidamente controlados.

Hoshino e col. (2001) comentam que a biodegradação de plásticos em solo apresenta correlação positiva com a quantidade de nitrogênio total do mesmo, entretanto não há correlação com pH, quantidade de carbono e textura do solo. Com o objetivo de aprofundar o estudo dos fatores que podem influenciar nos testes de biodegradação em solo, um novo teste (teste fase 2) com cinco solos diferentes e apenas as formulações 2 e 3 foi realizado, conforme apresentado no item 4.3 dos resultados e discussão.

Tabela 12. Mineralização média das quatro formulações incubadas nas diferentes condições.

Tratamento	Formulação	Mineralização Média após 180 dias de incubação (%)
1	1	72,39 ^{bc}
“Arenoso sem adição de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ ”	2	81,60 ^a
	3	78,82 ^{ab}
	4	69,35 ^c
	Celulose	82,43 ^a
2	1	72,65 ^{bc}
“Arenoso com adição de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ ”	2	73,10 ^{bc}
	3	68,55 ^{cd}
	4	60,53 ^{de}
	Celulose	57,12 ^{ef}
3	1	40,83 ^h
“Argiloso com adição de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ ”	2	53,71 ^{feg}
	3	52,14 ^{fg}
	4	57,00 ^{ef}
	Celulose	46,95 ^{gh}
4	1	26,167 ⁱ
“Argiloso sem adição de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ ”	2	46,22 ^{gh}
	3	48,51 ^{gh}
	4	54,38 ^{feg}
	Celulose	41,45 ^h

Médias com letras sobrescritas diferentes, na mesma coluna, diferem entre si (Tukey, P<0,05).

4.2.1 - C Biomassa Microbiana – Fase I

Observa-se nas Figuras 19, 20, 21 e 22 o comportamento da biomassa microbiana durante a incubação das formulações nos diferentes tratamentos. Nota-se que no solo arenoso, após os primeiros 14 dias de biodegradação, ocorre um decréscimo de praticamente 70% na biomassa e permanecendo assim até 45 dias de incubação. A recuperação da biomassa após esse período pode ter sido causada pela reposição de água, a qual foi realizada ao 70º dia de incubação com o objetivo de fazer a manutenção da umidade do solo (a norma ASTM D 5988-03 recomenda que a água seja reposta em função da diferença de massa do frasco ao longo do experimento).

Não houve diferença entre os tratamentos com e sem adição de fosfato de amônio, apenas um leve contraste na biomassa quando na presença das diferentes blendas, as quais apresentaram maiores valores de biomassa para aquelas com baixa relação C/N (F3 e F4).

No solo argiloso, por sua vez, houve uma tendência maior na recuperação da biomassa após 14 dias de incubação, apresentando o mesmo comportamento após 90 dias, provavelmente pela adição de água. Segundo Chiellini e col. (2007), os microrganismos autóctones produzem grande quantidade de biomassa e muito pouco do C é convertido em CO₂, já no caso dos microrganismos zimógenos pouca quantidade do C é convertido em biomassa, sendo a produção de CO₂ mantida a uma alta taxa. Stenger e col. (2001), apud Chiellini e col. (2007), estudaram a mineralização e imobilização de C em diferentes solos, a partir de C derivado de glicose e de efluente de fazendas produtoras de leite. Os autores notaram que, em poucos dias de incubação aeróbia, o solo contendo glicose produziu uma grande quantidade de CO₂, enquanto que o solo contendo o efluente (resíduo com alta concentração de nitrogênio) apresentou apenas um pequeno aumento na respiração do solo.

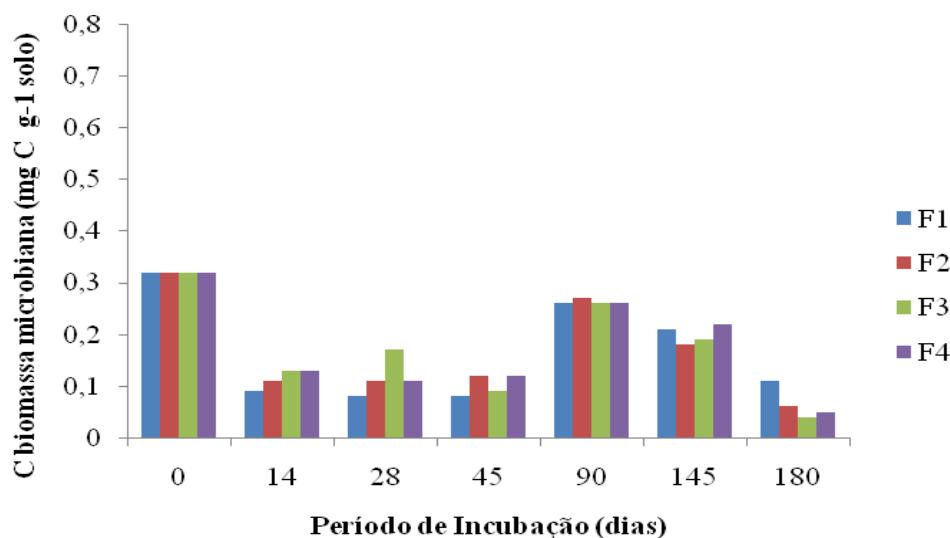


Figura 19. C Biomassa microbiana durante a incubação das blendas no solo arenoso com adição de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$.

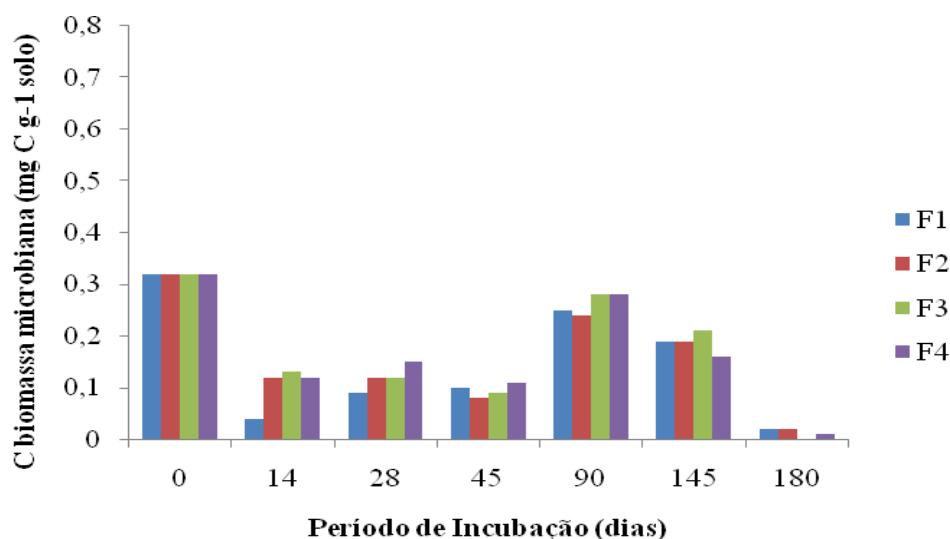


Figura 20. C Biomassa microbiana durante a incubação das blendas no solo arenoso sem adição de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$.

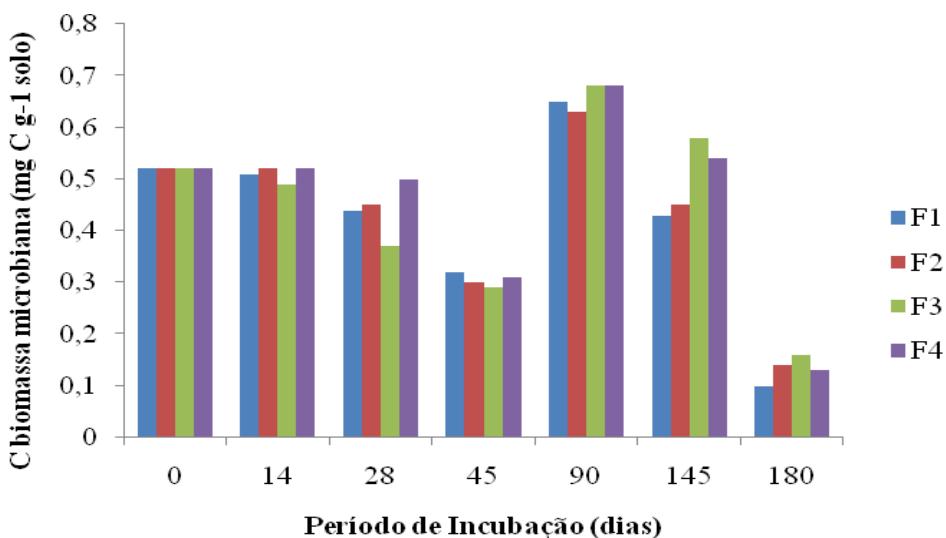


Figura 21. C Biomassa microbiana durante a incubação das blendas no solo argiloso com adição de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$.

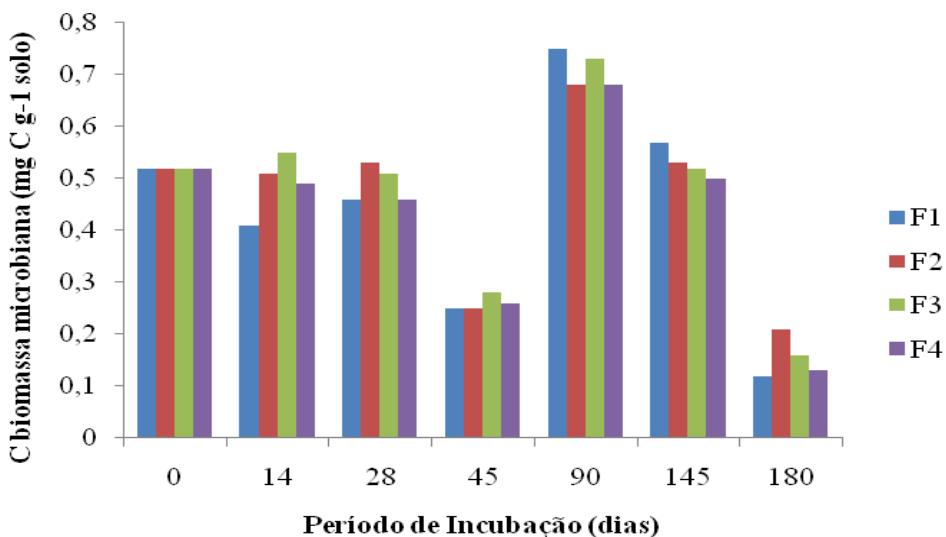


Figura 22. C Biomassa microbiana durante a incubação das blendas no solo argiloso sem adição de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$.

Através da Tabela 13 é possível visualizar que o solo arenoso (solo 1), com adição de fertilizante, resultou em menor mineralização das blendas, porém maior quantidade de C assimilado na forma de biomassa; já no mesmo solo, sem a adição de fertilizante, ocorreu o

contrário, ou seja, houve maior mineralização e menor assimilação de C biomassa. Para o solo argiloso (solo 3) a mineralização das blendas foi maior na condição com adição de fosfato de amônio. Não houve diferença entre os tratamentos com e sem adição de fertilizante na assimilação do C na forma de biomassa.

A diferença entre a mineralização das amostras e o C biomassa entre as texturas é evidente. De acordo com van Veen e col. (1987), a decomposição é maior e a quantidade de C, N e P residual na biomassa é menor em solos com menor quantidade de argila, mostrando a influência do tipo de solo na biodegradação.

Tabela 13. Porcentagem de C assimilado e mineralizado (triplicata) das blendas, após 180 dias de incubação nos solos de textura arenosa e argilosa, com e sem adição de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$.

Tratamento		C-Biomassa (mg g ⁻¹ solo)	C-Biomassa total (mg)	C adicionado (mg)	C mineralizado (%)	C assimilado (%)
Solo 1 com $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$	F1	0,11	1,04	360,00	72,65	0,29
	F2	0,06	0,57	360,00	73,10	0,16
	F3	0,04	0,37	360,00	68,55	0,10
	F4	0,05	0,47	360,00	60,53	0,13
Solo 1 sem $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$	F1	0,02	0,19	360,00	72,39	0,05
	F2	0,02	0,19	360,00	81,60	0,05
	F3	0,00	0,00	360,00	78,82	0,00
	F4	0,01	0,09	360,00	69,35	0,03
Solo 3 com $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$	F1	0,10	0,80	360,00	40,83	0,22
	F2	0,14	1,13	360,00	53,71	0,31
	F3	0,16	1,30	360,00	52,14	0,36
	F4	0,13	1,06	360,00	57,00	0,29
Solo 3 sem $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$	F1	0,12	0,97	360,00	26,18	0,27
	F2	0,21	1,17	360,00	46,22	0,33
	F3	0,16	1,30	360,00	48,51	0,36
	F4	0,13	1,06	360,00	54,38	0,29

4.2.2 - Massa Molecular Média

As amostras retiradas do solo em que foram incubadas nos períodos pré-determinados (0, 14, 28, 45, 90, 145, 180 dias) tiveram a sua massa molecular média determinada por Cromatografia de Permeação em Gel (GPC), que podem ser visualizadas nas Tabelas 14, 15, 16 e 17. A tendência do material F1 (PCL puro) (Tabela 14) observada foi de decréscimo na massa

molecular média com o tempo de incubação, já as condições solo arenoso e argiloso com e sem adição de fertilizante, aparentemente, não apresentaram nenhuma influência na variação da massa molecular média. Nota-se também que a polidispersividade (M_w/M_n) também acompanha a tendência de redução com o tempo de incubação, o que, segundo Höglund e col. (2007) pode ser justificada pela perda substancial de massa, assim M_w diminui mais rapidamente que M_n com o tempo, consequência de uma hidrólise contínua das cadeias poliméricas mais longas.

As amostras das formulações F2, F3 e F4, por sua vez, apresentaram um comportamento diferente da F1, ou seja, as formulações à base de PCL/Amido e PCL/Amido/PIS apresentaram tendência em aumentar a massa molecular média no início da incubação até 45 dias e depois a redução, independentemente do solo em que foram incubadas. A polidispersividade também acompanhou esse comportamento, mostrando que um grande número de cadeias poliméricas sofreram cisão desde o início da incubação. Pometto e col. (1993), apud Albertsson e col. (1998), estudaram a biodegradação de diferentes misturas de polietileno de baixa densidade, amido e Mater-Bi® com microrganismos isolados e também notaram um aumento na massa molecular média das amostras submetidas aos ensaios de degradação. Os autores sugerem que esse aumento se deve à formação de biofilme, pelos microrganismos, na superfície dos filmes plásticos, corroborando os dados apresentados no presente trabalho.

Lefèvre e col. (2002) discutem a formação de biofilme na superfície de filmes de policaprolactona sob biodegradação, em meio líquido em baixa e alta agitação, e concluem que os mecanismos de biodegradação do polímero, com e sem biofilme, são completamente diferentes. Os autores admitem que o biofilme é responsável por não permitir a biodegradação completa do material, provavelmente pela limitação na difusão de oxigênio na interface do polímero.

Segundo Flemming (1998), os biofilmes representam uma forma complexa de vida microbiana caracterizada, principalmente, pelo alto grau de interação entre diferentes tipos de microrganismos. Um biofilme é composto por populações mistas de bactérias, fungos, protozoários e, em algumas situações larvas e nematóides que, na condição de biofilme, são incorporadas a uma matriz polimérica (substâncias poliméricas extracelulares), de origem própria, à base de polissacarídeos e proteínas. Nessa forma os microrganismos formam agregados estáveis que atuam de forma sinérgica e toleram altas doses de biocidas. Primeiramente, os microrganismos se aderem à superfície do polímero sintético, utilizando-o como suporte,

causando alterações nas propriedades da superfície do material e consequente formação do biofilme. Aditivos e monômeros podem ser absorvidos pelos microrganismos sem que eles penetrem no polímero sintético, e assim há a perda inicial das propriedades mecânicas. Como os biofilmes são menos sensíveis aos parâmetros ambientais, inicia-se o processo de corrosão.

Embora muitos autores confirmem a presença de biofilme na superfície de polímeros expostos a microrganismos, sugere-se também que esse aumento da massa molecular média possa ser artificial já que há a possibilidade de haver uma agregação de cadeias do PCL provocada pela ação do sorbitol, que estaria atuando como um agente de acoplamento entre as cadeias, resultando numa aparente massa molecular maior.

Dessa forma, com os resultados aqui apresentados, pode-se inferir que a análise de massa molecular média do material, durante o ensaio de biodegradação pode, em alguns casos, não representar a biodegradação do material, contrariando Yabannavar e Bartha (1994), que afirmaram que os testes respirométricos são ótimos para avaliar a biodegradação de filmes em solo, porém materiais contendo aditivos (como Polietileno/amido) devem ser avaliados com cautela, sugerindo a avaliação da massa molecular média para confirmação da biodegradação.

Tabela 14. Variação da massa molecular média do material F1 submetido ao ensaio de biodegradação em solo arenoso e argiloso, com e sem adição de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$.

Período de Incubação (dias)	Mw (Da) - Mw/Mn por tratamento			
	F1 - “Arenoso sem adição de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ ”	F1 - “Arenoso com adição de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ ”	F1 - “Argiloso sem adição de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ ”	F1 - “Argiloso com adição de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ ”
0	54.671 – 2,95	54.671 – 2,95	54.671 – 2,95	54.671 – 2,95
14	34.841 – 1,97	40.099 – 1,99	33.635 – 2,40	36.282 – 1,75
28	37.222 – 2,04	31.149 – 2,42	35.779 – 1,77	56.130 – 1,74
45	38.825 – 2,19	77.529 – 2,34	37.515 – 2,31	37.599 – 2,40
90	27.888 – 2,17	31.601 – 2,28	36.312 – 1,91	37.725 – 1,63
145	31.534 – 2,02	-----	34.020 – 2,43	26.633 – 4,61

Tabela 15. Variação da massa molecular média do material F2 submetido ao ensaio de biodegradação em solo arenoso e argiloso, com e sem adição de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$.

Período de Incubação (dias)	Mw (Da) - Mw/Mn por tratamento			
	F2 - “Arenoso sem adição de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ ”	F2 - “Arenoso com adição de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ ”	F2 - “Argiloso sem adição de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ ”	F2 - “Argiloso com adição de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ ”
0	58.910 – 2,03	58.910 – 2,03	58.910 – 2,03	58.910 – 2,03
14	47.663 – 1,90	63.738 – 2,29	57.503 – 1,54	64.222 – 1,95
28	88.061 – 2,08	71.082 – 1,97	72.737 – 1,67	39.427 – 1,74
45	70.252 – 1,50	55.806 – 2,10	83.286 – 1,71	66.496 – 2,35
90	66.773 – 1,83	-----	68.747 – 5,50	38.293 – 7,86
145	-----	-----	-----	-----

Tabela 16. Variação da massa molecular média do material F3 submetido ao ensaio de biodegradação em solo arenoso e argiloso, com e sem adição de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$.

Período de Incubação (dias)	Mw (Da) - Mw/Mn por tratamento			
	F3 - “Arenoso sem adição de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ ”	F3 - “Arenoso com adição de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ ”	F3 - “Argiloso sem adição de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ ”	F3 - “Argiloso com adição de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ ”
0	51.884 – 2,39	51.884 – 2,39	51.884 – 2,39	51.884 – 2,39
14	77.983 – 1,78	77.639 – 1,68	74.539 – 2,09	94.831 – 2,34
28	70.521 – 1,94	66.032 – 1,74	71.104 – 1,93	70.006 – 1,97
45	72.083 – 1,59	44.148 – 2,57	66.330 – 2,82	15.895 – 5,33
90	-----	-----	55.327 – 5,61	-----
145	-----	-----	-----	-----

Tabela 17. Variação da massa molecular média do material F4 submetido ao ensaio de biodegradação em solo arenoso e argiloso, com e sem adição de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$.

Período de Incubação (dias)	Mw (Da) - Mw/Mn por tratamento			
	F4 - “Arenoso sem adição de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ ”	F4 - “Arenoso com adição de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ ”	F4 - “Argiloso sem adição de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ ”	F4 - “Argiloso com adição de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ ”
0	46.523 – 2,38	46.523 – 2,38	46.523 – 2,38	46.523 – 2,38
14	36.878 – 1,85	48.993 – 2,34	75.165 – 1,94	114.501 – 2,37
28	27.027 – 2,34	46.148 – 2,13	83.021 – 1,94	70.006 – 2,17
45	-----	-----	38.915 – 3,58	63.915 – 2,71
90	-----	-----	31.781 – 11,99	85.860 – 2,52
145	-----	-----	-----	-----

4.2.3 - Morfologia

As micrografias das superfícies das amostras incubadas e das superfícies de fratura das mesmas, apresentadas nas Figuras 23, 24, 25, 26 e 27, relacionam os resultados discutidos anteriormente a respeito da formação de biofilme e redução ou aumento na massa molecular média.

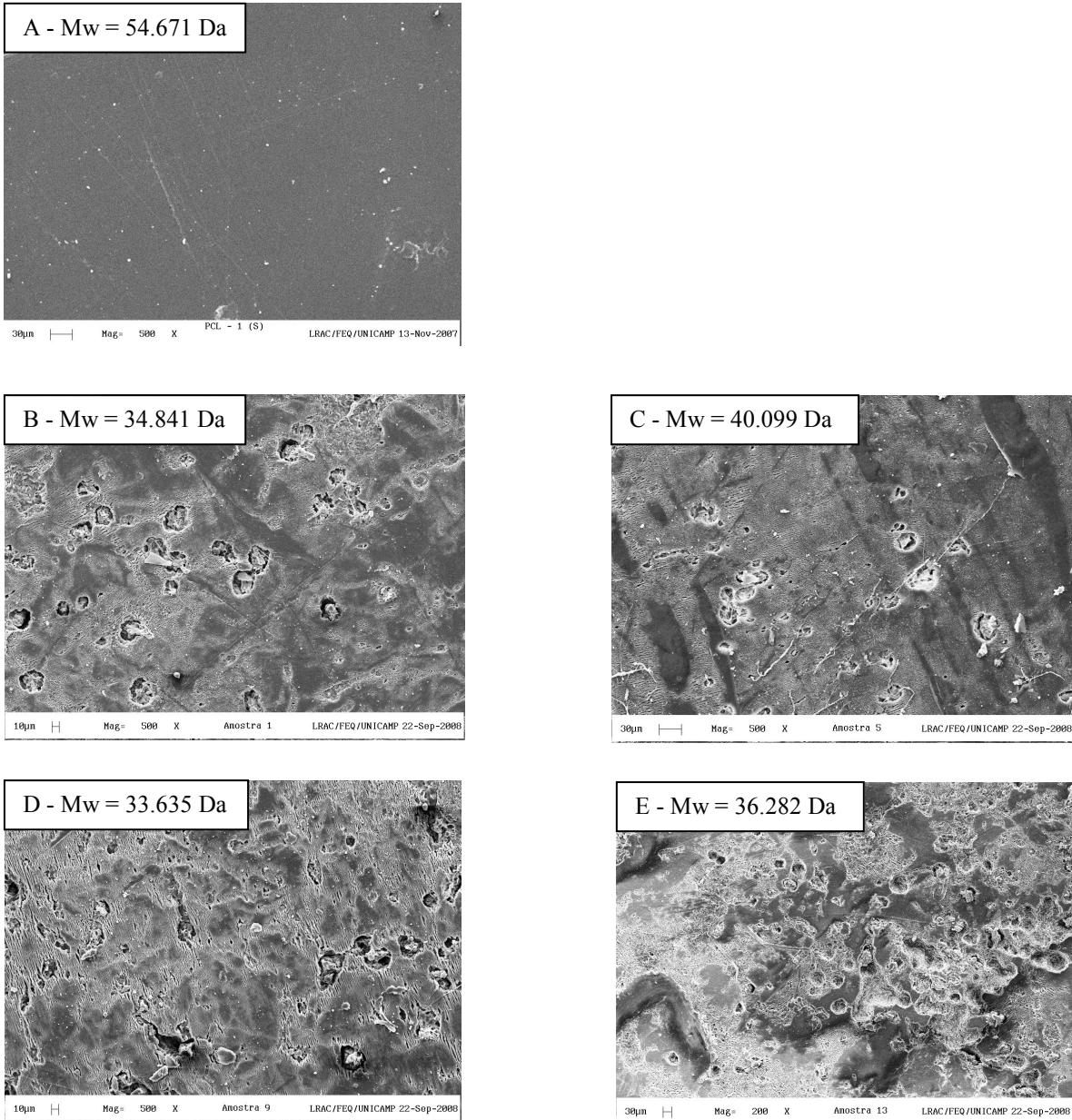


Figura 23. Micrografias obtidas por MEV das superfícies da F1 antes (A) e após 14 dias de incubação nos diferentes tratamentos: B) Arenoso sem adição de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, C) Arenoso com adição de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, D) Argiloso sem adição de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, E) Argiloso com adição de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$.

No caso da Figura 23, que representa a amostra F1 (PCL puro), não há presença de biofilme, apenas de degradação da superfície, resultando na redução da massa molecular média das amostras incubadas nos diferentes tratamentos. Já nas formulações F2 e F3 (Figuras 24 e 25), nota-se a presença de hifas (filamentos formados por longas células cilíndricas que auxiliam na

fixação dos fungos no substrato, na reprodução e na digestão extracelular) na superfície das amostras e aumento na massa molecular média, provavelmente pela presença de amido e/ou PIS. Entretanto, onde há pouca presença de hifas, há uma redução inicial da massa molecular média, como apresentado nas Figuras 24b e 24d, sugerindo que a presença do biofilme pode ser responsável pelo aumento da massa molecular média das amostras em biodegradação. Esse estudo será aprofundado em trabalhos futuros.

Não foi possível realizar as micrografias do material F4 por falta de amostra (pouca quantidade de amostra retirada dos ensaios de incubação em solo, pois a amostra se desintegrava facilmente durante a manipulação). A Figura 26 apresenta a fratura das amostras confirmando a ausência de biofilme e a degradação da superfície da amostra F1 (Figura 26a) e a presença de inúmeras hifas formando uma estrutura na superfície da blenda F3 (Figura 26b). Nas Figuras 27a e 27b observa-se uma hifa segmentada e a presença de estruturas sugerindo a presença de substância polimérica extracelular, ou seja, biofilme formado pelos microrganismos. Como a técnica de microscopia eletrônica de varredura só analisa uma pequena área da amostra estudada, de forma aleatória, não foi possível avaliar em qual formulação e tratamento (solo com e sem N fertilizante) houve maior formação de biofilme, exceto pela avaliação da massa molecular média.

De acordo com Barbosa e col. (2004), os polissacarídeos extracelulares produzidos por fungos desempenham papel importante na degradação de xenobióticos por imobilizarem as enzimas extracelulares, além do gel de biopolímero impedir a desidratação das hifas e permitir a adesão entre as células e/ou às superfícies.

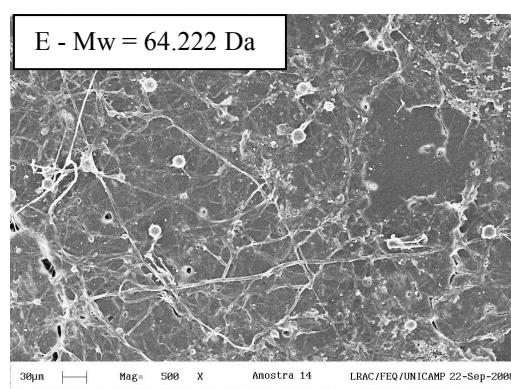
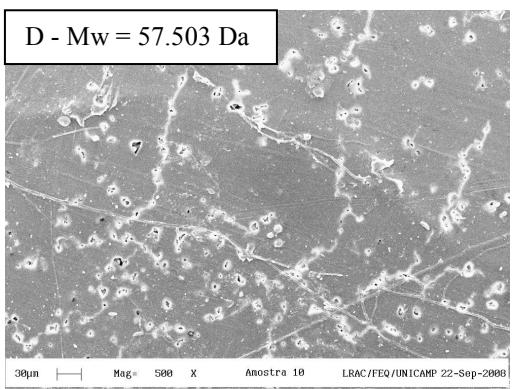
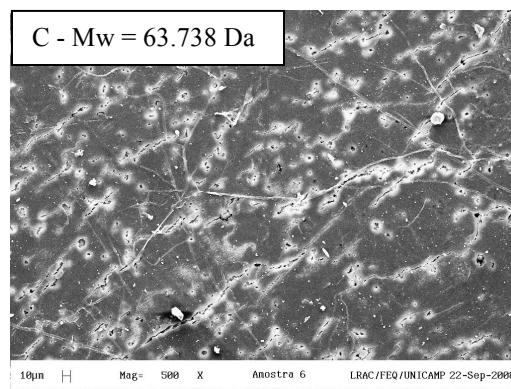
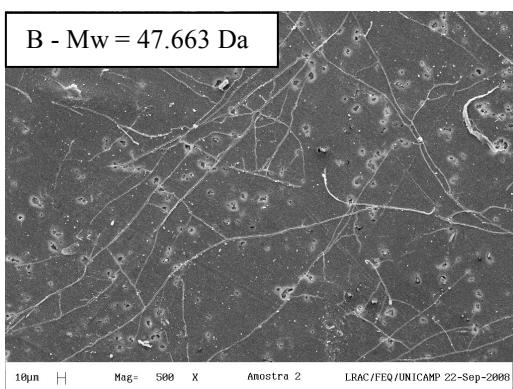
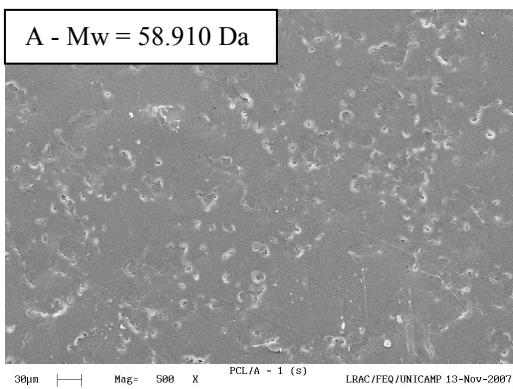


Figura 24. Micrografias obtidas por MEV das superfícies da F2 antes (A) e após 14 dias de incubação nos diferentes tratamentos: B) Arenoso sem adição de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, C) Arenoso com adição de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, D) Argiloso sem adição de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, E) Argiloso com adição de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$.

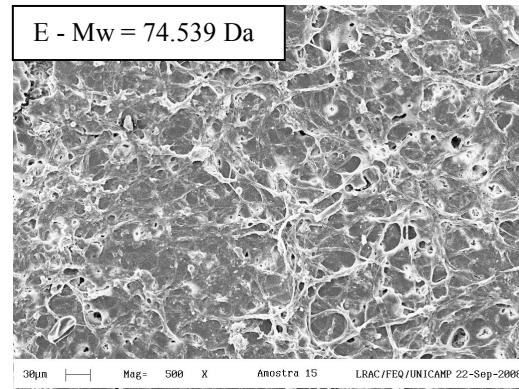
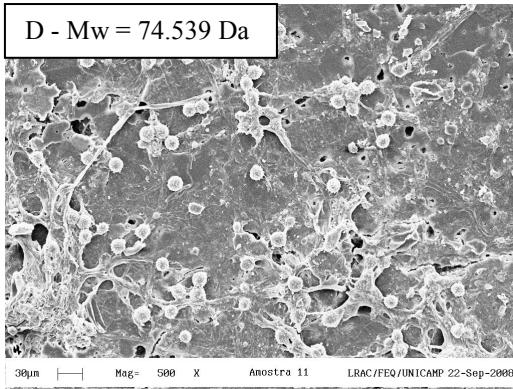
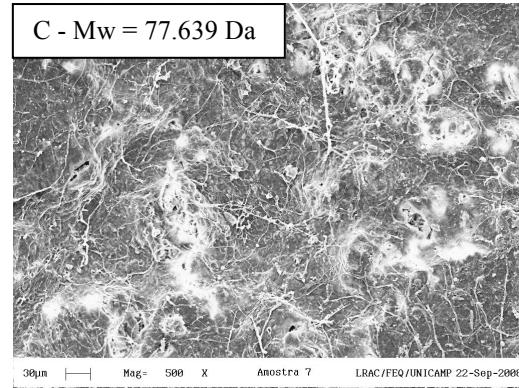
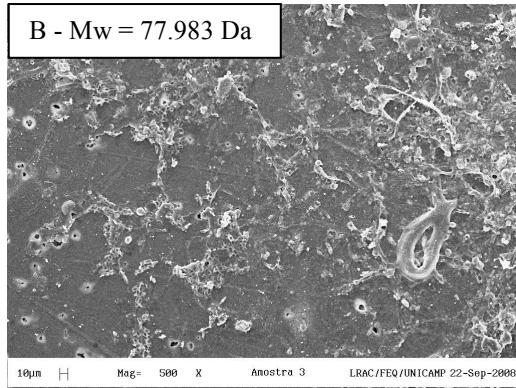
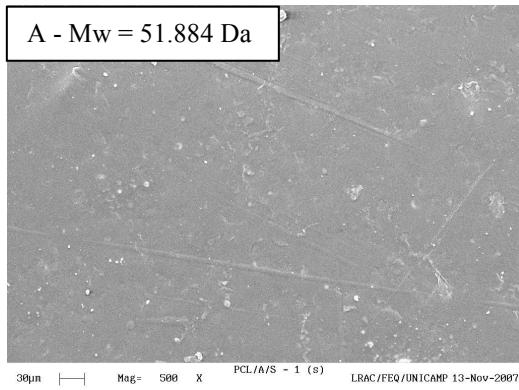


Figura 25. Micrografias obtidas por MEV das superfícies da F3 antes (A) e após 14 dias de incubação nos diferentes tratamentos: B) Arenoso sem adição de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, C) Arenoso com adição de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, D) Argiloso sem adição de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, E) Argiloso com a adição de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$.

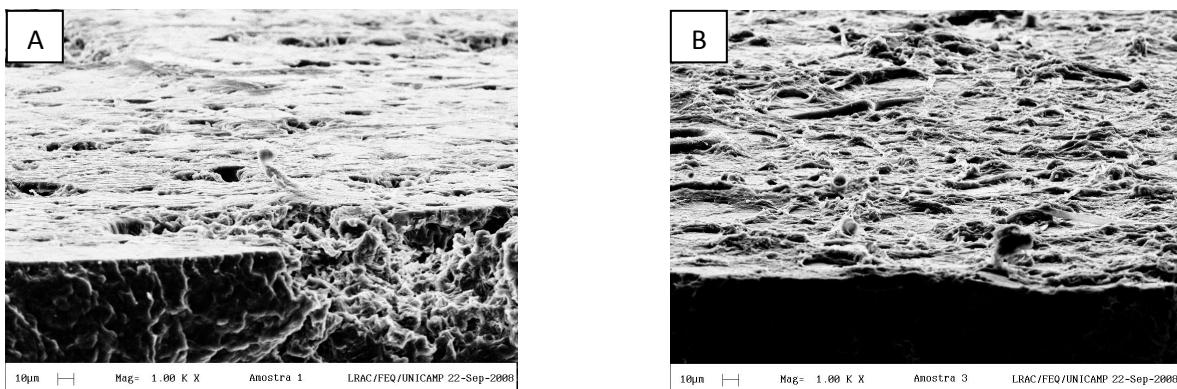


Figura 26. Micrografias obtidas por MEV (aumento=1000x) das fraturas das formulações F1 e F3: A) F1- Arenoso sem adição de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, B) F3 - Arenoso sem adição de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$.

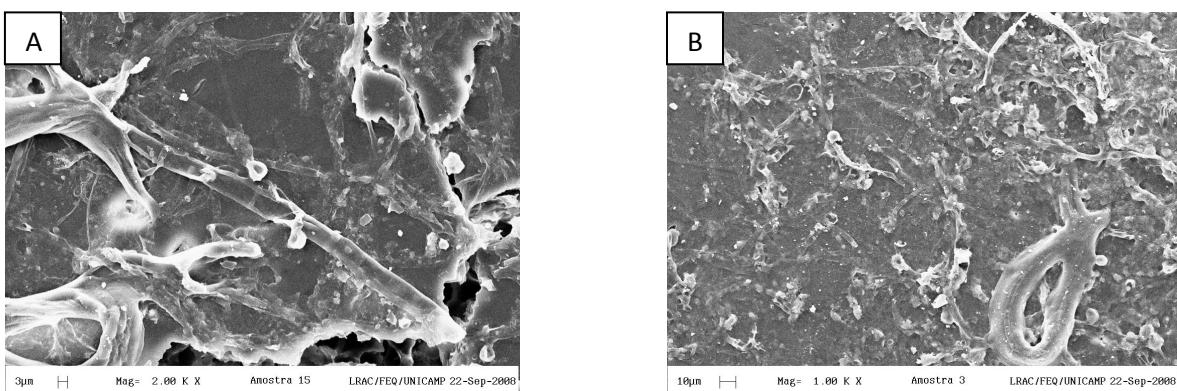


Figura 27. Micrografias obtidas por MEV da superfície da formulação F3: A) F3 - Argiloso com adição de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ (aumento=2000x), B) F3 – Arenoso sem adição de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$.

4.2.4 - Microrganismos isolados dos materiais incubados

Após identificação dos microrganismos através de microscópio óptico, os gêneros mais encontrados, em todos os tratamentos, foram *Fusarium* sp. e *Trichoderma* sp., além de *Aspergillus* sp. e *Penicillium* sp. Pela análise da morfologia foram isolados cinco tipos diferentes de *Fusarium* sp., sendo três deles mostrados nas Figuras 28a, 28b, 28c, enquanto na Figura 28d está representado o gênero *Trichoderma* sp.

Não houve diferenças entre tratamentos (solos de texturas diferentes e adição de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}$ ou entre as formulações) quanto aos microrganismos isolados. Tais resultados estão de acordo com vários estudos da literatura, já comentados no item 3.1 da Introdução [Murphy e col. (1996); Nishide e col. (1999); Ishii e col. (2008)]. Em resumo, os autores também associaram a

degradação de PCL a fitopatógenos do gênero *Fusarium*, ao qual foi atribuída uma depolimerase capaz de romper a membrana polimérica da planta conhecida como cutinase.

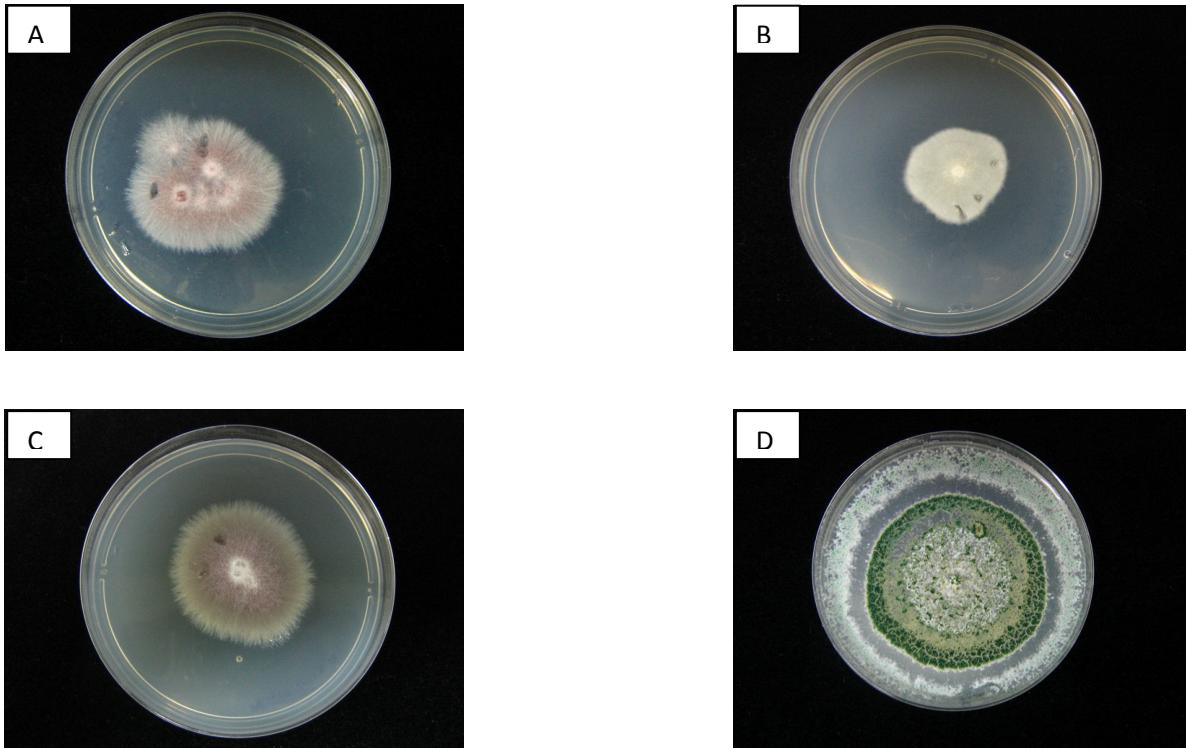


Figura 28. Colônias dos fungos isolados dos materiais incubados em solo: a) *Fusarium* sp. - 1, b) *Fusarium* sp. - 2, C) *Fusarium* sp. - 3, d) *Trichoderma* sp.

4.2.5 - Identificação dos produtos intermediários

A análise de cromatografia gasosa/espectrometria de massas (CG-MS) foi realizada para as amostras retiradas dos solos, após 14 dias de incubação nos diferentes tratamentos (Figuras 29, 30, 31 e 32), excluindo-se a formulação F4, cuja recuperação foi difícil e as condições desse material que não eram adequadas para a análise (difícil remoção de resíduos do solo).

Na Figura 29 estão representados os cromatogramas das amostras F1, F2 e F3 não incubadas em solo; a partir delas é possível observar que os produtos encontrados, com picos mais bem definidos, são: Ácido acético, Pentanodiol, Butanodiol, Pentanol, Propanol e um composto coroa denominado Hexaoxaciclooctadecano, correspondentes aos picos 1, 2, 3, 4, 5, 6, respectivamente. Dessa forma, a partir das amostras biodegradadas observou-se a presença de produtos intermediários apenas na formulação F1 (PCL puro) e na F3 do tratamento arenoso sem adição de

$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ (figuras 30a e 30c), sendo que a F3 só apresentou a presença de um pico (7). Os produtos encontrados nessas formulações foram vários compostos coroa identificados como: Hexaoxaciclooctano, Tetraetil, Pentaoxaciclopentadecano e Tetraoxaciclooctano, correspondentes aos picos 7, 8, 9 e 10, respectivamente. Tal fato pode ser consequência de uma possível degradação da Poli (ϵ -caprolactona) com o tempo, pois trata-se de um poliéster sensível às condições de temperatura, umidade e estocagem. A presença de compostos de degradação cílicos é esperada, visto que a quebra de cadeias resulta em moléculas de baixa massa molecular com grande probabilidade de formação de compostos cílicos termodinamicamente estáveis (Odian, 2004). Nos compostos submetidos à biodegradação, enzimas do tipo depolimerase atuam na quebra das cadeias, propiciando também a formação de pequenas moléculas que podem formar tais compostos cílicos.

Para os outros tratamentos não foi identificado nenhum produto para a F1, já a F2 e F3 apresentaram a presença de hexaoxaciclooctano (pico 7) após a biodegradação (Figuras 30c, 31b, 32c, 33b e 33c). Assim, sugere-se que a presença do amido e da PIS foram responsáveis por acelerar a biodegradação do PCL, sendo os produtos de baixa massa molecular consumidos muito rapidamente. De acordo com Innocenti (2005) os produtos intermediários podem ser encontrados em diferentes etapas de degradação, sendo o primeiro relacionado à adição do polímero ao solo, fase em que os aditivos de baixa massa molecular podem migrar.

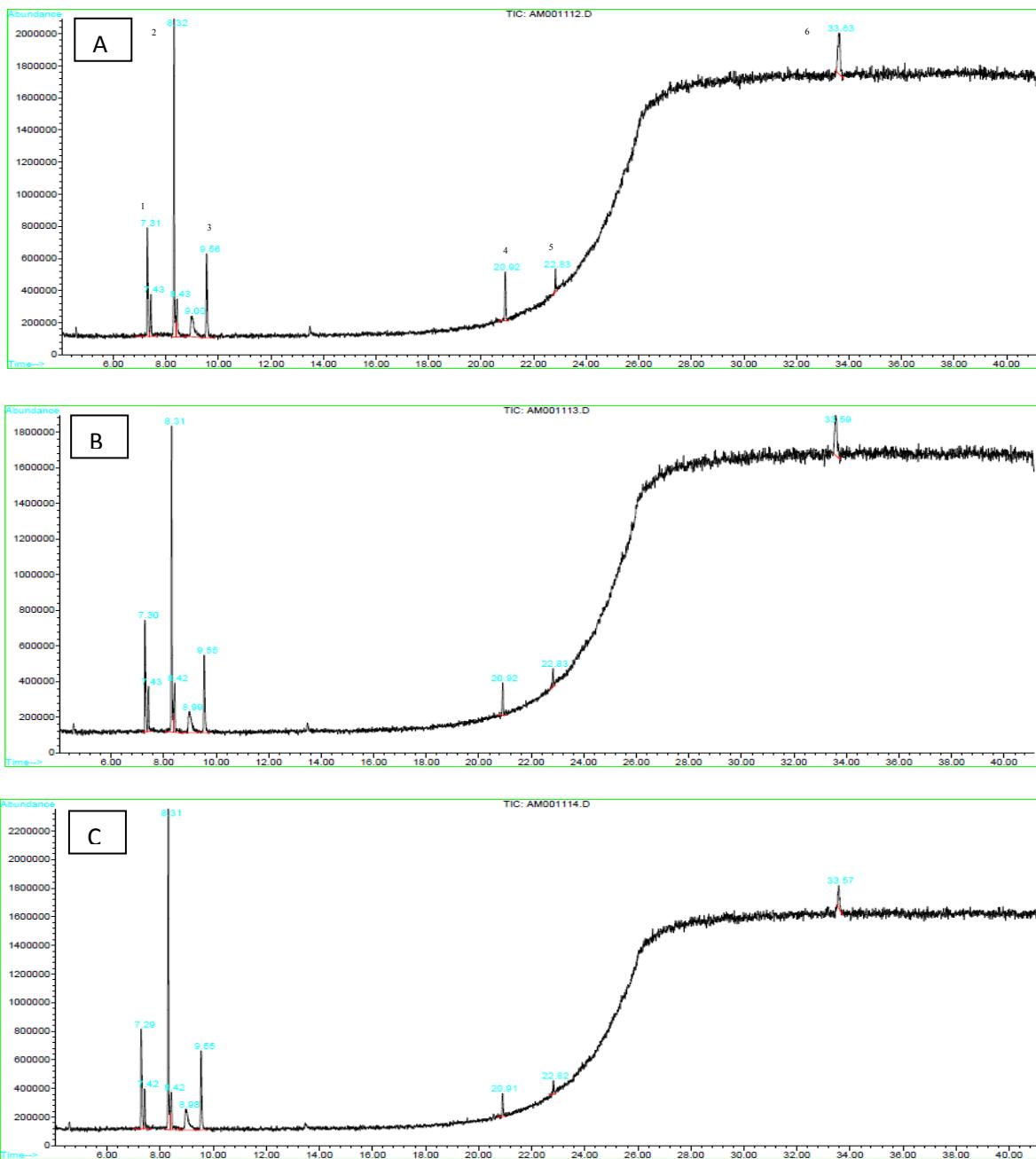


Figura 29. Cromatogramas dos materiais não incubados em solo: a) F1, b) F2 e c) F3.

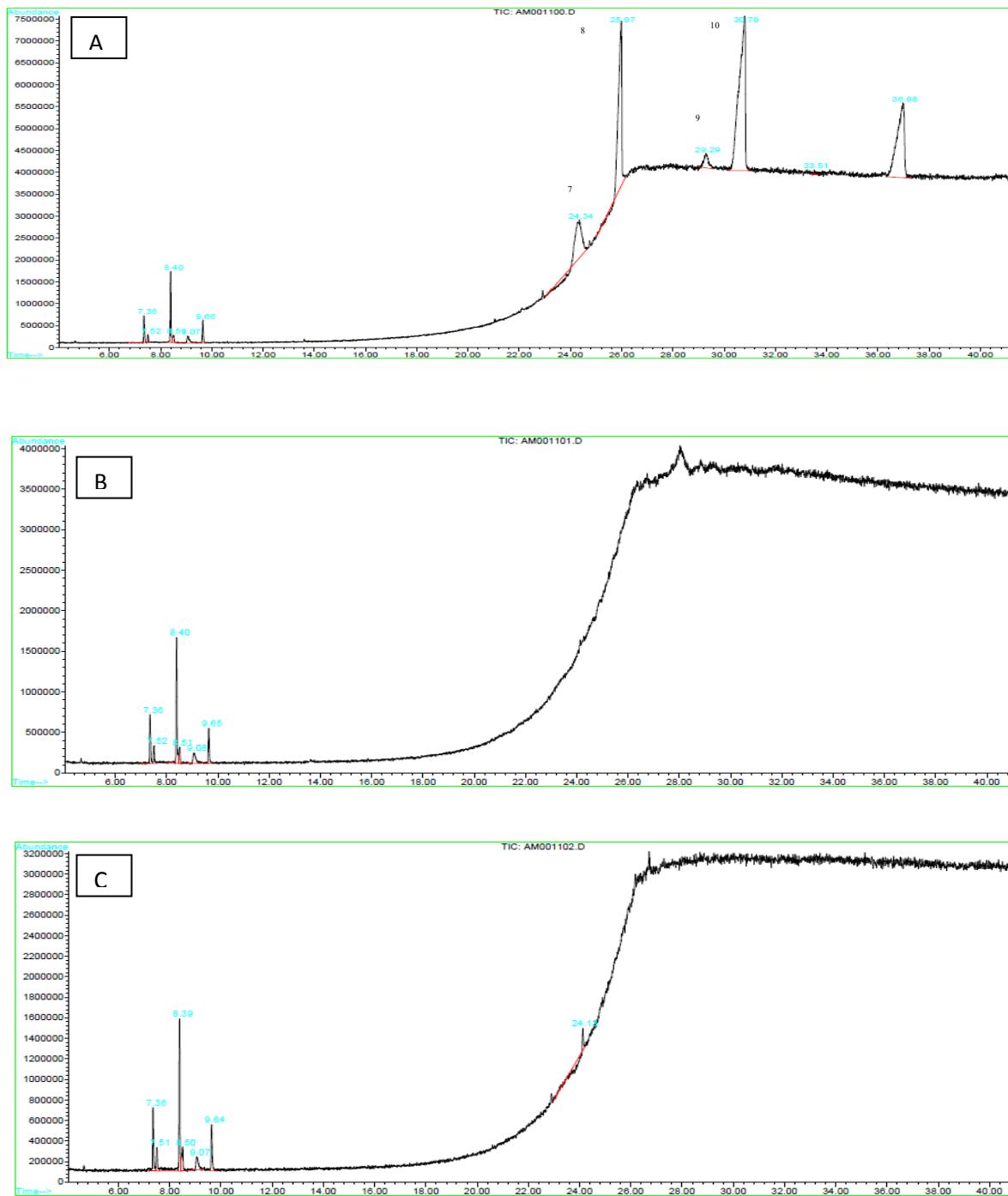


Figura 30. Cromatogramas dos materiais incubados em solo de textura arenosa sem adição de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$: a) F1, b) F2 e c) F3.

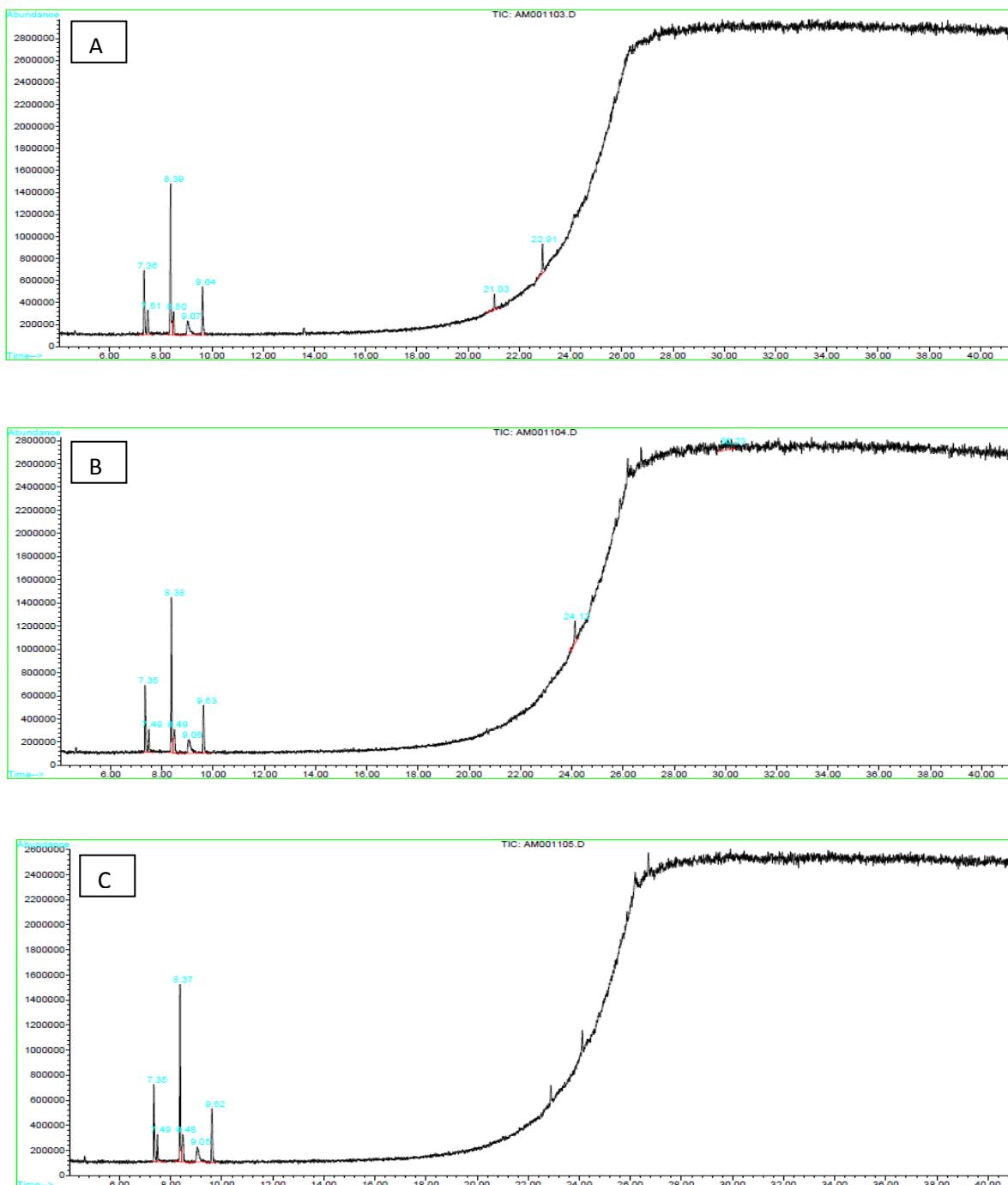


Figura 31. Cromatogramas dos materiais incubados em solo de textura arenosa com adição de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$: a) F1, b) F2 e c) F3.

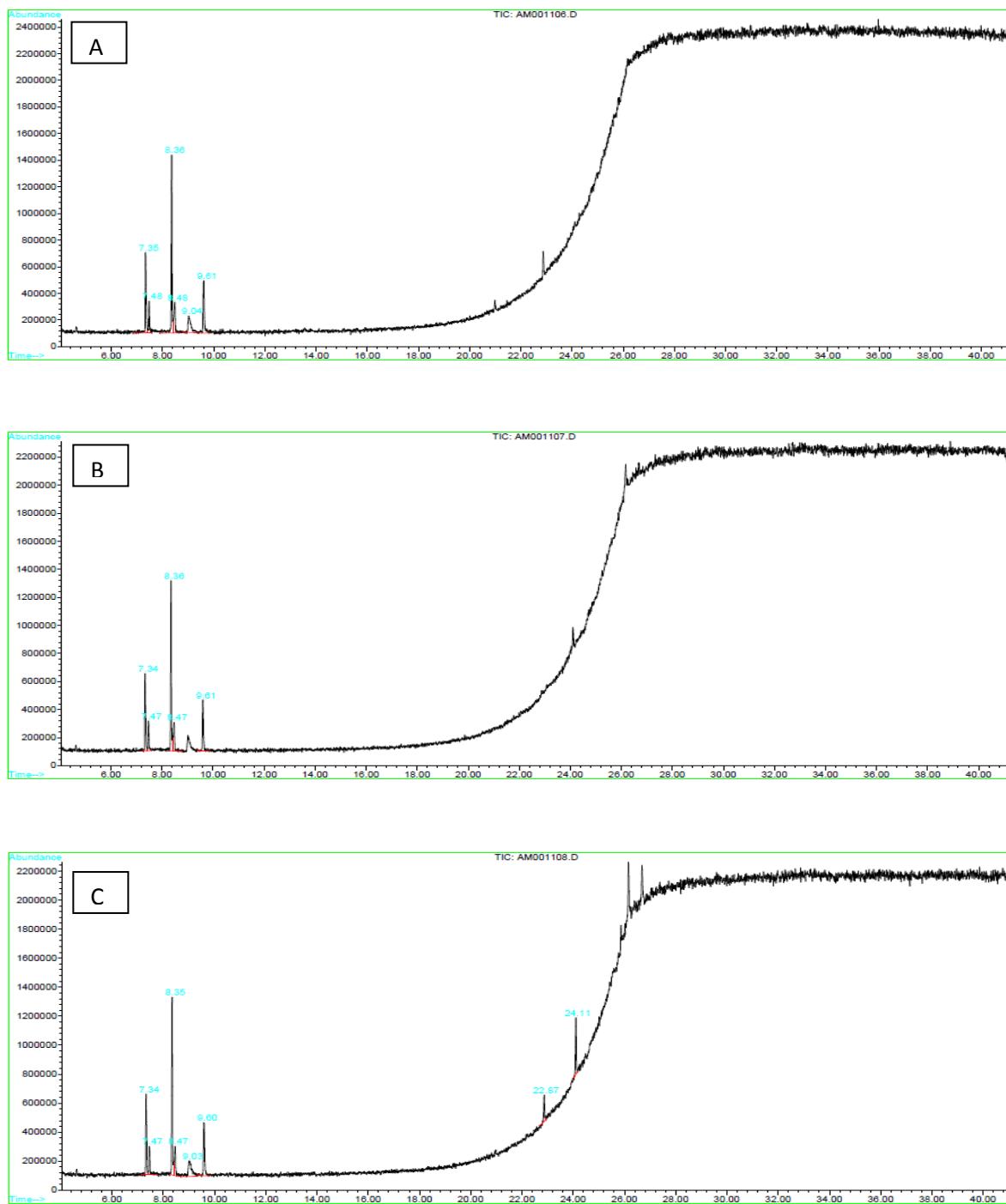


Figura 32. Cromatogramas dos materiais incubados em solo de textura argilosa sem adição de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$: a) F1, b) F2 e c) F3.

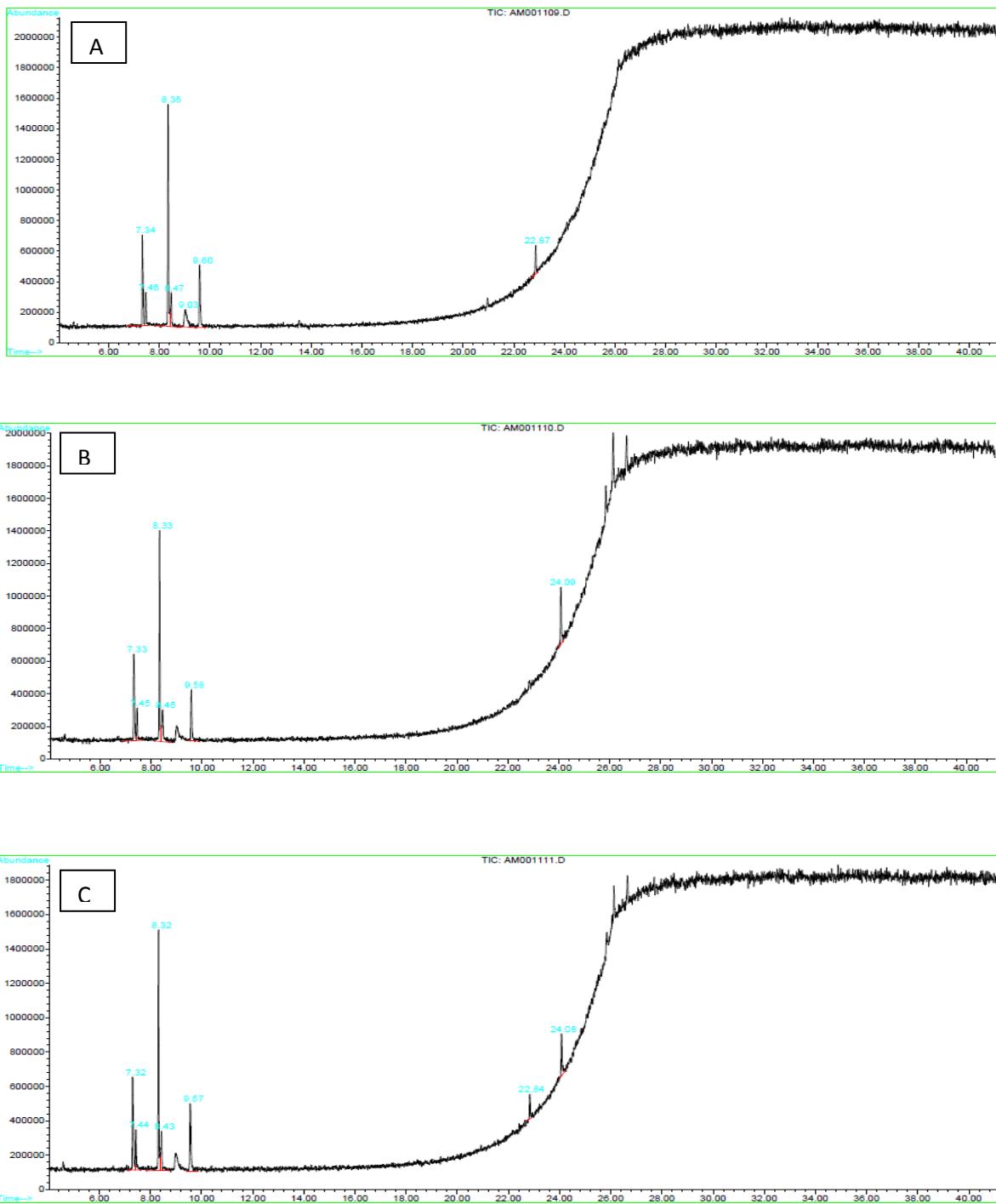


Figura 33. Cromatogramas dos materiais incubados em solo de textura argilosa com adição de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$: a) F1, b) F2 e c) F3.

4.2.6 - Teste de Toxicidade

A avaliação da toxicidade no solo após a biodegradação das formulações é necessária devido à probabilidade de formação, ou eventual acúmulo, de produtos intermediários formados durante a biodegradação dos materiais incubados.

A Figura 26 apresenta uma imagem do teste de germinação realizado com os solos após 180 dias de incubação com as quatro formulações, a celulose e o solo incubado sem a incorporação de nenhuma fonte de C, para os tratamentos com e sem $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$. Nota-se, visualmente, que não há diferença de sementes germinadas entre as diferentes situações. A Tabela 18 mostra que o teste de toxicidade obtido a partir da germinação de sementes de couve-flor não apresentou efeito significativo quanto ao número de plântulas germinadas de nenhum dos tratamentos em relação aos controles (solos incubados sem adição de plástico) e nem em relação à massa seca da parte aérea. Dessa forma, pode-se afirmar que não houve liberação e/ou formação de produtos tóxicos durante a biodegradação das quatro formulações nos diferentes solos e tratamentos (com ou sem adição de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$).

De acordo com Innocenti (2005), o teste de toxicidade realizado após a desintegração do material no solo é muito importante, visto que os resíduos e intermediários tóxicos permanentes podem se acumular no ambiente. Ainda, segundo o autor, a ecotoxicidade avaliada nesse momento pode representar a soma de todas as possíveis moléculas tóxicas estáveis que já foram produzidas e acumuladas durante todas as etapas de biodegradação. César e col. (2009) obtiveram resultados semelhantes para germinação de sementes de arroz em solos incubados com blendas de PCL/amido modificado.



Figura 34. Teste de toxicidade realizado com os diferentes tratamentos após 180 dias de incubação: A) Solo argiloso e B) Solo Arenoso.

Tabela 18. Média da porcentagem de germinação de plântulas de couve-flor e da massa seca da parte aérea em relação aos solos, formulações e adição ou não de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$.

Tratamento	Formulação	Média da porcentagem de germinação	Média da massa seca da parte aérea (mg^{-1} planta)
1	1	99,17 ($\pm 1,44$)	2,35 ($\pm 0,04$)
“Arenoso sem adição de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ ”	2	98,33 ($\pm 1,44$)	2,42 ($\pm 0,08$)
	3	99,17 ($\pm 1,44$)	2,33 ($\pm 0,15$)
	4	100,00 ($\pm 0,00$)	2,50 ($\pm 0,28$)
	Celulose	97,50 ($\pm 2,50$)	2,24 ($\pm 0,10$)
	Controle (branco)	97,50 ($\pm 2,50$)	2,43 ($\pm 0,14$)
2	1	98,33 ($\pm 1,44$)	2,56 ($\pm 0,11$)
“Arenoso com adição de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ ”	2	97,50 ($\pm 4,33$)	2,36 ($\pm 0,06$)
	3	98,33 ($\pm 1,44$)	2,37 ($\pm 0,02$)
	4	95,00 ($\pm 2,50$)	2,52 ($\pm 0,13$)
	Celulose	98,33 ($\pm 1,44$)	2,39 ($\pm 0,02$)
	Controle (branco)	98,33 ($\pm 1,44$)	2,29 ($\pm 0,09$)
3	1	99,17 ($\pm 1,44$)	2,45 ($\pm 0,13$)
“Argiloso com adição de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ ”	2	95,83 ($\pm 1,44$)	2,44 ($\pm 0,05$)
	3	100,00 ($\pm 0,00$)	2,61 ($\pm 0,09$)
	4	98,33 ($\pm 2,89$)	2,51 ($\pm 0,08$)
	Celulose	94,17 ($\pm 8,04$)	2,43 ($\pm 0,12$)
	Controle (branco)	95,83 ($\pm 1,44$)	2,54 ($\pm 0,10$)
4	1	100,00 ($\pm 0,00$)	2,48 ($\pm 0,10$)
“Argiloso sem adição de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ ”	2	98,33 ($\pm 1,44$)	2,54 ($\pm 0,11$)
	3	96,67 ($\pm 3,82$)	2,38 ($\pm 0,05$)
	4	99,17 ($\pm 1,44$)	2,40 ($\pm 0,06$)
	Celulose	100,00 ($\pm 0,00$)	2,49 ($\pm 0,09$)
	Controle (branco)	100,00 ($\pm 0,00$)	2,28 ($\pm 0,09$)

4.3 - Biodegradação em solo – Fase II

Para o segundo ensaio de biodegradação em solo, foram utilizados os cinco solos descritos anteriormente e amostras das formulações 2 (PCL/Amido/sorbitol) e 3 (PCL/Amido/PIS-3,5%/sorbitol), além da celulose microcristalina como material de referência.

A Tabela 19 apresenta os dados de mineralização dos materiais incubados, por 180 dias, em função do solo, para os tratamentos com e sem adição de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, respectivamente.

Observa-se com esses resultados que a relação C/N do material incubado não interfere muito na mineralização quando é adicionado $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ aos solos 2 e 3, mas quando os mesmos são usados sem a adição de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, evidencia-se a importância da redução da relação C/N do material. Nos demais solos, independentemente da adição ou não da solução de fosfato de amônio, a baixa relação C/N do material F3 proporcionou a aceleração da biodegradação da blenda.

De acordo com Kiehl (2002), quando a relação C/N inicial da matéria orgânica é elevada, o tempo de compostagem é maior devido à falta de nitrogênio, o qual será reciclado entre as células microbianas até que ocorra a degradação total da matéria orgânica, com o excesso de C sendo eliminado na forma de CO_2 . Quando ocorre o contrário, ou seja, a relação C/N é muito baixa, os microrganismos eliminam o excesso de N na forma de amônia, até atingir uma relação próxima de 30/1.

Observa-se também que a mineralização dos materiais (F2 e F3) no solo de textura arenosa (solo 1) foi maior (cerca de 70%) e significativamente diferente ($p < 0,0001$) do que no solo de textura argilosa (solo 3) (aproximadamente 40%), confirmando os resultados obtidos no experimento I.

Wang e col. (2003) discutem que, em condições estáveis, há uma grande tendência na redução da mineralização do C orgânico do solo com o aumento da quantidade de argila. van Veen e col. (1985) destacam que as partículas de argila são conhecidas por aumentar a estabilidade de substratos orgânicos e aumentar a biossíntese microbiana. Ainda, segundo Innocenti (2005), a natureza e a quantidade de argila determinam a textura do solo e, consequentemente, o grau de contato polímero-solo e sua biodegradação. Dessa forma, solos argilosos formam agregados que dificultam a mistura do polímero com o mesmo, além de limitar a difusão de O_2 .

Em relação às texturas média argilosa e média arenosa o comportamento das blendas incubadas foi diferente, ou seja, os materiais apresentaram maior mineralização no solo de textura média argilosa (solo 4) sendo o tratamento sem N fertilizante o que apresenta resultados superiores e significativamente diferentes ($p < 0,0001$) para F2 e F3, em termos de mineralização, quando comparados ao solo de textura média arenosa (solo 5).

Outro ponto importante a ser destacado é o comportamento da celulose microcristalina, a qual atingiu cerca de 70,0 % de mineralização apenas no solo arenoso sem adição de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$. Nas outras condições a celulose não atingiu a porcentagem de C-CO₂ necessária para validar os ensaios, independentemente da textura do solo ou da adição de N fertilizante, como sugerido pela norma ASTM D 5988-03.

Como pode ser verificado na Tabela 19, a correção da relação C/N da celulose através da incorporação da solução de fosfato de amônio não contribuiu para o aumento da biodegradação da mesma.

Tabela 19. Mineralização dos materiais incubados por 180 dias em função do solo e sua relação C/N, com ou sem adição de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$.

Solo	Textura	Blendas	Mineralização média (%)
1	Arenosa sem adição de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$	F2	69,24 ^{abcd}
		F3	78,30 ^a
		celulose	75,68 ^{ab}
1	Arenosa com adição de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$	F2	72,85 ^{abc}
		F3	74,99 ^{ab}
		celulose	59,93 ^{abcde}
2	Média-arenosa sem adição de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$	F2	35,30 ^{ijkl}
		F3	41,92 ^{fghij}
		celulose	64,11 ^{abcde}
2	Média-arenosa com adição de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$	F2	35,41 ^{hijkl}
		F3	32,21 ^{jklm}
		celulose	52,05 ^{cdefg}
3	Argilosa sem adição de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$	F2	28,25 ^{klm}
		F3	35,64 ^{hijkl}
		celulose	54,59 ^{bcd ef}
3	Argilosa com adição de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$	F2	45,31 ^{efghij}
		F3	41,53 ^{fghij}
		celulose	45,34 ^{efghij}
4	Média-argilosa sem adição de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$	F2	46,85 ^{efghi}
		F3	50,02 ^{defgh}
		celulose	53,65 ^{bcd efg}
4	Média-argilosa com adição de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$	F2	42,18 ^{fghij}
		F3	49,20 ^{defghi}
		celulose	38,52 ^{ghijk}
5	Média-arenosa sem adição de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$	F2	23,74 ^m
		F3	26,88 ^{lm}
		celulose	53,25 ^{cdefg}
5	Média-arenosa com adição de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$	F2	36,05 ^{hijkl}
		F3	35,42 ^{hijk1}
		celulose	46,10 ^{efghi}

4.3.1 - C Biomassa Microbiana – Fase II

As Figuras 35 e 36, apresentam o C da biomassa microbiana (média obtida de replicatas) após os períodos de incubação dos materiais F2 e F3 nos solos especificados (solos 1 a 5), com ou sem a adição de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$.

Observa-se que no solo arenoso ocorre o mesmo comportamento do experimento da fase I, em que não foi feita a recuperação da biomassa, independentemente da adição ou não de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$. Os solos de texturas médias também não apresentam esse comportamento; por outro lado, pode-se notar que no solo argiloso há a tendência de fazer a manutenção da biomassa. Os resultados de mineralização do C e C biomassa corroboram os resultados de van Veen e col. (1985) que, em estudo com solos de textura arenosa e argilosa, incubados com [^{14}C] Glicose e [^{15}N] $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ concluíram que as taxas de liberação de $^{14}\text{CO}_2$, decaimento de ^{14}C residual, imobilização e mineralização de N e ^{15}N foram mais rápidas no solo arenoso do que no argiloso. Em contraste, ^{14}C biomassa apresentou-se 1,5 vezes maior no solo argiloso do que no arenoso. Ainda, segundo van Veen e col. (1985), a diferença entre os dois solos no comportamento do carbono pode ser explicada se o solo argiloso: a) possui grande capacidade de preservar ou proteger a biomassa, b) fornece um ambiente mais próximo para a interação microrganismo-produto e c) promove uma alta eficiência na utilização da glicose e de produtos metabólicos pela biota do solo.

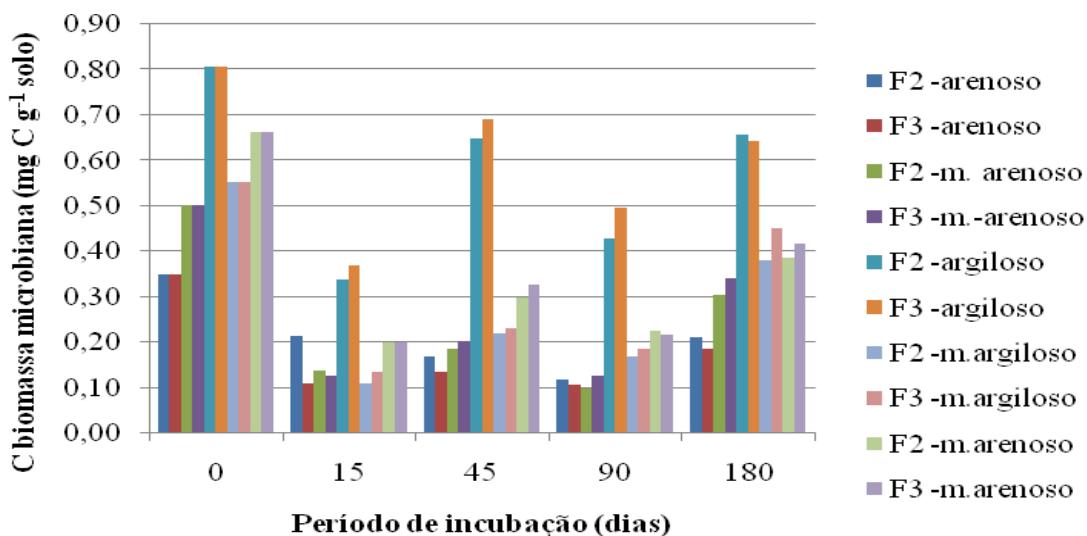


Figura 35. C Biomassa microbiana durante a incubação dos materiais F2 e F3 nos solos 1-5 sem adição de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$.

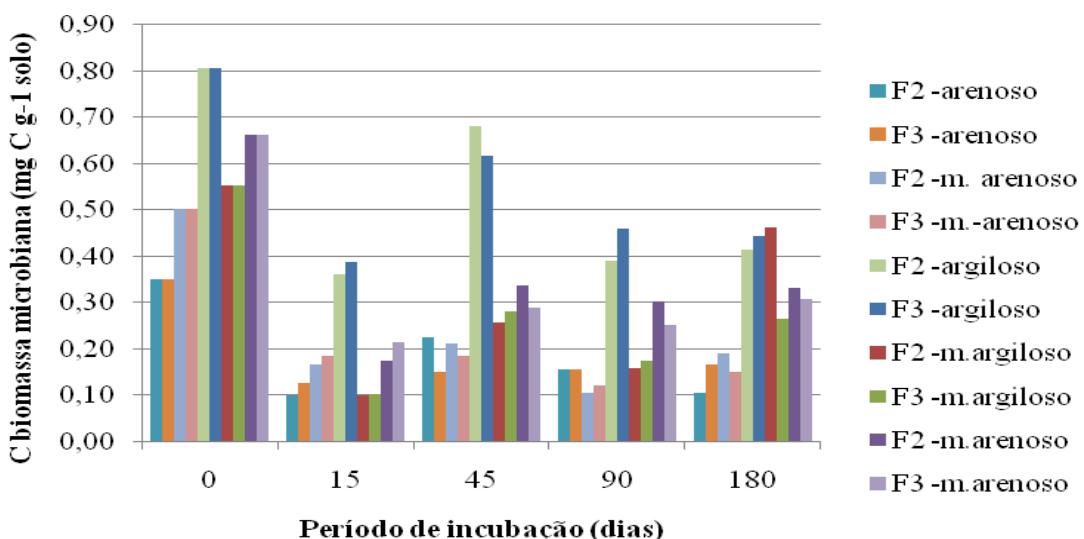


Figura 36. C Biomassa microbiana durante a incubação dos materiais F2 e F3 nos solos 1-5 com adição de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$.

Pela Tabela 20 é possível visualizar a porcentagem do C adicionado aos solos que foi mineralizado e assimilado. Observa-se que a porcentagem de C assimilado é bem baixa, o que, de acordo com Chiellini e col. (2007), pode ser justificado pela conversão do C da biomassa em CO₂. De qualquer forma, o solo de textura argilosa (solo 3) é o que apresenta maior assimilação de C na forma de biomassa, confirmando os resultados obtidos no experimento da fase I.

Tabela 20. Porcentagem de C assimilado e mineralizado.

Tratamento/formulação			C-Biomassa (mg g ⁻¹ solo)	C total Biomassa (mg)	C total adicionado (mg)	C mineralizado (%)	C assimilado (%)
Solo 1(arenoso)	F2	0,15	1,39	360,00	72,85	0,26	
com (NH ₄) ₂ HPO ₄	F3	0,15	1,35	360,00	74,99	0,40	
Solo 1 (arenoso)	F2	0,12	1,07	360,00	69,24	0,52	
sem (NH ₄) ₂ HPO ₄	F3	0,11	0,97	360,00	78,30	0,47	
Solo 2 (m.arenoso)	F2	0,10	0,95	360,00	35,41	0,49	
com (NH ₄) ₂ HPO ₄	F3	0,12	1,10	360,00	32,21	0,38	
Solo 2 (m.arenoso)	F2	0,10	0,89	360,00	35,30	0,78	
sem (NH ₄) ₂ HPO ₄	F3	0,13	1,16	360,00	41,92	0,87	
Solo 3 (argiloso)	F2	0,39	3,40	360,00	45,31	1,00	
com (NH ₄) ₂ HPO ₄	F3	0,46	4,00	360,00	41,53	1,07	
Solo 3 (argiloso)	F2	0,43	3,71	360,00	28,25	1,58	
sem (NH ₄) ₂ HPO ₄	F3	0,50	4,32	360,00	35,64	1,56	
Solo 4 (m. argiloso)	F2	0,16	1,38	360,00	42,18	1,12	
com (NH ₄) ₂ HPO ₄	F3	0,17	1,51	360,00	49,20	0,65	
Solo 4 (m. argiloso)	F2	0,17	1,46	360,00	46,85	0,92	
sem (NH ₄) ₂ HPO ₄	F3	0,19	1,62	360,00	50,02	1,08	
Solo 5 (m. arenoso)	F2	0,30	2,60	360,00	36,05	0,79	
com (NH ₄) ₂ HPO ₄	F3	0,25	2,18	360,00	35,42	0,74	
Solo 5 (m. arenoso)	F2	0,22	1,94	360,00	23,74	0,93	
sem (NH ₄) ₂ HPO ₄	F3	0,22	1,88	360,00	26,88	1,01	

CAPÍTULO 5 - CONCLUSÕES

- Os solos de diferentes texturas utilizados nos experimentos de biodegradação apresentaram valores de pH muito próximos mas também diferentes relações C/N, e nutrientes minerais. No entanto não foi possível relacionar esses atributos com a biodegradação dos materiais incubados.
- A Proteína Isolada de Soja (PIS) proporcionou a inserção de N na blenda e, consequentemente, a redução da relação C/N do material, atuando como um corretor dessa razão.
- A adição da PIS na blenda composta de PCL/Amido modificado não interferiu nas propriedades térmicas da mesma, além de ter proporcionado certo aumento nas propriedades mecânicas do material.
- As formulações com menor relação C/N tiveram maior conversão C-CO₂ na condição: solo arenoso sem adição de (NH₄)₂HPO₄, mostrando a importância da baixa relação C/N na mineralização de compostos orgânicos em condições naturais (sem adição de fertilizante).
- A mineralização das formulações foi maior no solo de textura arenosa e o C da biomassa microbiana apresentou-se maior para o solo de textura argilosa, mostrando a importância de se realizar testes de biodegradação completos e em pelo menos dois solos diferentes.
- A formação de biofilme na superfície das amostras incubadas dificultou a avaliação da biodegradação por redução na massa molecular média do material, método este que deve ser usado com cautela.
- Os fungos provavelmente foram os microrganismos predominantes no processo de biodegradação dos materiais. Entre diversos gêneros isolados os que foram encontrados em todas as condições, solos e materiais estudados foram: *Fusarium* sp., *Trichoderma* sp., *Aspergillus* sp. e *Penicillium* sp.
- Não foi encontrada toxicidade após a biodegradação das formulações nem a formação de intermediários que possam ser tóxicos a plantas, conforme mostraram os ensaios de germinação de sementes.

CAPÍTULO 6 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBERTSSON, A. C.; ERLANDSSON, B.; MINNA HAKKARAINEN; KARLSSON, S. Molecular Weight Changes and Polymeric Matrix Changes Correlated with the Formation of Degradation Products in Biodegraded Polyethylene. *Journal of Environmental Polymer Degradation*, v.6, n.4, 1998.
- AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS - ASTM. Standard Guide for Conducting Terrestrial Plant Toxicity Tests, E 1963 - 02, 2002.
- AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS – ASTM. Standard Test Method for Determining Aerobic Biodegradation in Soil of Plastic Materials or Residual Plastic Materials After Composting, D 5988-03, 2003.
- ANDERSON, J. P. E. Soil respiration. In: PAGE, A. L.; MILLER, R. H.; KEENEY, D. R. Methods of soil analysis – Part 2 - Chemical and microbiological properties, Wisconsin: Madison, 1982.
- AVELLA, M.; ERRICO, M. E.; RIMEDIO, R.; SADOCCO, P. Preparation of biodegradable polyesters/high-amylase-starch composites by reactive blending and their characterization. *Journal of Applied Polymer Science*, v. 83, p. 1432-1442, 2002.
- AVEROUS, L.; BOQUILLON, N. Biocomposites based on plasticized starch: thermal and mechanical behaviours. *Carbohydrate polymers*, v.56, p.111–122, 2004.
- AVEROUS, L.; MORO, L.; DOLE, P.; FRINGANT, C. Properties of thermoplastic blends: starch-polycaprolactone. *Polymer*, v. 41, p. 4157–4167, 2000.
- BARBOSA, A. M.; CUNHA, P. D. T. DA; PIGATTO, M. M.; SILVA, M. DE L. C. DA. Produção e Aplicações de Exopolissacarídeos Fúngicos. *Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas*, v. 25, n.1, p. 29-42, 2004.
- BASTIOLI, C. Handbook of biodegradable polymers. United Kingdon: Rapra Technology Limited, 2005, 549 p.
- BASTIOLI, C. Properties and applications of Mater-Bi starch-based materials. *Polymer Polymer Degradation and Stability*, v.59, p.263 – 272, 1998.
- BOHLMANN, G. M. General Characteristics, Processability, Industrial Applications and Market Evolution of Biodegradable Polymers. In: BASTIOLI, C. Handbook of biodegradable polymers. United Kingdon: Rapra Technology Limited, 2005, p. 183-212.
- CANEVAROLO JUNIOR, S. V. Ciência dos Polímeros: Um texto básico para tecnólogos e engenheiros. São Paulo: Artliber, 2006, 280p.

- CÉSAR, M. E. F.; MARIANI, P. D. S. C.; MEI L. H. I.; CARDOSO E. J. B. N. Particle size and concentration of Poly(ϵ -caprolactone) and adipate modified starch blend on mineralization in soils with differing textures. *Polymer Testing*, v.28, p.680-687, 2009.
- CHANDRA, R.; RUSTGY, R. Biodegradable Polymers. *Progress in polymer science*, v.23, p.1273-1335, 1998.
- CHIELLINI, E.; CORTI, A.; D'ANTONE, S.; BILLINGHAM, N. C. Microbial biomass yield and turnover in soil biodegradation tests: carbon substrate effects. *Journal of polymers and the environment*, v.15, p.169-178, 2007.
- CHOI, W.Y.; LEEB C. M.; PARKA H. J. Development of biodegradable hot-melt adhesive based on poly (ϵ -caprolactone) and soy protein isolate for food packaging system. *Lwt*, v.39, p.591–597, 2006.
- DAY, M.; KRZYMIEN, M.; SHAW, K.; ZAREMBA, L.; WILSON, W. R.; BOTDEN, C.; THOMAS, B. *Compost Science & Utilization*, v.6, p.44–66, 1998.
- DEAN, K.; YU, L.; BATEMAN, S.; WU, D. Y. Gelatinized Starch/Biodegradable Polyester Blends: Processing, Morphology, and Properties. *Journal of Applied Polymer Science*, v.103, p.802–811, 2007.
- DENG, R.; CHEN, Y.; CHEN, P.; ZHANG, L.; LIAO, B. Properties and biodegradability of water-resistant soy protein/poly (ϵ -caprolactone)/toluene-2,4-diisocyanate composites. *Polymer Degradation and Stability*, v.91, p.2189-2197, 2006.
- EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA - EMBRAPA, Embrapa algodão - sistemas de produção, 2003. Disponível em: <http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Algodoao/AlgodoaoIrrigado/solos.htm>, Acesso em: 24/07/09
- EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA - EMBRAPA. Manual de métodos e análise de solo. Rio de Janeiro: Centro Nacional de Pesquisas de Solos, 1997, 212 p. (EMBRAPA - CNPS. Documento, 1).
- EYA, H.; IWAKI, N.; OTSUJI, Y. In: DOI, Y.; FUKUDA, K. Biodegradable polymers and plastics, Amsterdan: Elsevier Science BV, 1994, p.337-344.
- FILIPCZAK, K.; WOZNIAK, M.; ULANSKI, P.; OLAH, L.; PRZYBYTNIAK, G.; OLKOWSKI, R. M.; LEWANDOWSKA-SZUMIEL, M.; ROSIAK, J. M. Poly(ϵ -caprolactone) biomaterial sterilized by e-beam irradiation. *Macromolecular Bioscience*, v.6, p.261-273, 2006.
- FLEMMING, HANS-CURT. Relevance of biofilms for the biodeterioration of surfaces of polymeric materials. *Polymer degradation and stability*, v.59, p.309-315, 1998.

FRANCO, C. R.; CYRAS, V. P.; BUSALMEN, J. P.; RUSECKAITE, R. A.; VÁZQUEZ, A. Degradation of polycaprolactone/starch blends and composites with sisal fibre. *Polymer Degradation and Stability*, v.86, n.1, p.95-103, 2004.

FRIED, J. R. *Polymer Science and Technology*. PTR Prentice Hall (ISBN 0-13-685561-X), 1995.

FRITZ, J. Ecotoxicological Aspects in the Biodegradation Process of Polymers. In: BASTIOLI, C. *Handbook of biodegradable polymers*. United Kingdom: Rapra Technology Limited, 2005, p.103-137.

GRIMA, S.; BELLON-MAUREL, V.; FEUILLOLEY, P.; SILVESTRE, F. Aerobic biodegradation of polymers in solid-state conditions: a review of environmental and physicochemical parameter settings in laboratory simulations. *Journal of Polymers and the Environment*, v.8, n.4, p.183-195, 2002.

GUILBERT, S.; CUQ, B. Material Formed from Proteins. In: BASTIOLI, C. *Handbook of biodegradable polymers*. United Kingdom: Rapra Technology Limited, 2005, p.339-384.

HAKKARAINEN, M.; ALBERTSSON, A. C. Heterogeneous biodegradation of polycaprolactone – low molecular weight products and surface changes. *Macromolecular chemistry and physics*, v.203, p.1357-1363, 2002.

HÖGLUND, A.; HAKKARAINEN, M.; ALBERTSSON, A. C. Degradation Profile of Poly(ϵ -caprolactone)-the Influence of Macroscopic and Macromolecular Biomaterial Design *Journal of Macromolecular Science, Part A*, v.44, n. 9, p.1041-1046, 2007.

HOSHINO, A.; SAWADA, H.; YOKOTA, M.; TSUJI, M.; FUKUDA, K.; KIMURA, M. Influence of weather conditions and soil properties on degradation of biodegradable plastics in soil. *Soil science and plant nutrition*, v.47, n.1, p.35-43, 2001.

IBGE, Diretoria de Pesquisas, Departamento de População e Indicadores Sociais, Pesquisa Nacional de Saneamento Básico 2000. Disponível em: http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/condicaodevida/pnsb/lixo_coletado/lixo_coletado110.shtml. Acesso em: 03/01/2009.

INNOCENTI, F. D. Biodegradation Behaviour of Polymers in the Soil. In: BASTIOLI, C. *Handbook of biodegradable polymers*. United Kingdom: Rapra Technology Limited, 2005, p.57-108.

INNOCENTI, F. D. Biodegradability and Compostability: the international norms. In: CHIELLINI, E.; SOLARO, R. *Biodegradable polymers and plastics*. New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers, 2003.

ISHIAKU, U. S.; PANG, K. W.; LEE, W. S.; ISHAK, Z. A. MOHD. Mechanical properties and enzymic degradation of thermoplastic and granular sago starch filled poly(ϵ -caprolactone). *European polymer journal*, v.38, p.393-401, 2002.

- ISHII, N.; INOUE, Y.; TAGAYA, T.; MITOMO, H.; NAGAI, D.; KASUYA, K. I. Isolation and characterization of poly(butylene succinate)-degrading fungi. *Polymer Degradation and Stability*, v. 93, n. 5, p.883-888, 2008.
- JANE, J. Starch properties, modifications and applications. In: ALBERTSSON, A. C., HUANG, J. S. Degradable polymers, recycling, and plastics waste management, New York (USA): Marcel Dekker, 1995.
- JAYASEKARA, R.; HARDING, I.; BOWATER, I.; LONERGAN, G. Biodegradability of a selected range of polymers and polymer blends and standard methods for assessment of biodegradation. *Journal of Polymers and the Environment*, v.13, n.3, p.231-251, 2005.
- KAPANEN, A.; SCHETTINI, E.; VOX, G.; ITAVAARA, M. Performance and environmental impact of biodegradable films in agriculture: a field study on protected cultivation. *Journal of polymers and the environment*, v.16, n.2, p.109-122, 2008.
- KARLSSON, S.; ALBERTSSON, A. C. Techniques and mechanisms of polymer degradation. In: SCOTT, G.; GILEAD, D. Degradable polymers, principles and applications, London: Chapman & hall, 1995.
- KHARE, A.; DESHMUKH, S. Studies toward producing eco-friendly plastics. *Journal of plastic film & sheeting*, v.22, p.193-211, 2006.
- KIEHL, E. J. Manual de compostagem: maturação e qualidade do composto. São Paulo. Editado pelo autor, p. 11,13 e 47, 2002.
- KOUTNY, M.; LEMAIRE, J.; DELORT, A. M. Biodegradation of polyethylene films with prooxidant additives. *Chemosphere*, v.64, n.8, p.1243-1252, 2006.
- KRZAN, A.; HEMJINDA, S.; MIERTUS, S.; CORTI, A.; CHIELLINI, E. Standardization and certification in the area of environmentally degradable plastics. *Polymer Degradation and Stability*, v.91, p.2819-2833, 2006.
- KUMAR, A.; GUPTA, R.K. Fundamentals of Polymers, McGraw-Hill Companies Inc.: EUA, 1998.
- LEFÈVRE, C.; TIDJANI, A.; WAUVEN, C. V.; DAVID, C. The Interaction Mechanism between Microorganisms and Substrate in the Biodegradation of Polycaprolactone. *Journal of Applied Polymer Science*, v. 83, p.1334–1340, 2002.
- LEHNINGER, A. L.; NELSON, D.L.; COX, M.M. Principles of Biochemistry. 4. ed. Sarvier, 2005, 1232 p.
- LENZ, R. W. Biodegradable Polymers. *Advances in Polymer Science*, v.107, p.1-40, 1993.

- LI, S; VERT, M. Biodegradation of aliphatic polyesters. In: SCOTT, G.; GILEAD, D. Degradable polymers, principles and applications, London: Chapman & hall, 1995.
- LLOYD, M. ROBESON. Polymer Blends: A comprehensive review. Hanser Gardner Publications, Ohio, USA, 2007, 451 p.
- LUCAS, N.; BIENAIME, C.; BELLOY, C.; QUENEUDEC, M.; SILVESTRE, F.; NAVASAUCEO, J. E. Polymer biodegradation: Mechanisms and estimation techniques. *Chemosphere*, v.73, p.429–442, 2008.
- MANAHAN, S. E. Environmental Science and Technology. New York: Lewis Publishers, 1997, 641 p.
- MANO, E. B.; MENDES, L. C. Introdução a polímeros. 2. ed. Rio de Janeiro: Edgard Blücher Ltda, 1999, 191 p.
- MARIANI, P. D. S. C.; VINAGRE NETO, A. P.; SILVA JUNIOR, J. P.; CARDOSO, E. J. B. N.; ESPÓSITO, E.; MEI, L. H. I. Mineralization of poly (ϵ -caprolactone) and adipate modified starch blend in agricultural soil. *Journal of polymers and the environment*, v.15, p.19-24, 2007.
- MATZINOS, P.; TSERKI, V.; KONTOYIANNIS, A.; PANAYIOTOU, C. Processing and characterization of starch/polycaprolactone products. *Polymer degradation and Stability*, v.77, p.17-24, 2002.
- MEI, L. H. I.; MARIANI, P. D. S. C. Visão geral sobre polímeros ou plásticos ambientalmente degradáveis (PADs). Campinas: Editora e Gráfica Flamboyant, 2005. v. 1. 41 p.
- MENEZES, J. P. Trichoderma spp - microrganismo utilizado no controle de fitopatógenos. Disponível em: <<http://www.agronline.com.br/artigos/artigo.php?id=91>>. Acesso em: 24 de abril de 2009.
- MIERTUS, S.; REN, X. Environmentally Degradable Plastics and ICS-UNIDO Global Program IN: CHIELLINI, E., SOLLARO, R. Biodegradable Polymers and Plastics. New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers, 2003.
- MOHANTY, A.K.; MISRA, M.; DRZAL, L.T. Sustainable Bio-Composites from Renewable Resources: Opportunities and Challenges in the Green Materials World. *Journal of polymers and the environment*, v.10, p.19-26, 2002.
- MONTEIRO, R. T. R. Degradação de pesticidas. In: MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L Microbiologia Ambiental. Brasília: Embrapa-CNPMA, 1997, p.107-124.
- MOREIRA, F. M. S., SIQUEIRA, J. O. Microbiologia e Bioquímica do Solo. Lavras: UFLA, 2006, 729 p.

MUNGARA, P.; CHANG, T.; ZHU, J.; JANE, J. Processing and physical properties of plastics made from soy protein polyester blends. *Journal of Polymers and the Environment*, v.10, Nos. 1/2, 2002.

MURPHY, C. A.; CAMERON, J. A.; HUANG, S. J.; VINOPAL, R. T. *Fusarium* polycaprolactone depolymerase is cutinase. *Applied and environmental microbiology*, v.62, p.456–460, 1996.

NISHIDE, H.; TOYOTA, K.; KIMURA, M. Effects of soil temperature and anaerobiosis on degradation of biodegradable plastics in soil and their degrading microorganisms. *Soil science and plant nutrition*, v.45, p.963-972, 1999.

NISHIOKA, M.; TUZUKI, T.; WANAJYO, T.; OONAMI, H.; HORIUCHI, T. In DOI, Y. and FUKUDA, K. Biodegradable Polymers and Plastics, Amsterdam: Elsevier Science BV, 1994, p.584–590.

ODIAN, G. Principles of Polymerization. New York: Wiley- Interscience, 4^a ed, 2004. 832 p.

ODUSANYA, O. S.; MANAN, D.M.A.; ISHIAKU, U.S.; AZEMI, B.M.N. Effect of starch pre-drying on the mechanical properties of starch/poly(ϵ -caprolactone) composites. *Journal of Applied Polymer Science*, v.87, p.877-884, 2003.

OLIVEIRA, M. W. DE; TRIVELIN, P. C. O.; GAVA, G. J. DE C. Sugarcane trash degradation. *Scientia Agrícola*, v.56, n.4, p.803–809, 1999.

ORÉFICE, R. L.; VASCONCELOS, W. L.; MORAES, M. A. S. Estabilidade de fases em blendas de policarbonato-poliestireno avaliada por micro-ftir, análise térmica e microscopia eletrônica de varredura. *Polímeros: Ciência e Tecnologia*, v.14, n.2, p.129-133, 2004.

POMETTO, A. L.; JOHNSON, K. E.; KIM, M. Pure-culture and enzymatic assay for starch-polyethylene degradable plastic biodegradation with *Streptomyces* species. *Journal of Polymers and the Environment*, v.1, n.3, p.213-221, 1993.

PRADELLA, J. G. C. Biopolímeros e intermediários químicos. Relatório Técnico n. 84 396-205. Centro de tecnologia de processos e produtos, 2006, p.119.

RAIJ, B. van; ANDRADE, J. C. de; CANTARELLA, H.; QUAGIO, J. A. Análise química para avaliação da fertilidade de solos tropicais. Campinas: Instituto Agronômico, 2001. 285 p.

SCHMIDT, V.; SOLDI, V. Influence of polycaprolactone-triol addition on thermal stability of soy protein isolate based films. *Polymer degradation and stability* v.91, p.3124-3130, 2006.

SCOTT, G.; WILES, D. M. Programmed-life plastics from polyolefins: a new look at Sustainability. *Biomacromolecules*, v.2, n.3, 2001.

SCOTT, G. Science and Standards. In: CHIELLINI, E.; SOLARO, R. Biodegradable polymers and plastics. New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers, 2003.

- SHAH, A. A.; HASAN, F.; HAMEED, A.; AHMED, S. Biological degradation of plastics: A comprehensive review. *Biotechnology advances*, v.26, p.246–265, 2008.
- SHIN, B. Y.; NARAYAN, R.; LEE, SANG. I.; LEE, T. J. Morphology and rheological properties of blends of chemically modified thermoplastic starch and polycaprolactone. *Polymer engineering and science*, p.2126-2133, 2008.
- SINGH, B.; SHARMA, N. Mechanistic implications of plastic degradation. *Polymer Degradation and Stability*, v.93, p.561-584, 2008.
- SINGH, R. P.; PANDEY, J. K.; RUTOT, D.; DEGÉE, Ph.; DUBOIS, Ph. Biodegradation of poly(ϵ -caprolactone)/starch blends and composites in composting and culture environments: the effect of compatibilization on the inherent biodegradability of the host polymer. *Carbohydrate Research*, n.338, p.1759-1769, 2003.
- SOARES, R. M. D.; SCREMIN F. F.; SOLDI V. Thermal Stability of Biodegradable Films Based on Soy Protein and Corn Starch. *Macromolecular Symposia*, v.229, p.258–265, 2005.
- SOFTWARE STATISTICAL ANALYSIS SYSTEM – SAS. Procedures guides. Version 6. Cary [Estados Unidos]: SAS by SAS INSTITUTE –Inc. Cary, NC, USA. 2002/ 2003.
- SOTERO, A. P. Plásticos Biodegradáveis trazem melhoria ambiental. ago. 2000. Disponível em: <<http://www.jorplast.com.br/jpago00/ago006.html>>, Acesso em: 09/01/2009.
- STENGER, R.; BARKLE, G. F.; BURGESS, C. P. Mineralization and immobilization of C and N from dairy farm effluent (DFE) and glucose plus ammonium chloride solution in three grassland topsoils. *Soil Biology and Biochemistry*, v.33, n.7-8, p.1037-1048, 2001.
- SWAIN, S. N.; BISWAL, S. M.; NANDA, P. K.; NAYAK PADMA L. Biodegradable soy-based plastics: opportunities and challenges. *Journal of Polymers and the Environment*, v.12, n.1, p.35-42, january 2004.
- TOKIWA, Y.; CALABIA, B. P. Biodegradability and biodegradation of polyesters. *Journal of polymers and the environment*, v.15, p.259-267, 2007.
- TUMMALA, P.; LIU, W.; DRZAL, L. T.; MOHANTY, A. K.; MISRA M. Influence of plasticizers on thermal and mechanical properties and morphology of soy-based bioplastics. *Industrial & engineering chemistry research*, v.45, p.7491-7496, 2006.
- VAN VEEN, J. A.; LADD, J. N.; AMATO, M. Turnover of carbon and nitrogen through the microbial biomass in a sandy loam and a clay soil incubated with [$^{14}\text{C}(\text{U})$] glucose and [^{15}N] $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ under different moisture regimes. *Soil Biology and Biochemistry*, v.17, n.6, p.747-756, 1985.

- VAN VEEN, J. A.; LADD, J. N.; MAJUW, J. K.; AMATO, M. Turnover of carbon, nitrogen and phosphorus through the microbial biomass in soils incubated with ^{14}C -, ^{15}N - and ^{32}P - labelled bacterial cells. *Soil Biology and Biochemistry*, v.19, n.5, p.559-565, 1987.
- VANCE, E. D.; BROOKS, P. C.; JENKINSON, D. S. An extraction method for measuring soil microbial biomass C. *Soil Biology and Biochemistry*, v.19, p. 703-707, 1987.
- WANG, S. H. Biodegradable protein/starch based thermoplastic composition. Patent number 5922379.USA, 1999.
- WANG, W.J.; DALAL, R.C.; MOODY, P.W.; SMITH, C.J. Relationships of soil respiration to microbial biomass, substrate availability and clay content. *Soil Biology and Biochemistry*, v.35, p.273–284, 2003.
- WU, C. S. Physical properties and biodegradability of maleated-polycaprolactone/starch composite. *Polymer Degradation and Stability*, v.80, p.127-134, 2003.
- YABANNAVAR, A. V.; BARTHA, R. Methods for Assessment of Biodegradability of Plastic Films in Soil. *Applied and Environmental Microbiology*, v.60, n.10, p.3608-3614, 1994.
- YAVUZ, H.; BABAÇ, C. Preparation and biodegradation of starch/polycaprolactone films. *Journal of polymers and the environment*, v.11, n.3, p.107-113, 2003.
- YU, L.; DEAN, K.; LI, L., Polymer blends and composites from renewable resources. *Progress in Polymer Science*, v.31, p.576-602, 2006.
- ZEE, M. V. D. Biodegradability of Polymers – Mechanisms and Evaluation Methods. In: Handbook of biodegradable polymers. United Kingdom: Rapra Technology Limited, 2005, p.1-22.
- ZHAO, R.; TORLEY, P.; HALLEY, P. J. Emerging biodegradable materials: starch- and protein-based bio-nanocomposites. *Journal of materials science*, v.43, p.3058–3071, 2008.
- ZHONG, Z.; SUN, X. S. Properties of soy protein isolate/PCL blends compatibilized by methylene diphenyl diisocyanate. *Polymer*, v.42, p.6961-6969, 2001.
- ZHOU, Z.; ZHENG, H.; WEI, M.; HUANG, J.; CHEN, Y. Structure and mechanical properties of cellulose derivatives/soy protein isolate blends. *Journal of applied polymer science*, v.107, p.3267–3274, 2008.

ANEXO I

Cromatogramas obtidos por meio da análise de cromatografia de permeação em gel antes e após 14 dias de biodegradação no solo arenoso.

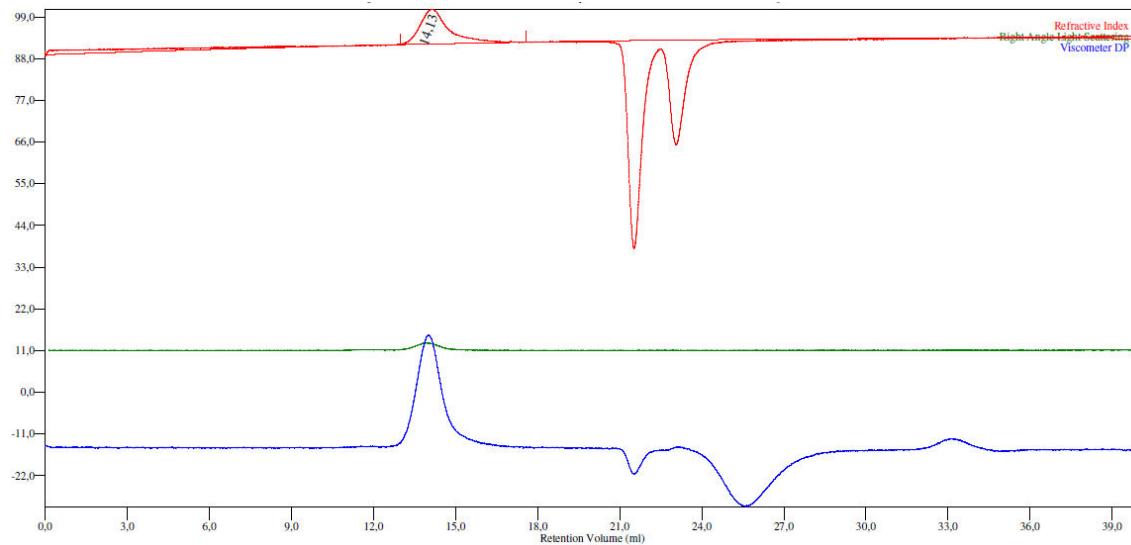


Figura 37. Cromatograma da análise de cromatografia de permeação em gel para a amostra de PCL puro antes do processamento

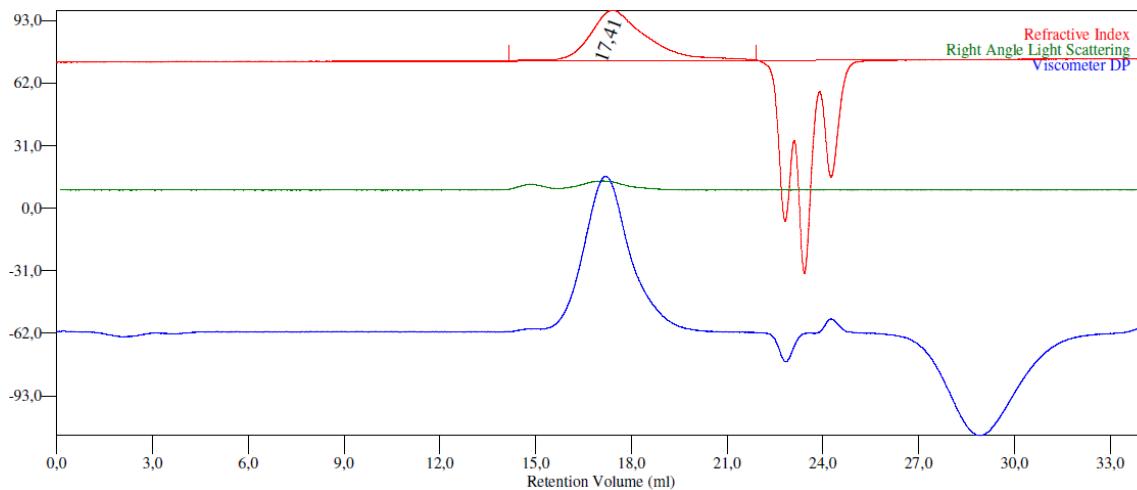


Figura 38. Cromatograma da análise de cromatografia de permeação em gel para a amostra de PCL puro (F1) após o processamento

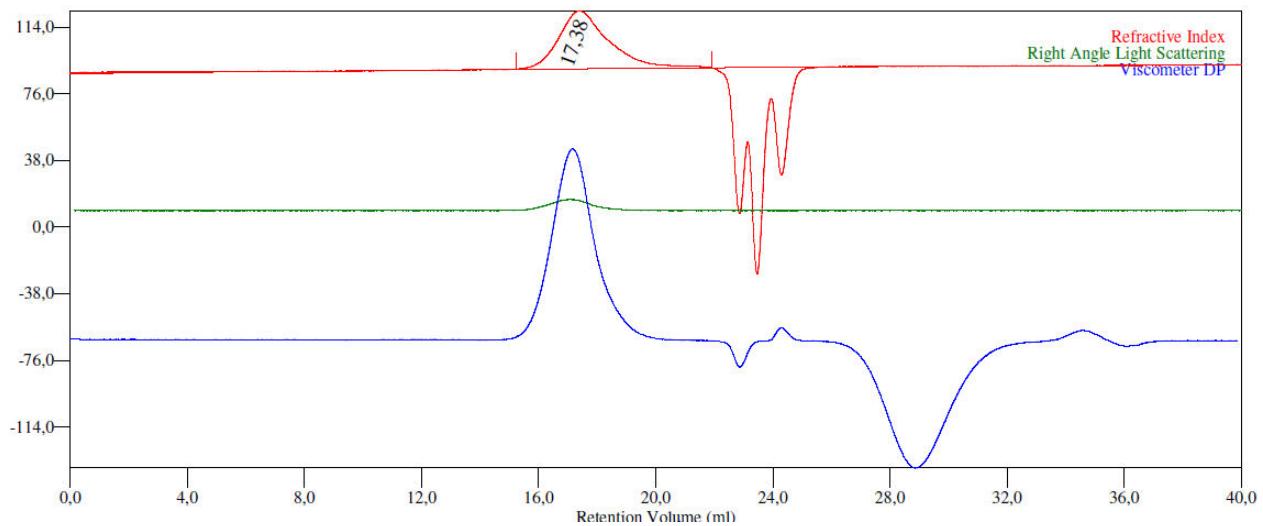


Figura 39. Cromatograma da análise de cromatografia de permeação em gel para a blenda de PCL/amido (F2) após o processamento

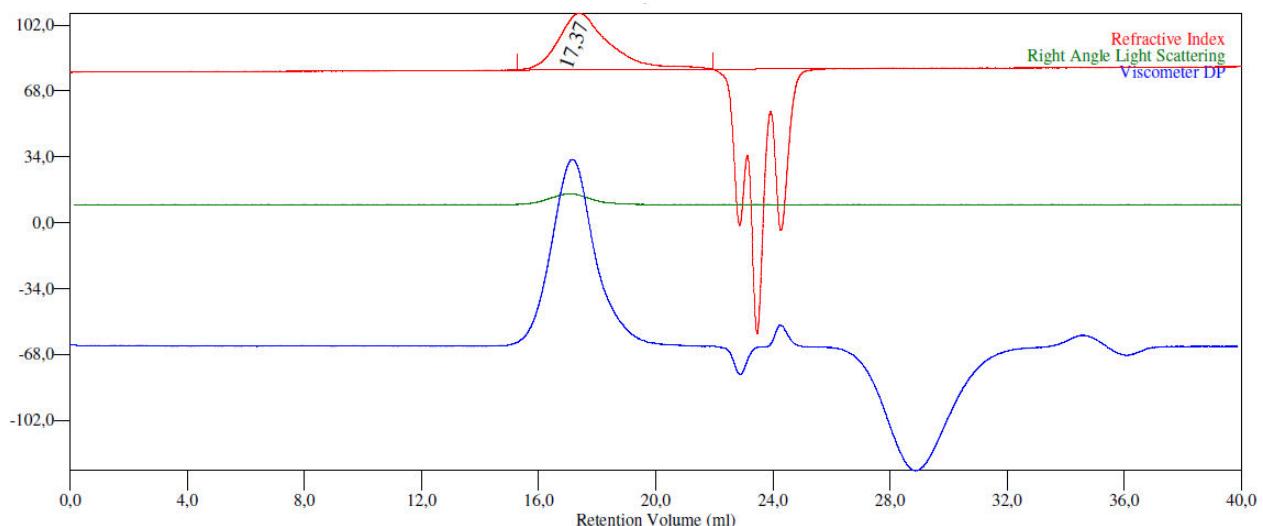


Figura 40. Cromatograma da análise de cromatografia de permeação em gel para a blenda de PCL/Amido/PIS (F3) após o processamento

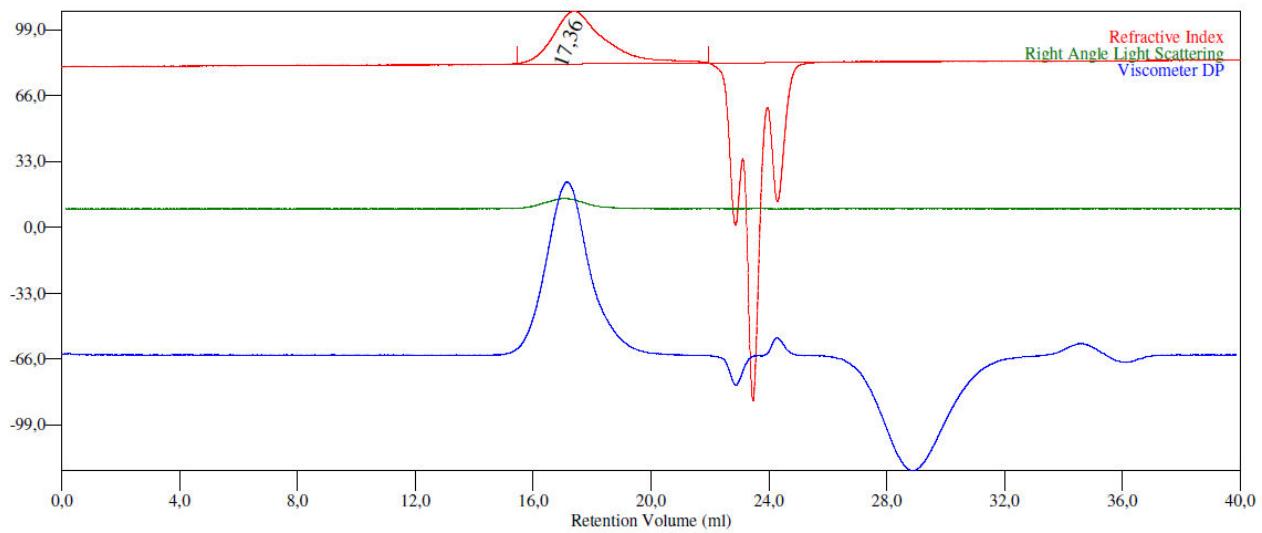


Figura 41. Cromatograma da análise de cromatografia de permeação em gel para a blenda de PCL/Amido/PIS (F4) após o processamento

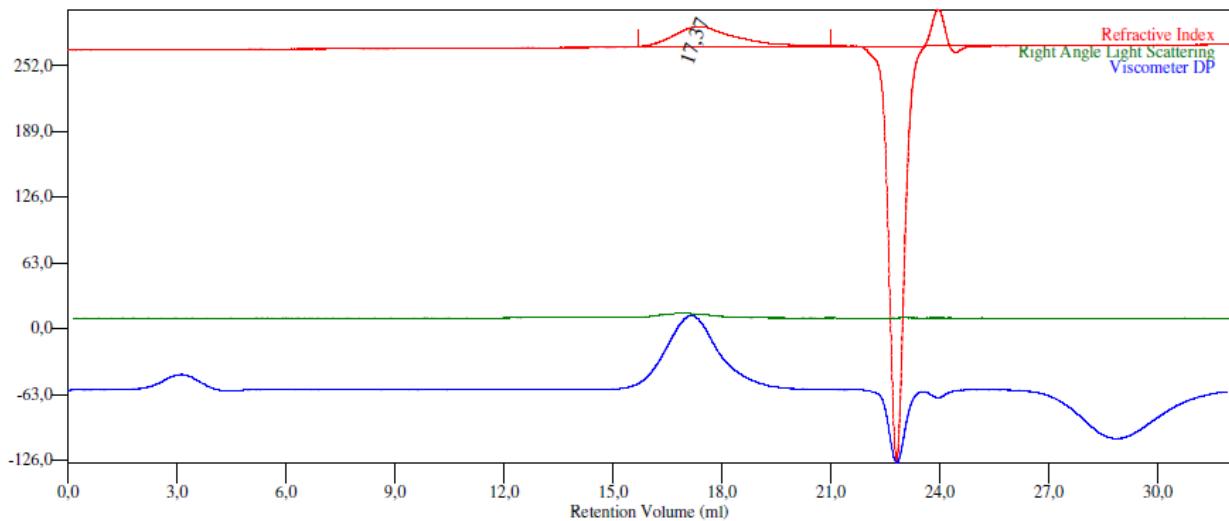


Figura 42. Cromatograma da análise de cromatografia de permeação em gel para a amostra de PCL puro (F1) após 14 dias de incubação no solo arenoso sem adição de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$.

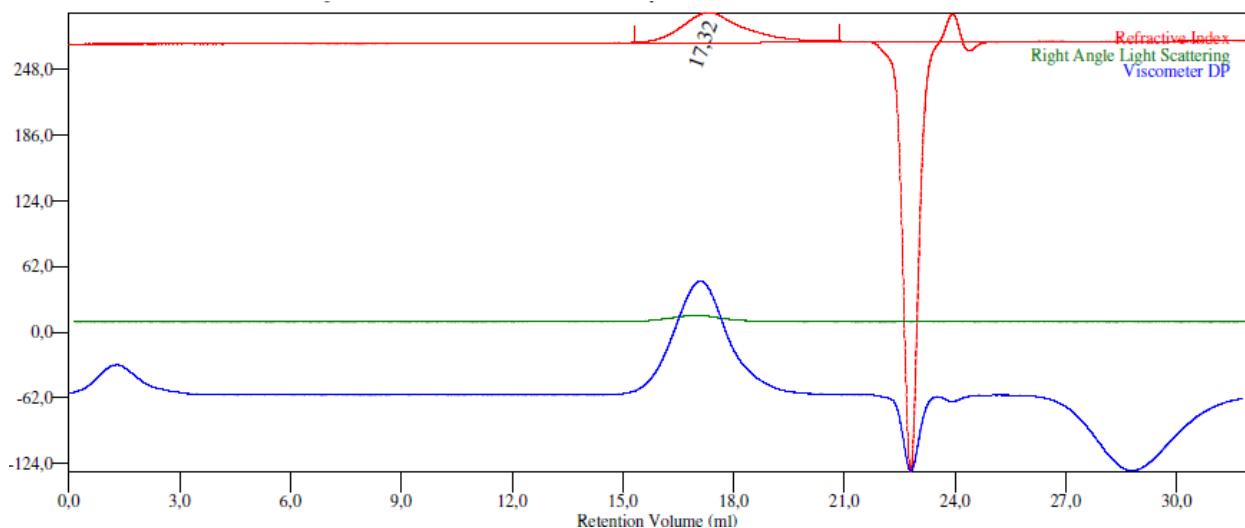


Figura 43. Cromatograma da análise de cromatografia de permeação em gel para a amostra de PCL/Amido (F2) após 14 dias de incubação no solo arenoso sem adição de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$.

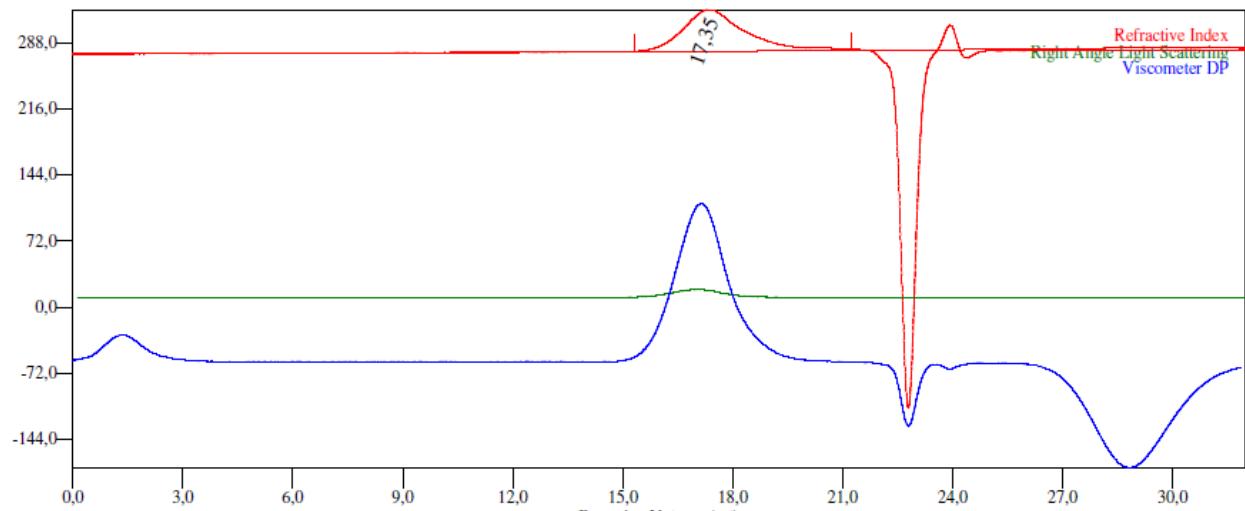


Figura 44. Cromatograma da análise de cromatografia de permeação em gel para a amostra de PCL/Amido/PIS (F3) após 14 dias de incubação no solo arenoso sem adição de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$.

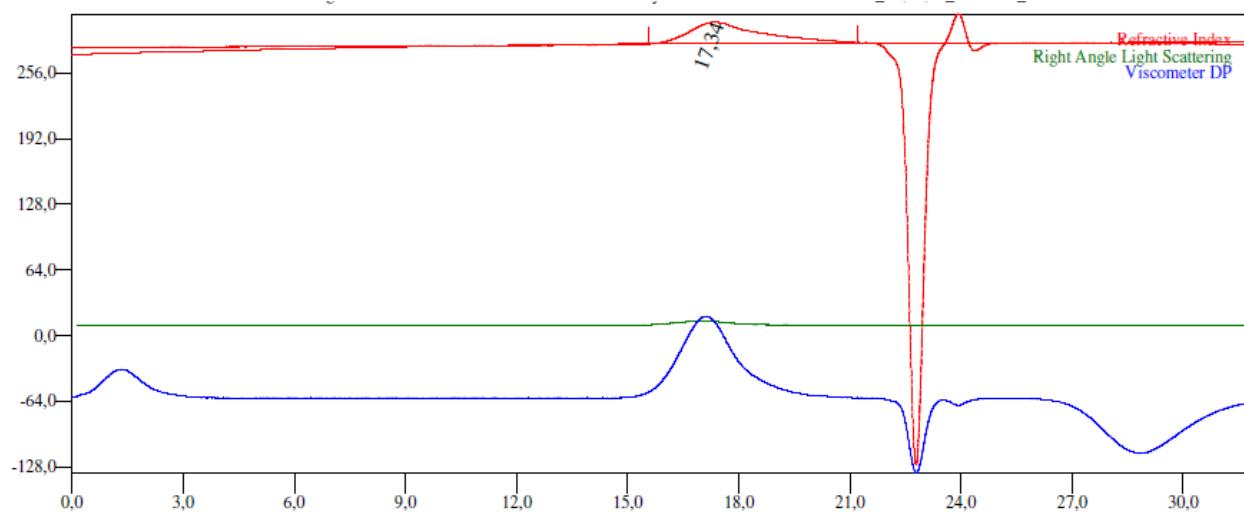


Figura 45. Cromatograma da análise de cromatografia de permeação em gel para a amostra de PCL/Amido/PIS (F4) após 14 dias de incubação no solo arenoso sem adição de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$.

ANEXO II

Derivada primeira das análises termogravimétricas das amostras F1, F2, F3 e F4.

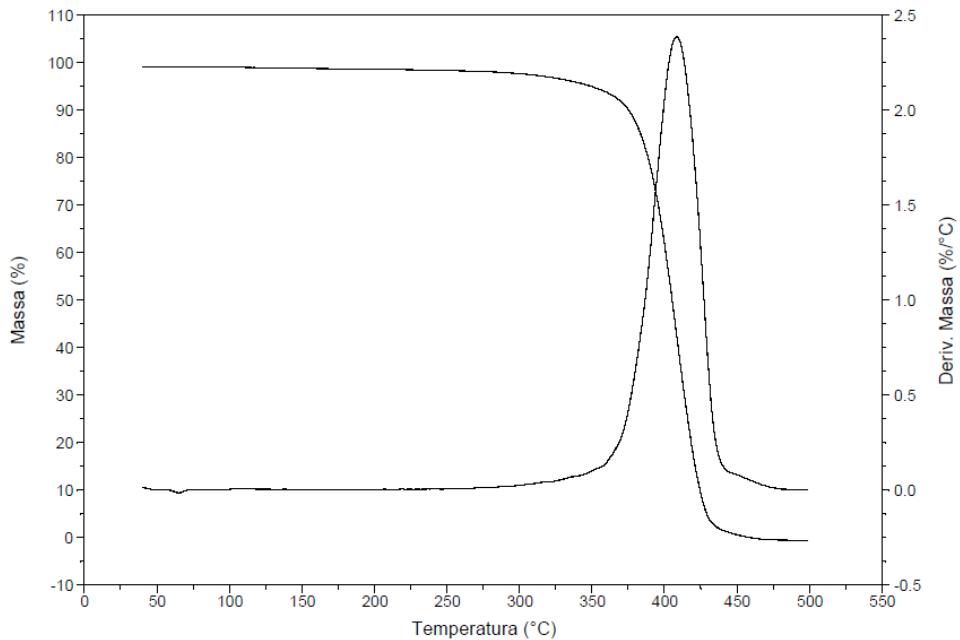


Figura 46. Derivada primeira da análise termogravimétrica da amostra de PCL puro (F1)

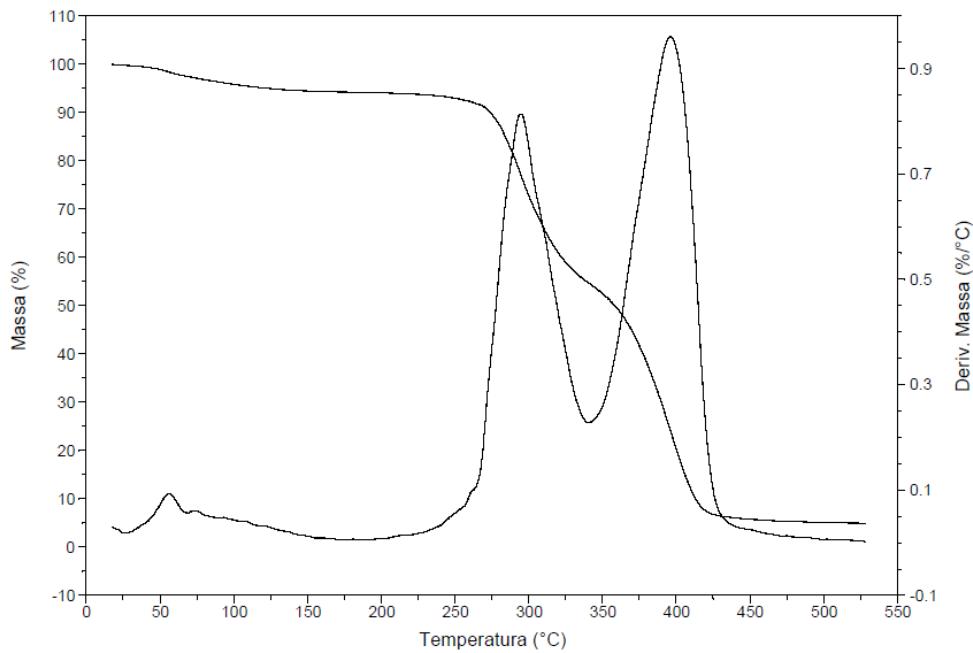


Figura 47. Derivada primeira da análise termogravimétrica da amostra de PCL/Amido (F2)

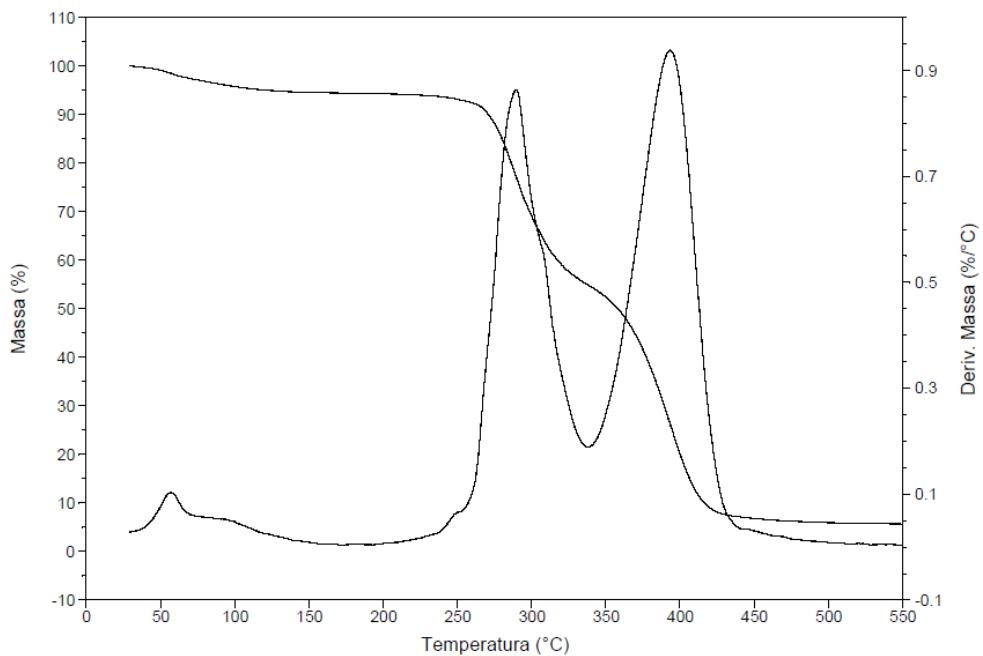


Figura 48. Derivada primeira da análise termogravimétrica da amostra de PCL/Amido/PIS (F3)

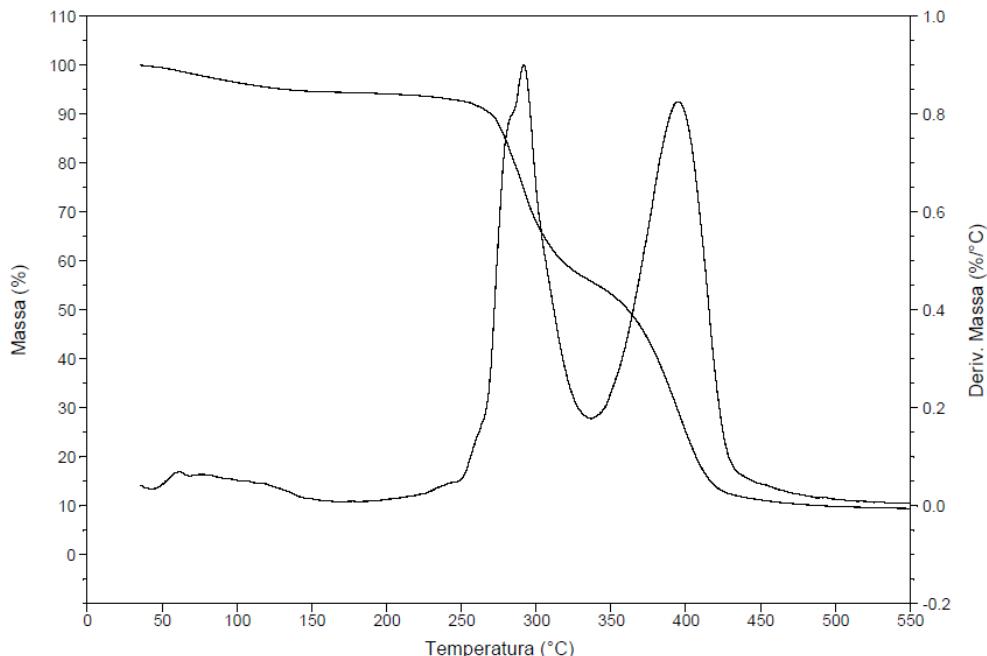


Figura 49. Derivada primeira da análise termogravimétrica da amostra de PCL/Amido/PIS (F4)

ANEXO III

Curvas Térmicas de DSC obtidas para as amostras F1, F2, F3 e F4.

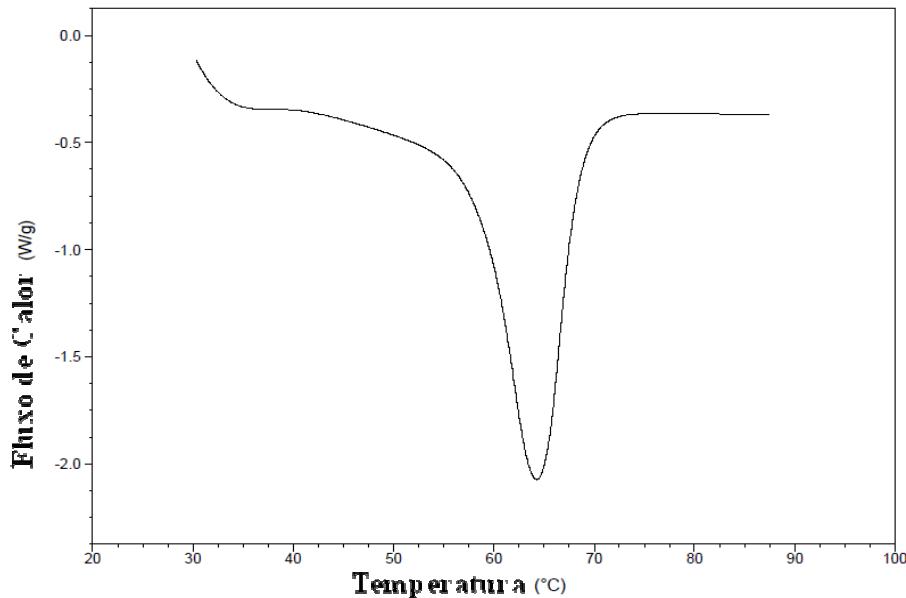


Figura 50. Termograma da amostra de PCL Puro (F1)

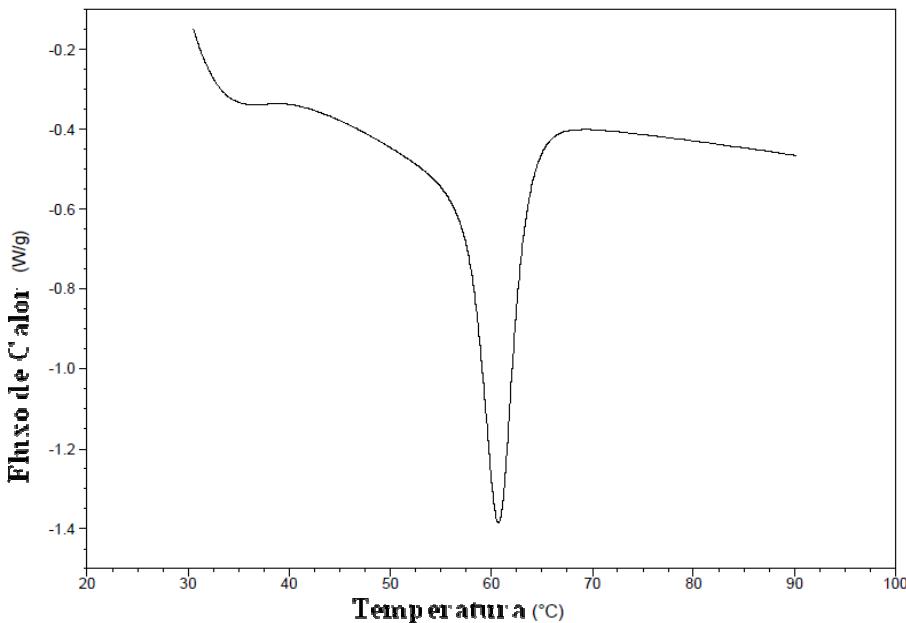


Figura 51. Termograma da amostra de PCL/Amido (F2)

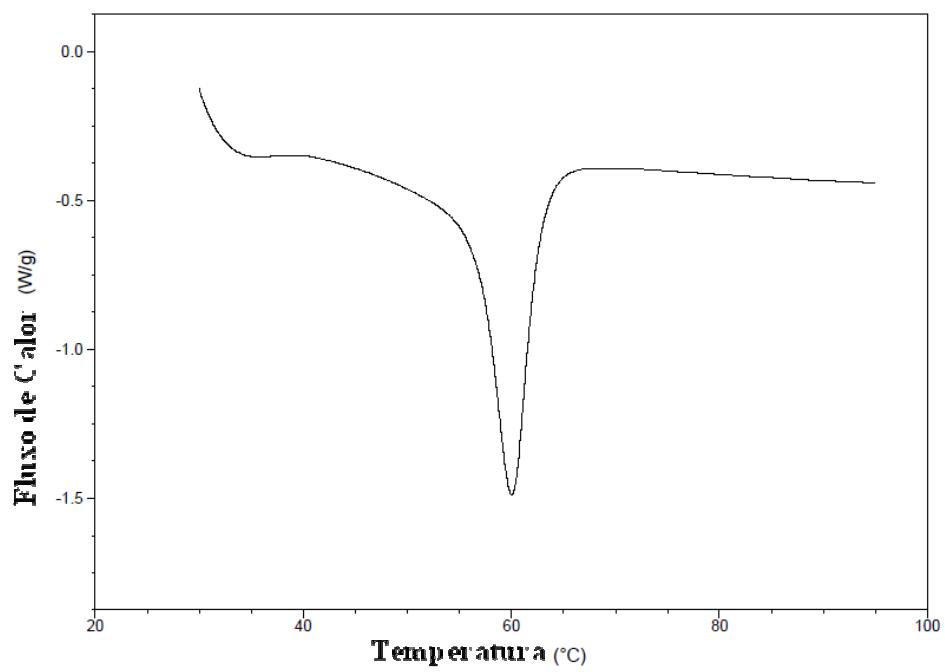


Figura 52. Termograma da amostra de PCL/Amido/PIS (F3)

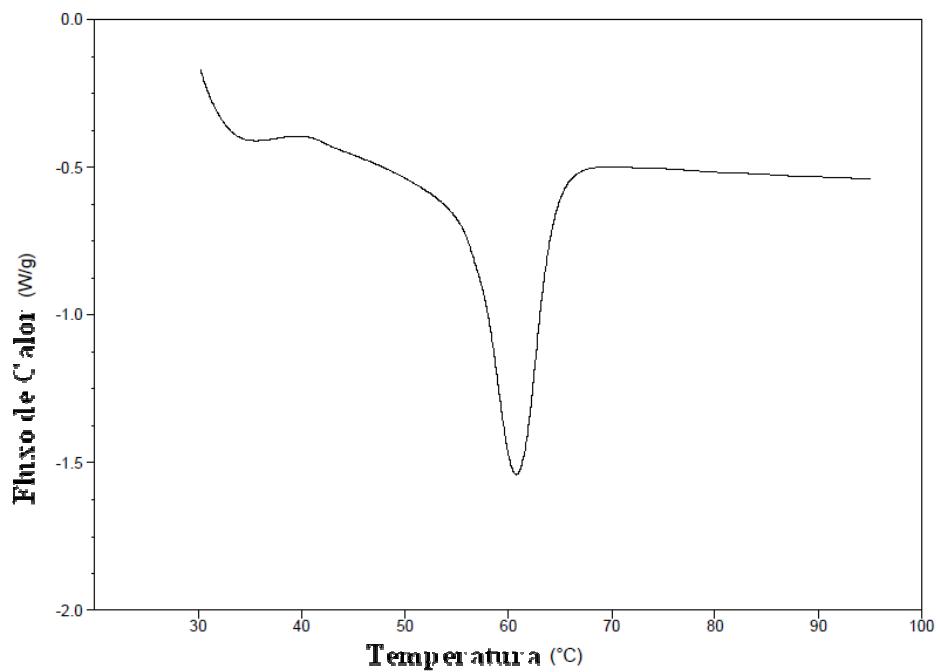


Figura 53. Termograma da amostra de PCL/Amido/PIS (F4)

ANEXO IV

PRODUÇÃO CIENTÍFICA (2005-2010):

Trabalhos publicados em periódicos:

MARIANI, P. D. S. C., ALLGANER, K., OLIVEIRA, F. B., CARDOSO, E. J. B. N., INNOCENTINI-MEI, L. H. **Effect of soy protein isolate on the thermal, mechanical and morphological properties of poly (e-caprolactone) and corn starch blends.** Polymer Testing, v.28, p.824–829, 2009.

CÉSAR, M. E. F., MARIANI, P. D. S. C., INNOCENTINI-MEI, L. H., CARDOSO, E. J. B. N. **Particle size and concentration of poly(e-caprolactone) and adipate modified starch blend on mineralization in soils with differing textures.** Polymer Testing, v.28, p.680–687, 2009.

MARIANI, P. D. S. C., VINAGRE NETO, A. P., SILVA JUNIOR, J. P., CARDOSO, E. J. B. N., ESPOSITO, E., MEI, L. H. I. **Mineralization of Poly(e-caprolactone)/Adipate Modified Starch Blend in Agricultural Soil.** Journal of Polymers and the Environment, v.15, p.19-24, 2007.

Livros publicados

MEI, L. H. I.; MARIANI, P. D. S. C. **VISÃO GERAL SOBRE POLÍMEROS OU PLÁSTICOS AMBIENTALMENTE DEGRADÁVEIS (PADs).** Campinas: Editora e Gráfica Flamboyant, 2005. v. 1. 41 p.

Trabalhos completos publicados em anais de congressos

MARIANI, P. D. S. C.; CARDOSO, E. J. B. N.; ESPOSITO, E.; MEI, L. H. I. **Study of surface and thermal properties of Polycaprolactone/Adipate Starch blend film during and after biodegradation in agricultural soil.** In: MACRO 2006-World Polymer Congress, 41 International Symposium on Macromolecules, 2006, Rio de Janeiro. MACRO 2006-World Polymer Congress, 41 International Symposium on Macromolecules. p. 71-71.

MARIANI, P. D. S. C.; WEBER, A.; CORDI, L.; DURAN, N.; ESPOSITO, E.; MEI, L. H. I. **Avaliação da biodegradação da blenda poli(e-caprolactona)/amido em meio líquido.** In: Sinaferm - XV Simpósio Nacional de Bioprocessos, 2005, Recife. Sinaferm - XV Simpósio Nacional de Bioprocessos, 2005.

Resumos expandidos publicados em anais de congressos

MARIANI, P. D. S. C.; Mariani, V. D. S. C.; CARDOSO, E. J. B. N.; MEI, L. H. I. . **Efeito da textura do solo na mineralização de polímeros biodegradáveis.** In: XI Encontro Nacional de Microbiologia Ambiental e X Simpósio Brasileiro de Microbiologia do Solo, 2008, Fortaleza. XI Encontro Nacional de Microbiologia Ambiental e X Simpósio Brasileiro de Microbiologia do Solo, 2008.

Resumos publicados em anais de congressos

MARIANI, P. D. S. C.; OLIVEIRA, F. B.; MAZZA, J. A.; CARDOSO, E. J. B. N.; MEI, L. H. I. **Biodegradação da blenda Poli (e-caprolactona)/amido modificado em diferentes tipos de solos e manejos.** In: V Workshop Internacional Brasil-Japão, 2007, Campinas. Caderno de Resumos do V Workshop Internacional Brasil-Japão: Biocombustível, meio ambiente e novos produtos da biomassa. Campinas : Unicamp, 2007. p. 10-10.

MARIANI, P. D. S. C.; Mescalotti, D. L. C.; CARDOSO, E. J. B. N.; MEI, L. H. I. **Estudo da biodegradação em solo da blenda composta por Poli (e-caprolactona) e amido adipatado.** In: III Congresso Brasileiro ICTR 2006 - Gestão Ambiental e Desenvolvimento Sustentável.

Resíduo: Desafio Brasileiro, 2006, São Pedro. Livro de Resumos - III Congresso Brasileiro ICTR 2006 - Gestão Ambiental e Desenvolvimento Sustentável. Resíduo: Desafio Brasileiro, 2006.