

UNIVERSIDADE DE TAUBATÉ
Gustavo Tadeu Alvarenga Marques de Souza

**BIODEGRADAÇÃO DE PLÁSTICOS E BIOPLÁSTICOS NO
SOLO SOB CONDIÇÕES CONTROLADAS E EM CAMPO**

Taubaté – SP

2016

UNIVERSIDADE DE TAUBATÉ
Gustavo Tadeu Alvarenga Marques de Souza

**BIODEGRADAÇÃO DE PLÁSTICOS E BIOPLÁSTICOS NO
SOLO SOB CONDIÇÕES CONTROLADAS E EM CAMPO**

Dissertação apresentada para
obtenção do Certificado de Título de
Mestre pelo Curso de Pós-Graduação.
Área de Concentração: Ciências
Ambientais
Orientador: Prof. Dr. Paulo Fortes Neto
Co-orientadora: Prof^a Dr^a. Elizabeth da
Costa Neves Fernandes de Almeida
Duarte

Taubaté – SP

2016

GUSTAVO TADEU ALVARENGA MARQUES DE SOUZA

**BIODEGRADAÇÃO DE PLÁSTICOS E BIOPLÁSTICOS NO
SOLO SOB CONDIÇÕES CONTROLADAS E EM CAMPO**

Dissertação apresentada para
obtenção do Certificado de Título de
Mestre pelo Curso de Pós-Graduação.
Área de Concentração: Ciências
Ambientais
Orientador: Prof. Dr. Paulo Fortes Neto
Co-orientadora: Prof^a Dr^a. Elizabeth da
Costa Neves Fernandes de Almeida
Duarte

Data: 16.02.2016

Resultado: APROVADO

BANCA EXAMINADORA:

Prof .Dr. Paulo Fortes Neto

Universidade de Taubaté

Assinatura_____

Prof. Dr^a Mariko Ueno

Universidade de Taubaté

Assinatura_____

Prof. Dr^a Isabela Cristina de Barros Trannin

Universidade Estadual Paulista
"Júlio de Mesquita Filho"

Assinatura_____

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Ivo Marques e Rosangela Marques que me proporcionaram o bem maior que é a educação, fazendo muitas vezes sacrifícios para atender e incentivar meus estudos, meu muito obrigado!

À minha esposa Aline que me deu apoio necessário para realizar mais uma etapa de minha vida e ao meu filho Felipe pela compreensão da distância e ausência.

Aos mantenedores da União Brasileira Educacional – Unibr e aos mantenedores da Universidade Cruzeiro do Sul pela concessão da bolsa de mestrado.

Ao meu orientador Professor Doutor Paulo Fortes Neto pela troca de experiências e orientações claras e objetivas por todos os conselhos e ajuda preciosa prestada ao longo deste mestrado.

Agradeço à Professora Doutora Elizabeth da Costa Neves Fernandes de Almeida Duarte da Universidade de Lisboa pela parceria com a Universidade de Taubaté, que mesmo distante deu sua parcela de contribuição para realização desse trabalho;

A Me Raquel Alexandra Cardoso da Costa da Universidade de Lisboa pela ajuda prestada durante a realização dos ensaios de campo e laboratório quando estive no Brasil;

Agradeço à empresa Silvex – Indústria de Plásticos e Papéis AS pelo bioplástico Mater-Bi™ fornecido durante a realização dos experimentos;

Agradeço à Fundação Agrisus – Agricultura Sustentável pelo apoio auxílio financeiro ao projeto.

A Me Eliana Maria Araujo Mariano do laboratório de Fitopatologia e Microbiologia Agrícola da Universidade de Taubaté pelo total desprendimento, disponibilidade, atenção e paciência em me ajudar nas análises de rotina laboratoriais em que precisei, sem medir esforços.

Ao Professor Doutor João Luiz Gadioli e a sua equipe do Laboratório de Solo pela análises e auxílio nas atividades relacionadas ao projeto.

A Professora Doutora Mariko Ueno do laboratório de Microbiologia pela ajuda no microcultivo de fungos filamentosos.

Ao aluno de graduação Ruy Costa do curso de Engenharia Ambiental da Universidade de Taubaté pelo apoio e ajuda durante a realização dos ensaios de campo e laboratório.

Agradeço a Universidade de Taubaté pelo material que me facultaram para a realização do ensaio.

A todos os meus familiares, por acreditar em meu potencial e por compreender minhas tantas ausências.

Por último, mas não menos importante, aos meus amigos, que direta ou indiretamente me ajudaram e incentivaram a completar este ciclo tão importante para mim.

Biodegradação de plásticos e bioplásticos no solo sob condições controladas e em campo

Resumo

O consumo de plásticos nos últimos anos encontra-se em grande crescimento, devido aos benefícios atribuídos a estes materiais. Na agricultura existe a necessidade de utilizar cobertura de filmes plásticos de polietileno no solo para manter a umidade e controlar as ervas daninhas, porém, a sua desvantagem está na destinação final. A reciclagem destes filmes plásticos no fim do ciclo de cultivo é uma operação trabalhosa e as opções de destino final adequado (aterro, reciclagem ou incineração) são dispendiosas, devido aos elevados custos da mão de obra e do consumo de água e energia. Por isso, na maioria das propriedades rurais, o plástico utilizado para cobertura do solo é queimado com os restos culturais e os fragmentos são misturados com o solo, liberando substâncias nocivas para o ambiente. Uma das alternativas para evitar este problema é a utilização da cobertura do solo com plástico biodegradável, pois após o uso ele pode ser incorporado e biodegradado pelos micro-organismos do solo. Este estudo teve como objetivo avaliar a biodegradabilidade dos plásticos e bioplásticos de amido e etanol da cana-de-açúcar no solo sob condições controladas e em campo, monitorando o balanço de carbono durante a biodegradação pelos micro-organismos. Foram utilizados como tratamentos os plásticos de polietileno, oxi-degradável e os bioplásticos de amido e etanol de cana-de-açúcar. A biodegradabilidade dos plásticos e bioplásticos no solo em condições de campo foi avaliada durante 12 meses por meio da variação de massa (%). A biodegradabilidade em condições controladas foi avaliada pela quantificação do dióxido de carbono (CO₂) liberado das amostras de solo incubadas com plásticos e bioplásticos. Para identificação dos fungos degradadores, amostras de fragmentos de plástico e bioplásticos coletados do solo foram dispostas em placas de Petri, contendo apenas ágar sem adição de nutrientes para a obtenção das colônias de fungos. Após serem isoladas as colônias foram identificadas quanto ao gênero com auxílio de microscopia óptica. Os resultados foram submetidos à análise de variância e as médias ao teste de Tukey a 5%. Os tratamentos apresentaram diferença significativa, sendo que o bioplástico de amido foi o que apresentou maior variação na perda de massa entre os tratamentos. Aos 30 dias 20% do bioplástico foi degradado e aos 180 dias a decomposição foi de 60%. Ainda no ensaio a campo verificou-se a presença de minhocas nos bioplásticos de amido e de etanol da cana-de-açúcar. No ensaio de laboratório os valores do carbono degradado do solo do bioplástico de amido diferiram estatisticamente do polietileno convencional e verde. O bioplástico de amido apresentou o valor mais elevado e diferiu significativamente dos demais tratamentos. Somente no fragmento de bioplástico de amido foi constatado o desenvolvimento de micélio de fungos dos gêneros *Mucor spp* e *Trichoderma spp*. Devido à rápida decomposição do bioplástico de amido em climas tropicais, recomenda-se o uso de películas que incluem agentes de nucleação na fusão de polímeros para melhorar as propriedades mecânicas do plástico.

Palavras-chave: Bioplástico na agricultura, respiração microbiana, microbiologia do solo

Plastics and bioplastics biodegradation in soil under controlled conditions and field

Abstract

The use of plastics in recent years is booming due to the benefits attributed to these materials. In agriculture there is a need to use plastic films of polyethylene cover soil to maintain moisture and to control weeds, but its disadvantage is the final destination. The recycling of plastic films at the end of the crop cycle is a laborious operation and the appropriate final disposal options (landfill, recycling or incineration) are expensive due to high labor cost labor and energy and water consumption. Therefore, most of the farms, the plastic used for ground cover is burned with cultural remains and fragments are mixed with the soil, releasing harmful substances into the environment. One of the alternatives to avoid this problem is the use of soil cover with biodegradable plastic because after use it can be incorporated and biodegraded by soil microorganisms. This study aimed to evaluate the biodegradability of plastics and starch bioplastics and ethanol from sugar cane in soil under controlled conditions and in the field, monitoring the carbon balance during biodegradation by micro-organisms. Treatments were used as polyethylene plastic, and oxy-degradable starch bioplastics and sugar cane ethanol. The biodegradability of plastics and bioplastics in soil under field conditions was tested over 12 months by mass variation (%). The biodegradability under controlled circumstances was evaluated by quantitation of carbon dioxide (CO₂) released from soil samples incubated with plastics and bioplastics. For identification of degrading fungi, samples fragments of plastic and bioplastics collected soil were placed in Petri dishes containing agar but without the addition of nutrients to obtain the fungal colonies. After being isolated colonies were identified as gender with optical microscopy aid. The results were submitted to analysis of variance and means to 5% Tukey test. The treatments showed significant difference, and the starch bioplastics showed the largest variation in mass loss between treatments. 30 days 20% of bioplastics has been degraded and 180 days the breakdown was 60%. Also in the field test verified the presence of worms in the starch and sugar cane ethanol biopolymers. In degraded carbon values the laboratory test of the starch bioplastics soil differed from the conventional and green polyethylene. The starch bioplastics presented the highest and differed significantly from other treatments. Only the starch bioplastics fragment was found fungal mycelium development of the genera *Mucor* sp and *Trichoderma* sp. Due to the rapid decomposition of the starch bioplastic in tropical climates, it is advisable to use films which include nucleating agents in polymer melt to improve the mechanical properties of the plastic.

Keywords: Bioplastics in agriculture, microbial respiration, soil microbiology

SUMÁRIO

Agradecimentos.....	iv
Resumo.....	vi
Abstract.....	vii
Lista de figuras.....	x
Lista de tabelas.....	xiii
Lista de abreviaturas.....	xiv
1. INTRODUÇÃO	15
2. OBJETIVO.....	18
2.1. Objetivo Geral	18
2.2. Objetivos específicos	18
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	19
3.1. Produção mundial de plástico	19
3.2. Tipos de bioplásticos.....	20
3.3. Desafios para a utilização de bioplásticos em larga escala	23
3.4. O plástico na agricultura	24
3.4.1. Bioplástico biodegradável como cobertura de solo (<i>mulching</i>)	27
3.4.2. Plásticos Oxi-degradáveis na cobertura de solo	29
3.4.3. Bioplástico e a demanda por terra agricultável	29
3.5. Características dos fungos degradadores.....	30
3.6. Respiração Aeróbia.....	31
4. MATERIAL E MÉTODOS	35
4.1. Experimento em condições de campo	35
4.1.1. Caracterização do Solo	36
4.1.2. Classificação e composição química do solo	36
4.2. Avaliação da biodegradabilidade dos polímeros no campo	36
4.2.1. Confeccção das bolsas de náilon	37

4.2.2. Retirada das bolsas no solo	38
4.2.3. Determinação da perda de massa	38
4.3. Variáveis avaliadas em condições naturais	38
4.3.1. Umidade do solo	40
4.4. Experimento em condições controladas	40
4.4.1. Avaliação da biodegradabilidade dos polímeros em condições controladas	40
4.4.2. Variações avaliadas	42
4.4.3. Estimativa da população de micro-organismos.....	43
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	48
5.1. Biodegradação dos plásticos e bioplásticos em campo	49
5.2. Biodegradação dos plásticos e bioplásticos em condições controladas	55
5.2.1. Liberação de CO ₂ no solo	55
5.3. Comunidade de micro-organismos do solo	56
5.4. Identificação de fungos degradadores	58
6. CONCLUSÃO	62
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	63

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Produção mundial de plástico de fonte fóssil (2012) em milhões de toneladas.....	19
Figura 2.	Croqui da área experimental referente às 12 parcelas em campo.....	35
Figura 3.	Preparo e nivelamento da área experimental (a), demarcação das parcelas (b)	36
Figura 4.	Corte da tela de náilon (a), seladora modelo 400 CP para confecção das bolsas (b) e Bolsa de náilon 20 x 15 cm contendo bioplástico de polietileno verde 10x15 cm (c).....	37
Figura 5.	Bolsas de náilon distribuídas com os respectivos plásticos e bioplásticos na camada de 20 cm de profundidade do solo.....	38
Figura 6.	Sonda para determinação da umidade do solo (a), Amostras de solo (b) e Balança Marte AD 3300g (c).....	39
Figura 7.	Fragmentos dos plásticos, bioplásticos e celulose para misturar ao solo.....	41
Figura 8.	Frascos de vidro contendo solo misturado com plástico e bioplástico e um copo descartável contendo solução de NaOH 0,5 mol L ⁻¹	41
Figura 9.	Conduvímetero para determinação da liberação do dióxido de carbono C C _{C-CO2} (mg) do solo (a), titulação volumétrica com HCl (0,5mol _c L ⁻¹), para quantificação da massa liberada de CO ₂ por amostra de solo (mg g ⁻¹) (b).....	42
Figura 10.	Bolsa de náilon contendo fragmento de bioplástico de amido.....	44

Figura 11.	Isolamento de fungos a partir de fragmentos de bioplástico de amido em meio contendo apenas agar sem fonte de carbono (a), desenvolvimento de micélio após 7 dias (b).....	44
Figura 12.	Crescimento de isolados de fungos em meio de cultura contendo agar-batata-dextrose (DBA) para a identificação.....	45
Figura 13.	Discos de ágar da extremidade de uma colônia, (a) discos de ágar contendo micélio de fungos preservados em água destilada (b).....	45
Figura 14.	Microcultivo de fungos filamentosos isolados de fragmentos de bioplástico de amido.....	46
Figura 15.	Temperatura do ar (°C) máxima, média e mínima durante o período experimental. Departamento de Ciências Agrárias (UNITAU), Taubaté, SP, 2014/2015.....	48
Figura 16.	Precipitação pluviométrica durante o período experimental. Departamento de Ciências Agrárias (UNITAU), Taubaté, SP, 2014/2015.....	49
Figura 17.	Umidade do solo (%) registrada durante o período experimental (julho de 2014 a julho de 2015).....	49
Figura 18.	Relação entre a umidade do solo (%) e Precipitação (mm) registrados durante o período experimental.....	50
Figura 19.	Perda de massa em porcentagem do bioplástico de polietileno verde (a), plástico de polietileno convencional (b), bioplástico de amido (c) e plástico oxidegradável durante o período experimental.....	51
Figura 20.	Decomposição do bioplástico de amido (%) e Precipitação (mm) registradas durante o período experimental.....	51
Figura 21.	Decomposição do bioplástico de amido (%) e Umidade do Solo (%) durante o período experimental.....	52

Figura 22.	Decomposição do bioplástico de amido no período de 30 a 180 dias de incubação no solo.....	53
Figura 23.	Presença de minhocas nas bolsas de nylon contendo bioplástico de amido (a) e bioplástico da cana-de-açúcar.....	53
Figura 24.	Fragmento de plásticos de polietileno (a) e fragmento de bioplástico de amido (b) incorporado no solo.....	54
Figura 25.	Placas de Petri contendo meio de cultivo BPA mostrando o crescimento de colônias de fungos na diluição seriada da amostra de solo oriunda da coleta de campo.....	57
Figura 26.	Unidades formadoras de colônias presentes no isolamento do solo sob as bolsas de náilon, aos 7 dias de ensaio.....	57
Figura 27.	Aspectos morfológicos de <i>Mucor sp.</i> Verso algodonoso da colônia (a), reverso da colônia apigmentado (b), hifas filamentosas com corpo de frutificação com aumento de 10x (c), germinação e desenvolvimento de esporo com aumento de 40x (d), esporangióforos fechados com aumento de 40x (e) e esporangióforos abertos com esporos liberados, com aumento de 40x (f).....	59
Figura 28.	A seta indica ausência de rizóide na base dos esporangióforos de <i>Mucor sp</i> com aumento de 40x em microscopia ótica.....	60
Figura 29.	Aspectos morfológicos de <i>Trichodema sp.</i> Verso da colônia com pigmentação (a), Reverso da colônia apigmentado (b), aglomerado de hifas filamentosas (d), conidióforos com fiálides em grupo (e), conídios esféricos (f).....	60
Figura 30.	Fungo não identificado isolado de fragmentos de bioplástico de amido.....	61

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Valores médios de carbono liberado na forma de CO ₂ (mg 100g ⁻¹ solo) nos tratamentos.....	55
Tabela 2. Tipos de micro-organismos presentes após 15 dias para cada uma das repetições de Bioplástico biodegradável de amido, retiradas das bolsas de naylon de biodegradação real em 60 dias.....	58

LISTA DE ABREVIATURAS

(COBAPLA)	Comitê Brasileiro de Desenvolvimento e Aplicação de Plásticos na Agricultura
(CPTEC-INPE)	Centro de Previsão de Tempo e Estudos Climáticos - Instituto Nacional de Pesquisa Espaciais
(AGRISUS)	Fundação AGRISUS - Agricultura Sustentável
(EN)	Norma Europeia
(ASTM)	Normas Técnicas Americana
(ABIPLAST)	Associação Brasileira da Indústria do Plástico
(IPEA)	Instituto de Pesquisa Econômica Aplicada
(PLA)	Polímeros de ácido láctico
(PHA)	Polihidroxialcanoatos
(PHB)	Polihidroxibutirato
(PBAT)	Polibutileno adipato tereftalato
(CO ₂)	Dióxido de carbono
(OH ⁻)	Íons de hidróxido
(C-CO ₂)	Carbono liberado pela biomassa microbiana na forma de CO ₂
(ACV)	Avaliação do ciclo de vida
(GMO free)	Livre de organismos geneticamente modificados
(UFC)	Unidades formadoras de colônias
(DBA)	Ágar batata dextrose
(MO)	Matéria orgânica
(BPS)	Bioplástico polietileno verde
(BPA)	Bioplástico de amido
(OXI)	Plástico oxi-degradável
(PE)	Polietileno
(PE verde)	Polietileno verde
(PVC verde)	Policloreto de vinila verde

1. INTRODUÇÃO

O uso dos plásticos modernos, à base de hidrocarbonetos do petróleo, teve início no século passado, com o desenvolvimento do processo de polimerização. Tal processo consiste em unir, a partir de diversas reações químicas, várias moléculas menores em uma grande, que não se quebra facilmente e dá ao material maior flexibilidade e durabilidade. Desde então, centenas de plásticos, ou polímeros, foram criados pelas empresas petroquímicas para as mais diferentes utilidades.

Os polímeros plásticos representam uma verdadeira revolução na maneira como a sociedade contemporânea vem vivendo nos últimos anos. Devido às inúmeras utilidades desse material, como o baixo custo e a sua resistência ao ataque químico e biológico aumentando a sua durabilidade tornou-se um símbolo da modernidade.

A partir de 1950 a indústria dos plásticos se expandiu fortemente, quando os Estados Unidos da América e a Alemanha iniciaram um grande avanço tecnológico, juntamente com a descoberta de novos produtos petroquímicos. Mais tarde outros países desenvolvimentos, também investiram nesse seguimento, o que acarretou na difusão do plástico no mercado mundial.

O plástico pode ser utilizado em diversos setores, como utensílios domésticos, peças automotivas, partes de equipamentos eletrônicos e na produção de filmes plásticos utilizados na agricultura.

A descoberta e o desenvolvimento do polietileno (PE) nos finais dos anos 30, e sua subsequente introdução no início da década de 1950 na agricultura sob a forma de filmes de plástico na cobertura do solo e estufas agrícolas; tubos para mudas e fita de irrigação, revolucionou a produção comercial de muitas culturas hortícolas. Isto permitiu antecipar e aumentar produções, obter produtos limpos e de elevada qualidade, usar de forma mais eficiente os recursos hídricos, reduzir a lixiviação de nutrientes, reduzir a erosão do solo, melhorar o controle de pragas e doenças, reduzir problemas com plantas invasoras e a compactação do solo.

No entanto, muitos resíduos plásticos que poderiam ser reciclados no Brasil ainda continuam sendo destinados a aterros e lixões. Nos quais, o plástico

representa 13,5%, e é o principal produto reciclável que é enterrado ao invés de ter a destinação correta (ABIPLAST, 2013).

O Relatório do Instituto de Pesquisa Econômica Aplicada (IPEA, 2010) divulgou que em 2010 o Brasil perdeu R\$ 8 bilhões por deixar de reciclar os resíduos recicláveis encaminhados para aterros e lixões.

Devido ao aumento no consumo de plásticos de polietileno na agricultura despertou preocupações com o destino final dos resíduos gerados, pois na maioria das propriedades rurais o plástico utilizado para cobertura do solo é queimado juntamente com os restos culturais ou é fragmentado e misturado indevidamente com o solo (Moreno e Moreno, 2008).

A poluição ambiental causada pelos plásticos produzidos a partir do petróleo tem levado a comunidade científica a procurar estratégias para minimizar os problemas ambientais, entre elas a utilização de bioplásticos biodegradáveis o que pode evitar problemas quanto ao destino final do plástico tendo como vantagem a possibilidade de ser incorporado e degradado pelos micro-organismos do solo.

Entretanto, o estudo e a utilização de matérias-primas a partir de fontes renováveis vêm crescendo de forma muito significativa nos últimos anos. A busca por alternativas dos plásticos derivados do petróleo por plástico biodegradáveis tornou-se um tema relevante, devido à baixa degradabilidade do plástico convencional no meio ambiente.

Os bioplásticos biodegradáveis decompõem-se naturalmente pela ação dos micro-organismos do solo, que na presença de oxigênio decompõem o carbono do bioplástico em dióxido de carbono, sais minerais e biomassa microbiana. Os pedaços de bioplástico, que permanecem no solo sofrem um processo de biodegradação completa, não deixando resíduos e, portanto, não persistem no solo, não causando impacto ambiental (BRIASSOULIS, 2007).

Desta forma, a cobertura do solo com bioplástico biodegradável poderá ser uma alternativa para solucionar o problema de destino final do plástico de polietileno utilizados na cobertura de solo, pois estudos realizados pelo Projeto Europeu FP7 *“Development of enhanced biodegradable films for agricultural activities”* –

Agrobiofilm (2010), constataram que o bioplástico apresentou a mesma produtividade e qualidade obtida com o plástico de polietileno e ainda teve como vantagem a possibilidade de ser incorporado e degradado pelos micro-organismos do solo.

O bioplástico tem como matéria prima o amido vegetal, podendo ser uma alternativa na substituição do plástico convencional (de origem petroquímica). Esse tema vem ganhando força e recebendo consideráveis atenções no cenário dos recursos renováveis. Esse bioplástico de amido pode ser utilizado como saco de lixo, filmes para embalar alimentos e principalmente na agricultura como filme na cobertura do solo e recipiente para plantas.

Outra alternativa importante é o desenvolvimento de bioplástico que utilizem como substrato recursos renováveis, como o etanol extraído da cana-de-açúcar, que por meio da tecnologia de desidratação, o etanol é transformado em eteno sendo um composto muito usado na produção de plásticos convencional ou a utilização do bagaço da cana-de-açúcar como alternativa, o que contribui para redução do aquecimento global por meio da absorção de CO₂. No entanto, o uso do bioplástico produzido a partir do etanol da cana-de-açúcar não é biodegradável (BRASKEM, 2014).

No Brasil são escassos os artigos científicos realizados com bioplástico biodegradável como cobertura de solo (*mulching*) em solos de regiões tropicais, que possuem características bem diferentes dos solos de regiões de clima temperado. Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi estudar a biodegradabilidade dos plásticos e bioplásticos em solo sob condições controladas e em campo pela presença de micro-organismos degradadores.

2. OBJETIVO

2.1. Objetivo Geral

Avaliar a biodegradabilidade dos plásticos e bioplásticos no solo sob condições controladas e em campo.

2.2. Objetivos específicos

Avaliar a biodegradabilidade dos de plásticos e bioplásticos no solo sob condições controladas monitorando o balanço de carbono durante a biodegradação pelos micro-organismos.

Estimar a variação de massa dos plásticos e bioplásticos no solo em condições naturais durante 12 meses por meio das condições climáticas.

Identificar fungos degradadores isolados a partir de amostras de fragmentos de plásticos e bioplásticos no solo.

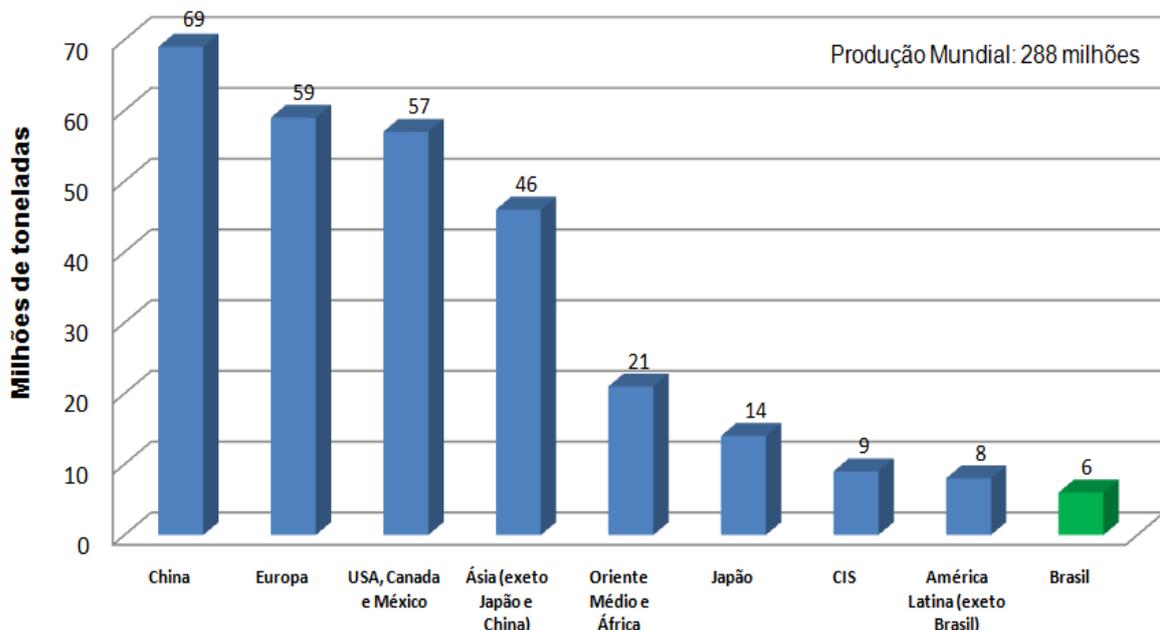
Determinar o número de micro-organismos presentes em amostras de plásticos e bioplásticos no solo por meio da contagem em placas.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Produção mundial de plástico

Em 2012 a produção mundial de plástico passou de 280 para 288 milhões de toneladas e, segundo a Associação Brasileira da Indústria do Plástico, a China foi o país que mais produziu representando cerca 23,9 % do total, seguido da União Européia com produção de 59 milhões de toneladas de plástico representando 20% do total da produção mundial (ABIPLAST, 2013).

O Brasil está ganhando espaço na produção de plástico em termos mundiais, porém a participação ainda é pequena em relação à dimensão do país, contribuindo com 6 milhões de toneladas de plástico o equivalente a 2,0% do volume produzido mundialmente, visto que a tendência é que este valor continue a aumentar. A capacidade de produção mundial de plástico derivado de hidrocarbonetos de petróleo está representada na (Figura 1).



Fonte adaptada: Plastic Europe (2013)

Figura 1. Produção mundial de plástico de fonte fóssil (2012) em milhões de toneladas

Segundo Associação Brasileira da Indústria do Plástico (2013) o consumo per capita de plástico no país em 2013 foi de 33,9 Kg hab⁻¹, enquanto a média mundial é de 40 Kg hab⁻¹.

Capacidade de produção de bioplásticos

O aumento do consumo dos bioplásticos é uma realidade motivada pela preocupação com o meio ambiente, a produção mundial de bioplásticos em 2013 foi da ordem de 1,62 milhões de toneladas, representando uma pequena parcela na produção mundial se comparados com os 288 milhões de toneladas de plástico convencional produzidos em 2012. Com o mercado em ascensão, segundo a European Bioplastics (2014), estima-se que a capacidade de produção mundial de bioplásticos venha a atingir aproximadamente 6,7 milhões de toneladas em 2018. No entanto, com o aumento da disponibilidade e um número rapidamente crescente de produtos em diversos segmentos de mercado, os bioplásticos se tornará uma parte significativa do mercado de plásticos, ao longo prazo.

De acordo Shen (2009), com o estudo sobre a projeção dos bioplásticos, realizado pela Universidade de Utrecht na Holanda, os bioplásticos poderia tecnicamente substituir na ordem de 85 % dos plásticos convencionais.

3.2. Tipos de bioplásticos

O bioplástico pode ser dividido em três grupos principais, plásticos produzidos utilizando matérias primas de fontes renováveis derivado de biomassa, tais como milho, batata, cana-de-açúcar, madeira, entre outras, o que possibilita a extração do açúcar e do amido, uma vez que estes são necessários para transformação destes componentes em bioplásticos, as quais podem ser convertidas em produtos biodegradáveis ou não biodegradáveis, bem como, os plásticos produzidos a partir de matérias primas de fontes fósseis, os quais podem ser convertidos em produtos biodegradáveis (European Bioplastics, 2015).

Bioplásticos não biodegradáveis de fonte renovável

Segundo a Braskem (2013), o bioplástico é produzido a partir do etanol da cana-de-açúcar conhecido como polietileno verde (PE verde) e o policloreto de vinila verde (PVC verde). O processo inicia-se com obtenção do álcool hidratado a partir

de uma fonte de matéria-prima renovável (cana-de-açúcar) e termina com desidratação do mesmo e conversão em polietileno verde ou policloreto de vinila verde ao passo que o polietileno e policloreto de vinila tradicionais utilizam matérias-primas de fonte fóssil, como petróleo ou gás natural. Por esta razão, o polietileno verde e o policloreto de vinila verde capturam e fixam gás carbônico da atmosfera durante a sua produção, colaborando para a redução da emissão dos gases causadores do efeito estufa. De acordo com Scott (2000), para diferenciar o plástico obtido a partir de matéria-prima de fonte renovável do obtido de fonte fósseis, o adjetivo verde foi acrescentado ao nome do plástico. Entretanto, pelo fato de serem provenientes de fontes renováveis, nem o PE verde nem o PVC verde são considerados biodegradáveis, sendo necessária a reciclagem. No entanto, o grande desafio concentra-se no pós-consumo.

Esta tecnologia foi desenvolvida no Centro de Tecnologia e Inovação da Braskem, empresa brasileira que atua no setor petroquímico. O produto foi certificado pelo laboratório Beta Analytic de acordo com ASTM D6866, que determinou que o carbono contido na amostra contém 100% de matéria-prima renovável, garantindo a mesma versatilidade em suas aplicações, porém de forma sustentável, sem nenhum carbono de fonte fóssil.

Bioplástico biodegradável de fonte renovável

Desde o início dos anos 60 que se estudam novas coberturas de solo como possível alternativa ao polietileno (Lamont, 1993). Os primeiros plásticos biodegradáveis surgiram como polímeros baseados em amido (Otey e Westoff, 1980). No entanto, os plásticos biodegradáveis assim obtidos tiveram, até à década de 90, problemas de estabilidade química (Chu e Matthews, 1984).

Na década de 90, com a problemática do constante aumento do consumo de energia para produção e transporte de alimentos, o progressivo aumento das emissões de CO₂ para a atmosfera e o crescente acúmulo de resíduos plásticos no meio ambiente fizeram a sociedade despertar para a necessidade de uma produção baseada em matéria-prima biodegradável (Martín-Closas e Pelacho, 2011).

A organização europeia defendeu que a alternativa aos materiais não degradáveis seria um polímero que tivesse na sua produção materiais

biodegradáveis e de origem renovável (The Plastics Portal, 2012). Alguns destes materiais foram a celulose (proveniente da madeira), óleos vegetais, açúcar e amido. Estes materiais deram origem a polímeros mais tarde denominados de plásticos “*bio-based*” ou mais genericamente “*biopolímeros*” ou “*bioplásticos*”. Estes dois últimos termos geraram alguma confusão porque foram usados, muitas vezes, sem critério para descrever o material usado na produção destes polímeros quanto à fonte do material (renovável ou não) ou a sua funcionalidade (biodegradável e/ou possibilidade de ser compostado). Muitos destes materiais apresentaram uma elevada degradabilidade quer por ação da radiação solar quer pela ação de micro-organismos, pois quando incorporados ao solo se degradaram completamente em menos de um ano.

Dos diversos estudos realizados na área, surgiram biopolímeros como os derivados de amido termoplástico, Mater-Bi®, PLA (polilactato), PBAT (polibutileno adipado tereftalado) da marca Ecoflex® e PHA (polihidroxialcanoato) da Biopol® (Bastioli, 1998; Martín-Closas e Pelacho, 2011). Estes biopolímeros são formados na natureza, sendo que na sua síntese estão geralmente enzimas catalíticas e reações de polimerase que, em geral, se formam dentro das células por processos metabólicos complexos (Chandra e Rustgi, 1998).

Ao serem usados são degradados rapidamente no solo, devido à ação dos micro-organismos como bactérias e fungos, tendo como resultado a liberação de dióxido de carbono, metano, água e biomassa (Bastioli, 1998, Schettini et al., 2007). O Mater-Bi® é um biopolímero derivado de amido que possui uma estrutura natural formada por cadeias lineares de amilose e cadeias ramificadas de amilopectinas. A produção deste material, implica numa ruptura da estrutura original da molécula de amido e sua posterior reordenação em complexos de estruturas entre amiloses e moléculas naturais, que aumentam a resistência à água e originam mudanças na estrutura mecânica do amido (Cordeiro, 2011).

Dentre os vários tipos disponíveis de plásticos biodegradáveis do consórcio AGROBIOFILM têm-se o produto CF04P, com nova formulação à base de Mater-Bi® que tem a mesma matriz de amido de outros produtos já existentes como NF01U e NF803P, mas difere quanto à composição química e conteúdo em materiais renováveis. Enquanto a gama NF tem cerca de 50% de poliésteres biodegradáveis,

a gama CF tem mais de 50% de polímeros biodegradáveis, uma vez que as suas fontes renováveis são à base de óleos vegetais. Quimicamente, a matéria-prima do CF04P é um copoliéster alifático/aromático com amido de milho (AGROBIOFILM, 2010). A biodegradabilidade do Mater-Bi® está de acordo com a norma europeia da compostagem (EN 13432) (Kyrikou e Briassoulis, 2007).

Plástico biodegradável de fonte não renovável

Os plásticos biodegradáveis não são necessariamente produzidos a partir de recursos renováveis, também pode derivar do petróleo. Segundo a empresa química Alemã BASF (2014), o polibutileno adipato tereftalato (PBAT) é um bioplástico sintético biodegradável obtido a partir de fontes fósseis e por extrusão resulta em plásticos semelhantes às de polietileno obtido por síntese a partir de derivados do petróleo. Sendo considerado um bioplástico biodegradável que apresenta propriedades mecânicas similares aos filmes de polietileno.

Hoje em dia, os termos "biodegradação", "materiais biodegradáveis", "compostagem" são muito comuns, mas frequentemente mal utilizados ou mal-entendido. A norma europeia EN 13432 e outras normas como a ASTM D6400 resolveram este problema ao definir as características de um material biodegradável ou não. Estas normas são utilizadas como referência para os produtores, as autoridades públicas, os gestores de compostagem de plantas, e os consumidores.

De acordo com a EN 13432, um material compostável deve apresentar a biodegradabilidade, ou seja, a capacidade de ser convertido em CO₂, sob a ação de micro-organismos.

3.3. Desafios para a utilização de bioplásticos em larga escala

Os bioplásticos biodegradáveis só apresentam biodegradação em condições adequadas de luz, umidade, temperatura e da população adequada de micro-organismos, sendo necessário um local de compostagem adequado. Essa não é a realidade no Brasil, pois a maior parte dos resíduos sólidos plásticos acaba sendo enviada para lixões e aterros sanitários. Nesses locais, não há garantias de que o material plástico sofra biodegradação em sua totalidade. Além disso, as condições oferecidas por lixões e aterros propiciam uma biodegradação anaeróbica, fazendo

com que haja liberação do gás metano em vez do CO₂ gerado durante a biodegradação aeróbica.

Outra questão relevante a ser considerada, é o uso de matéria-prima comestível e os efeitos disso sobre um cenário de potencial escassez global de alimentos. A produção em larga escala implicaria em maior área de plantio, maior consumo de água, fertilizantes e outros insumos.

Khoo et al. (2010), avaliaram o ciclo de vida (ACV) das sacolas feitas de polihidroxialcanoato (PHA), um bioplástico à base de amido de milho em relação às tradicionais sacolas de polietileno para verificar se elas eram menos impactantes ao meio ambiente. De acordo com Khoo et al. (2010) a energia consumida na produção do bioplástico é 60% maior do que a energia gasta na fabricação do plástico. Segundo estes pesquisadores a produção dos bioplásticos só pode ser considerada como alternativa ecológica aos plásticos convencionais se ao longo de toda a produção forem utilizadas energias renováveis.

3.4. Utilização de filmes plásticos na cobertura do solo

O plástico mais utilizado como cobertura de solo na agricultura é o polietileno de baixa densidade, devido ao seu baixo custo, fácil manuseio, boas propriedades mecânicas e particularmente a elasticidade (Graci et al., 2008). O polietileno é uma resina termoplástica obtida a partir do etileno polimerizado a altas pressões. É um material flexível, impermeável e inalterável à água, não apodrece e nem é atacado por micro-organismos (Valenzuela e Gutiérrez, 1999).

Com o advento da produção do polietileno (PE) em 1933 e do cloreto de polivinila (PVC) em 1941 iniciaram-se as pesquisas para utilização destes filmes plásticos na cobertura do solo (Spice, 1959, Garnaud, 1974, Nesmith et al., 1992).

A utilização e comercialização de plásticos para cobertura de solo teve início no Japão em 1951 com o uso do filme plástico de PVC e na Europa a introdução ocorreu na década de 60 (Liakatas et al., 1986, Sganzerla, 1991). No Brasil, esta técnica só ganhou repercussão no início dos anos 70 com a utilização de polietileno na cultura do morango em São Paulo (Goto, 1997).

Alguns estudos mostram que o consumo mundial de plásticos na agricultura atinge 6,5 milhões de toneladas por ano, sendo que 10 % são utilizados como plástico para cobertura do solo o que daria para recobrir uma área de cerca de 4,5 milhões de hectares (Jouët, 2001; Billingham et al., 2003; Scarascia-Mugnozza et al., 2011).

Na Europa, a quantidade total de plástico utilizado na agricultura é de 0,7 milhões de toneladas, sendo o plástico para cobertura do solo o mais utilizado no sul da Europa, o plástico para cobertura de estufas mais utilizado no centro e sul da Europa e o plástico utilizado para silagem, nos países nórdicos, em função deste uso, estimasse que todos os anos são geradas 615.000 toneladas de resíduos de plástico agrícola.

Entretanto desde a sua introdução o uso destes plásticos vem se intensificando devido às vantagens que trazem à produção agrícola. Atualmente na União Europeia são utilizados todos os anos cerca de 92.202 toneladas de filmes plásticos na cobertura de solo, este valor corresponde apenas a 3,5 % do total mundial de 2.630.811 toneladas (Saraiva et al., 2012).

Cento e quarenta e três mil toneladas de plástico utilizado como cobertura do solo agrícola nos EUA foram depositados em aterros sanitários ou queimados no local de uso (Shogren e Hochmuth, 2004). O plástico de polietileno é o mais utilizado na agricultura nos EUA e em todo o mundo para controlar plantas daninhas, conservar a umidade do solo, elevar a temperatura do solo, aumentar a produtividade e a qualidade das culturas e devido ao custo relativamente baixo (Miles et al., 2012, Corbin et al., 2013).

Já no Brasil estudos realizados pelo Comitê Brasileiro de Desenvolvimento e Aplicação de Plásticos na Agricultura (Cobapla, 2012) constatou que em 2012 foram consumidos cerca de 2.500 toneladas de filmes plásticos de polietileno para cobertura do solo (*mulching*) no cultivo de flores, frutas e hortaliças. Os filmes plásticos de polietileno foram aplicados como cobertura do solo em cerca de treze mil hectares, procedimento que apresenta uma tendência de crescimento em torno de 13% ao ano.

A cobertura de polietileno é feita de matéria-prima à base de petróleo, uma fonte não renovável, e o tempo de vida operacional geralmente se estende por apenas um cultivo antes da retirada do solo. A reciclagem de plásticos agrícolas não ocorre na maioria dos casos, e é geralmente limitada pela contaminação do plástico após o uso no campo, a falta de equipamentos especializados, e a longa distância para a reciclagem (Garthe e Kowal, 1993).

As desvantagens do uso de filmes plásticos como cobertura de solo está relacionado a sua origem, pois a matéria-prima utilizada na sua produção é proveniente de fonte não renovável e também ao seu destino final, pois após o uso os agricultores têm dificuldades em dar um destino adequado ao plástico remanescente (Moreno e Moreno, 2008). Isto ocorre porque existe um desajuste entre o curto período de tempo durante o qual as culturas necessitam do plástico e a enorme longevidade que o polietileno tem no ecossistema (Martin-Closas et al., 2008). Pois o polietileno é um material que não se degrada naturalmente, tornando necessária a sua remoção após a finalização do ciclo cultural e posterior encaminhamento dos resíduos removidos para uma estação de reciclagem ou para aterro sanitário, acarretando custos consideráveis ao processo de produção, refletindo-se no preço final dos produtos (Bonhomme et al., 2003).

O processo de remoção do plástico é um trabalho difícil e que por mais bem executado que seja acaba sempre por deixar resíduos espalhados no campo, visto que à medida que o plástico vai sendo removido parte do material acaba sempre por rasgar e dar origem à formação de fragmentos com várias dimensões (Carvalho et al., 2012).

A acumulação deste tipo de resíduos no solo ao longo de várias décadas de utilização pode dar origem a contaminações irreversíveis no solo, ameaçando a segurança dos produtos alimentares produzidos nesses terrenos (Briassoulis, 2006).

Neste sentido a utilização da cobertura do solo com plástico biodegradável poderá ser uma alternativa para solucionar o problema de destinação final do plástico de polietileno. Estudos realizados pelo Projeto Europeu FP7 "*Development of enhanced biodegradable films for agricultural activities*" – Agrobiofilm (2010) constataram que a utilização do plástico biodegradável resultou na mesma

produtividade e qualidade obtida com o plástico de polietileno como a vantagem de ser incorporado e degradado pelos micro-organismos do solo.

3.4.1. Bioplástico biodegradável como cobertura de solo (*mulching*)

As primeiras tentativas de produzir um plástico para cobertura de solo biodegradável datam de 1972 e ele era revestimento com papel e os testes foram efetuados na cultura do melão. Mais tarde, a fim de se obter um filme para cobertura de solo parcialmente biodegradável, o polietileno foi misturado com amido. Depois um filme para cobertura de solo foi desenvolvido a partir da mistura de nutrientes para as plantas com um polímero solúvel em água, contendo álcool polivinílico, uréia e amido (Plastigone® e Biolan®), e foi, provavelmente, o 1º plástico de cobertura biodegradável, apesar dos filmes de celulose (Ecopac®) estarem entre os materiais de cobertura do solo, porém ainda não tinham sido testados em condições de campo (Martín-Closas e Pelacho, 2011).

No início dos anos 90, estudos com termoplásticos derivados de hidratos de carbono apresentaram novas oportunidades em termos de materiais biodegradáveis para utilizar na cobertura de solo. Novos materiais biodegradáveis à base de amido termoplástico foram obtidos e comercializados sob a marca Mater-Bi® e foram também sugeridos algumas gamas para a fabricação dos biofilmes (Bastioli, 1998).

Os estudos referentes ao uso agrícola do bioplástico como cobertura de solo têm sido realizado na Europa desde o final dos anos 90 e tem como objetivo verificar a biodegradabilidade no solo e avaliar a eficiência do bioplástico sobre a umidade, temperatura e lixiviação de nutrientes no solo, o controle de doenças, pragas e plantas invasoras, a precocidade das colheitas, a produtividade e composição química das plantas (Olsen e Gounder, 2001; Moreno e Moreno, 2002; Quezanda et al., 2003; Wang et al., 2004; Ngouajio et al., 2008; Minuto et al., 2008; Kasirajan e Ngouajio, 2012).

Esta característica de se degradar no ambiente, proporciona ao bioplástico uma vantagem em relação ao plástico, pois não é necessária a sua remoção do campo e podem (dependendo do material constituinte) ser incorporado no solo e fornecer nutrientes para as plantas. O material em si tem um custo elevado, mas tem

a vantagem de eliminar as etapas de remoção e tratamento de resíduo e ainda mantêm a fertilidade do solo (Berlung, 2006).

A maioria das coberturas de plástico biodegradáveis que estão atualmente disponíveis no mercado são produzidos a partir de amido vegetal. Filmes agrícolas constituídos por amido são preparados utilizando técnicas convencionais e tecnologia de processamento de plásticos. No entanto, devido às fracas propriedades mecânicas do amido, incluindo a sua fragilidade, deve ser misturado com outros polímeros ou plastificantes.

De acordo com Hayes et al. (2012) entre os produtos disponíveis no mercado podem ser citados: Biosafe™ (Xinfu Pharmaceutical Co., China), Eastar Bio™ (Novamont, Itália), Eco-Flex (BASF, Alemanha), Ingeo® (NatureWorks, EUA) Mater-Bi® (Novamont, Itália) e Paragon (Avebe, Holanda) (Hayes et al., 2012). Dois polímeros que podem ser utilizados em coberturas de plástico biodegradável, no futuro, são o ácido poliláctico (PLA) e de poli-hidroxialcanoato (PHA).

Mater-Bi™ é uma marca italiana registrada, resultante da mistura de fibras sintéticas com amido (BASTOLI, 1998). Este material é obtido por meio da ruptura da estrutura do amido e da sua reordenação, com formação de complexos entre amilose e moléculas naturais. Estes complexos formam uma estrutura que aumenta a resistência à água e que provoca alterações nas características da molécula original do amido (Graci et al., 2008). A biodegradação de produtos com origem em Mater-Bi™ foi certificada por várias organizações, de acordo com as normas standard internacionais (EN 13432, DIN 54900, UNI 10785). A não-toxicidade e a compostabilidade foram também certificadas por testes de ecotoxicidade em plantas e animais. O amido de milho utilizado na fabricação da matéria-prima Mater-Bi™ não sofre qualquer tipo de alteração na composição do DNA, não sendo utilizado em todo o processo de fabricação qualquer organismo geneticamente modificado. O plástico biodegradável utilizado neste trabalho é certificado como GMO free (AGROBIOFILM, 2014).

A biodegradação do bioplástico ocorre porque o amido presente na sua composição química é utilizado como fonte de energia e carbono pelos microrganismos do solo. O processo de decomposição ocorre por meio das

seguintes etapas: (1) quebra dos compostos de carbono em pequenas moléculas devido a secreção de enzimas e/ou pela ação do meio ambiente (temperatura, umidade e luz solar); (2) absorção e transporte de pequenas moléculas para dentro das células dos micro-organismos; e (3) a oxidação das pequenas moléculas no interior das células microbianas em CO₂, água e calor (ASTM 2004; Kyrikou e Briassoulis, 2007; Sivan, 2011; Kasirajan e Ngouajio, 2012).

3.4.2. Plásticos Oxi-degradáveis na cobertura de solo

Os plásticos oxi-degradáveis têm como base a adição de aditivos pró-oxidantes ao polietileno que possibilita uma decomposição mais acelerada da matéria ao entrar em contato com a luz ultravioleta, se oxidando ao entrar em contato com o oxigênio, o que reduz o plástico em pequenos pedaços que são mais facilmente decompostos na natureza (LÓPEZ-MARTIN et al., 2010). O principal efeito da oxidação é a fragmentação do plástico em pequenas partículas, permanecendo este no ambiente por um tempo indeterminado tornando incontrolável a sua eliminação. A fragmentação do plástico deve-se à adição de aditivos baseados em catalisadores químicos contendo metais de transição tais como cobalto, manganês e ferro ou em materiais biológicos que provocam a fragmentação como resultado de uma oxidação química das cadeias de polímeros dos plásticos, desencadeada pela radiação ultravioleta ou pela exposição ao calor.

Há várias polêmicas e discussões relacionadas a esse tipo de plástico devido aos potenciais problemas ambientais, pois enquanto o polietileno convencional não sofre alterações e podem ser retirados do meio ambiente, os fragmentos microscópicos de plásticos oxi-degradáveis quando oxidados são impossíveis de controlar e retirar do meio ambiente (AGROBIOFILM, 2014).

3.4.3. Bioplástico e a demanda por terra agricultável

Em 2013, a capacidade de produção global para os bioplásticos foi cerca de 1,62 milhões de toneladas, isso representa cerca de 0,6 milhões de hectares de terra. A área necessária para produzir matéria-prima suficiente para a produção de bioplástico de hoje é, cerca de 0,01% da área agrícola mundial de 5 bilhões de hectares European Bioplastics (2015).

A fabricação do bioplástico em escala comercial gera preocupação com a possível disputa por recursos naturais e terra. Segundo Neves e Conejero (2009), o Brasil possui cerca de 340 milhões de hectares de terras aráveis, destas, apenas 1% é utilizado para produção do etanol podendo aumentar a sua produtividade na mesma área com investimentos em melhorias tecnológicas, isso sem utilizar cana-de-açúcar geneticamente modificada, assim, evitando a expansão de terras aráveis. Outra alternativa na produção de bioplásticos é utilizar a segunda geração a partir de biomassa não alimentícia, como o bagaço da cana-de-açúcar. Como a maior parte do consumo de álcool é fornecida para o mercado de biocombustível, a parcela de terras aráveis ocupada para produção de etanol usada para fabricação de polietileno verde equivale a 0,02% ou seja, 65 mil hectares, quantidade irrelevante para impactar na produção de alimentos no Brasil.

3.5. Características dos fungos degradadores

Os fungos desempenham papel fundamental nos ecossistemas, na condição de saprófitos sendo encontrados onde quer que exista matéria orgânica a ser decomposta, sendo que, os fungos são extremamente eficazes nesse aspecto. A atividade enzimática é importante e está relacionada a inúmeras reações necessárias para a vida microbiana no solo, como decomposição de resíduos orgânicos, ciclagem de nutrientes, formação da matéria orgânica e estruturação do solo, constituindo-se dessa forma, em um indicador sensível para ser utilizado na avaliação da qualidade do solo (Dick, 1994; Elsas, 1997; Fernandes, 1999). O amido pode ser utilizado como fonte de energia para o crescimento e esporulação, no entanto, a produção de amilase por fungos degradadores varia de acordo com o gênero e a espécie envolvida (DIANESE, 1990; GRIFFIN, 1994; NWUFO; FAJOLA, 1988). De acordo com Pandey et al. (2005), as enzimas amilolíticas também são produzidas por fungos filamentosos, encontrados em *Mucor pusillus* e *Trichoderma viride* espécies produtoras de α -amilase principal matéria-prima dos filmes Agrobiofilm®

Divisão Amastigomycota

Os fungos desta divisão abrangem quatro subdivisões: *Zygomycotina*, *Ascomycotina*, *Basidiomycotina* e *Deuteromycotina*.

Classe Zygomycetes

A classe dos *Zygomycetes* está distribuída em seis ordens, que incluem a ordem dos *Mucorales* largamente distribuídas no solo.

Ordem Mucorales

Os fungos *Mucorales* são constituídos por um micélio bem desenvolvido, cenocítico, com septos apenas na base dos órgãos reprodutivos. Entretanto, quando as hifas envelhecem podem apresentar-se septadas.

Família Mucoraceae

São abundantes no solo, no esterco e na matéria orgânica fresca e úmida, sendo que, saprófita por degradar preferencialmente moléculas de menor complexidade e desempenha papel importante na primeira colonização do substrato do solo.

Gênero *Mucor* spp.

As espécies dos gêneros *Mucor* e *Rhizopus*, são distinguidas pela presença de rizóides na base dos esporangióforos, em *Rhizopus* e ausente, em *Mucor*.

Classe Deuteromycetes

Os fungos *Deuteromycetes* são classificados como imperfeitos, pois se reproduzem somente por esporos (conídios e clamidósporos) formados por mitose (esporos assexuais).

Gênero *Trichoderma* spp.

O gênero *Trichoderma* corresponde à fase anamórfica do gênero *Hypocrea* pertencente à classe dos fungos *Mitospóricos*, subclasse *Hifomicetos*, ordem *Moniliales*, família *Moniliaceae* (Samuel, 1996).

3.6. Respiração Aeróbia

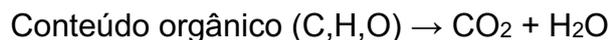
Os métodos respirométricos (consumo de oxigênio e produção de dióxido de carbono) podem ser utilizados para avaliar a biodegradabilidade de polímeros

plásticos em solo agrícola. A respirometria é uma técnica bastante utilizada na determinação da quantidade de carbono liberado na forma de CO₂, resultante da decomposição da matéria orgânica pela comunidade microbiana quimiorganotrófica aeróbia do solo (Stotzky, 1965).

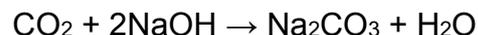
Para avaliar a biodegradação de compostos orgânicos no solo, a respiração da microbiota tem sido utilizada como uma importante ferramenta, a partir de medidas da evolução de CO₂ e absorção de O₂, pois indica a atividade biológica em seu perfil. Portanto, medidas respirométricas como consumo de oxigênio e produção de gás carbônico têm sido utilizadas como evidências da biodegradação. Entre as formas de avaliação da atividade metabólica da microbiota do solo, destaca-se a quantificação de carbono pela liberação de CO₂, conhecida por respiração do solo (Stotzky, 1965).

Emissões de carbono na forma de dióxido de carbono C (C-CO₂) do solo

A biodegradação do conteúdo orgânico presente no solo foi avaliada pelo método de incubação conforme a metodologia descrita por Coscione e Andrade (2006). Esse método se baseia na incubação, em frascos respirométricos, de quantidades conhecidas de solo e resíduo. A reação que ocorre pode ser representada por:



Em seguida o CO₂ formado é recebido por uma solução de volume e concentração conhecida de NaOH que é colocada dentro do frasco respirométrico. A reação que ocorre é:

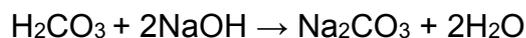


Em seguida determina-se a quantidade de NaOH que sobrou da reação com o CO₂ por condutivimetria de acordo com método proposto por Rodella e Sabóia (1999), calculando-se a quantidade de CO₂ que se formou e que foi originada das reações de degradação do conteúdo orgânico do resíduo no solo.

A metodologia de respirometria por condutivimetria, segundo o método descrito por Rodella & Saboya (1999), pode ser utilizado para determinar a atividade

microbiológica pela geração de gás carbônico liberada nos frascos. O CO₂ liberado na respirometria é capturado pela solução de NaOH e determinado por condutivimetria. A liberação de CO₂ é um método que, quando utilizado sob condições controladas de umidade (40-50% da capacidade de campo) e temperatura (15-25°C), fornece resultados confiáveis a respeito de poluição do solo (Jenkinson e Powlson, 1976). O método da condutivimetria usa a relação direta entre as produções de CO₂ e as mudanças de condutividade da solução básica receptora para análise de biodegradabilidade. Junto com os íons de uma solução aquosa de hidróxido de sódio (NaOH), o CO₂ gerado produz carbonato de sódio (Na₂CO₃). O carbonato é menos dissociável que a base, e mostra uma menor condutividade. A relação linear entre a quantidade de CO₂ liberada e as mudanças na condutividade pode ser usada para determinar a formação de CO₂ com precisão.

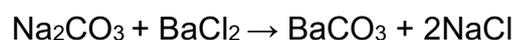
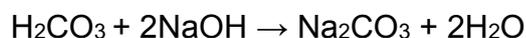
As principais reações de avaliações no sistema de respirometria aeróbia são:



Respirometria aeróbia por titulação volumétrica parâmetro avaliado CO₂

Outra técnica utilizada na respirometria é a da titulação volumétrica, onde a medição da produção de CO₂ é realizada por meio da titulação de hidróxido de sódio NaOH (0,5mol_c L⁻¹) e cloreto de bário BaCl₂ (50%), contendo CO₂, com solução de ácido clorídrico HCl (0,5mol_c L⁻¹) conforme a metodologia descrita por Stotzky (1965). O valor médio de CO₂ liberado do solo em cada período de coleta será o resultado do somatório da quantidade de CO₂ determinado durante 28 dias de incubação das amostras de solo.

As reações que ocorrem durante a aplicação da técnica da respirometria através da titulação volumétrica são:



Os métodos utilizados para a determinação da eficiência de biodegradação baseiam-se na medição de CO₂ gerado no processo de biodegradação e construção de uma curva da massa acumulada desse CO₂ em função do tempo, que deverão apresentar fases distintas, tais como: início da curva com baixíssima inclinação, que deverá corresponder à fase de adaptação dos micro-organismos, seguida de um elevado crescimento exponencial, uma vez que nesta estará ocorrendo elevada atividade microbiana e, por fim, a formação de um patamar, onde a eficiência da biodegradação é drasticamente reduzida.

4. MATERIAL E MÉTODOS

Para avaliar a biodegradabilidade dos plásticos e bioplásticos foi realizado em condições de campo e laboratório durante julho de 2014 a junho de 2015.

4.1. Experimento em condições de campo

A área utilizada no estudo localiza-se na Fazenda Piloto do Departamento de Ciências da Universidade de Taubaté, distante aproximadamente 10 km do centro da cidade de Taubaté (SP), compreendida entre as coordenadas 23°02'34S e 45°31'02"W e com altitude média de 577m. O clima local, de acordo com a classificação de Köpen (1948) é do tipo Cwa (sub-tropical), com chuvas de verão e com uma precipitação média anual de 1300mm.

Área experimental

A área experimental com 48m² foi demarcada para realizar a aração e o gradeamento do solo até a camada de 40 cm de profundidade, depois efetuou-se o nivelamento e a subdivisão da área em 12 parcelas de 1m de largura e 4m de comprimento (Figura 2).

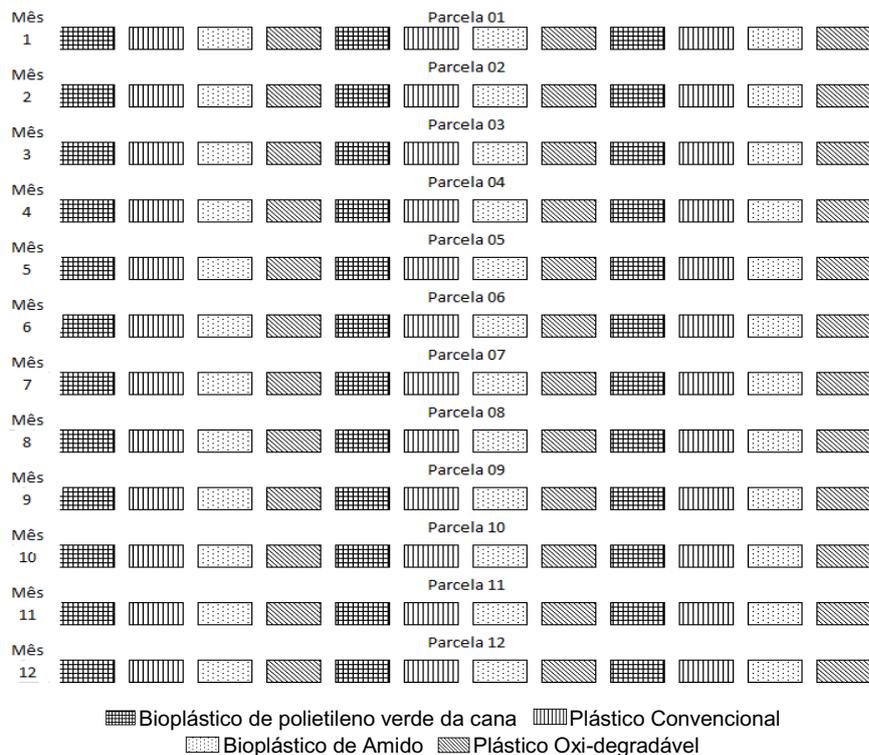


Figura 2. Croqui da área experimental referente às 12 parcelas em campo.

4.1.1. Caracterização do Solo

Para a caracterização da composição química do solo foram coletadas cerca de 10 sub-amostras na profundidade de 20 cm do solo, depois as sub-amostras foram misturadas para compor uma amostra composta e enviada para o Laboratório de Solos e Plantas do Departamento de Ciências Agrárias da Universidade de Taubaté conforme as metodologias propostas pela Embrapa (1997).

4.1.2. Classificação e composição química do solo

O solo foi classificado como um Latossolo Vermelho Amarelo distrófico de textura média (Embrapa, 1999) apresentando pH 5,8 e 2,1% de matéria orgânica.

4.2. Avaliação da biodegradabilidade dos polímeros no campo

Para estimar a perda de massa dos polímeros no solo, bolsas de náilon contendo os plásticos e bioplásticos de amido e etanol foram enterradas nas 12 parcelas e depois retiradas mensalmente durante 12 meses, no período de junho de 2014 a junho de 2015, para determinar a porcentagem de perda de massa de cada polímero, sendo aplicados 4 tratamentos: 1-Bioplástico de polietileno verde da cana-de-açúcar, 2-Plástico de polietileno convencional, 3-Bioplástico de amido e 4-Plástico Oxi-degradável) perfazendo um total de 144 bolsas de náilon durante 12 meses (Figura 3).

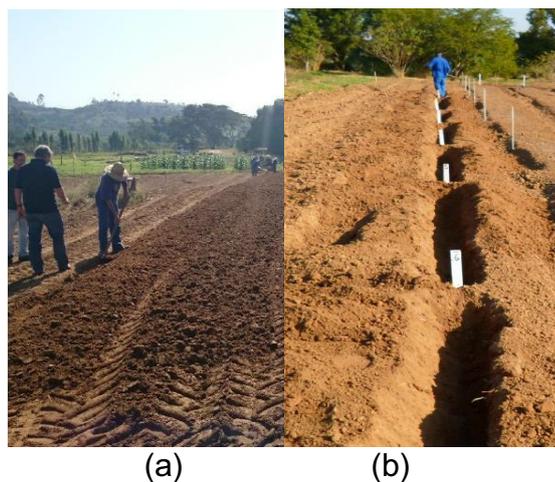


Figura 3. Preparo e nivelamento da área experimental (a), demarcação das parcelas (b).

4.2.1. Confeção das bolsas de náilon

As bolsas de náilon com malha de 2,0 mm² foram confeccionadas no laboratório de Fitopatologia e Microbiologia Agrária da Universidade de Taubaté. A tela de náilon foi cortada e as bolsas foram montadas com 20 cm de comprimento por 15 cm de largura, os plásticos e bioplásticos foram cortados e pesados medindo 15 cm de comprimento por 10 cm de largura. Em média cada bioplástico de polietileno verde da cana pesava 171 mg, 0,059 mg para o plástico de polietileno convencional, 269 mg de bioplástico de amido e 98 mg de oxi-degradável em seguida as bolsas foram seladas em uma seladora da marca Barbi, modelo 400 CP (Figura 4).

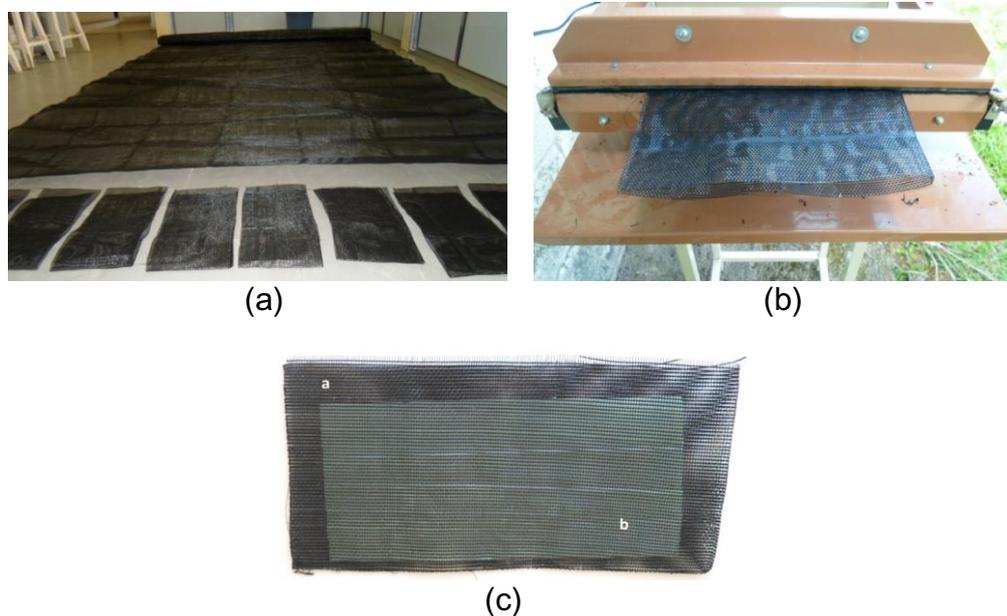


Figura 4. Corte da tela de náilon (a), seladora modelo 400 CP para confecção das bolsas (b) e Bolsa de náilon 20 x 15 cm contendo bioplástico de polietileno verde 10x15 cm (c).

As bolsas de náilon contendo os plásticos e bioplásticos de amido e etanol da cana foram distribuídas nas parcelas a 20 cm de profundidade, em número de 12 bolsas/parcela. Estas bolsas foram retiradas nos períodos de 30, 60, 90, 120, 150, 180, 210, 240, 270, 300, 330, 360 dias após serem enterradas no solo (Figura 5).



Figura 5. Bolsas de náilon distribuídas com os respectivos plásticos e bioplásticos na camada de 20 cm de profundidade do solo.

4.2.2. Retirada das bolsas no solo

Após a retirada das bolsas no solo, os diferentes polímeros foram retirados das bolsas e lavados com uma solução de hipoclorito de sódio 12% para retirar as partículas de areia, silte e argila aderidas aos plásticos e bioplásticos (Embrapa, 1997). Após secagem em temperatura ambiente, os plásticos foram pesados para avaliar a variação da massa em porcentagem (%).

4.2.3. Determinação da perda de massa

A biodegradação dos polímeros foi avaliada por meio da variação de massa dos polímeros (Equação 1) determinados antes de enterrar (M_0) e depois de retirado do solo (M_f). O material contido em cada bolsa de náilon foi limpo, seco ao ar e pesado, para determinar a porcentagem de perda ($\Delta M\%$), conforme a equação descrita abaixo:

$$\Delta M_{\%} = \frac{M_o - M_f}{M_o} \times 100\% \quad \text{Eq. 1}$$

Os resultados foram submetidos à análise de variância e a diferença entre as medias foram avaliados pelo teste de Tukey a 5%. Os dados foram analisados pelo software “SAS for Windows” (SAS, 2000).

4.3. Variáveis avaliadas em condições naturais

Os dados meteorológicos de temperatura e precipitação foram realizados diariamente com auxílio dos equipamentos (termógrafo e pluviógrafo) existentes na

Estação Meteorológica Automática (CPETC-INPE) situada no Departamento de Ciências Agrárias da Universidade de Taubaté (UNITAU).

4.3.1. Umidade do solo

A umidade do solo foi determinada pelo método da diferença de peso, coletando-se amostras de solo no centro dos canteiros, a 10 cm de profundidade. Depois de homogeneizadas as amostras foram acondicionadas em recipientes de isopor e enviadas ao laboratório para a quantificação do peso úmido. Em seguida, as amostras de solo foram colocadas em estufas a 105°C, até a completa secagem do solo e então pesadas (Figura 6). O teor de umidade do solo foi obtido pela diferença entre a massa final (M_f) e inicial (M_o) das amostras, e posteriormente o peso foi transformado em porcentagem conforme a equação 2 (Embrapa, 1997).

$$\Delta M_{\%} = \frac{M_o - M_f}{M_f} \times 100\%$$

Eq. 2

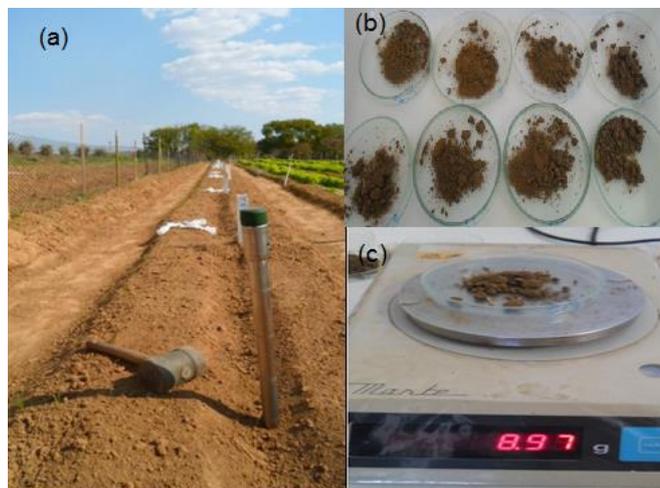


Figura 6. Sonda para determinação da umidade do solo (a), Amostras de solo (b) e Balança Marte AD 3300g (c).

4.4. Experimento em condições controladas

No laboratório de Fitopatologia e Microbiologia Agrária da Universidade de Taubaté foram realizados os ensaios de biodegradabilidade dos polímeros plásticos e biopolímeros de amido e etanol.

4.4.1. Avaliação da biodegradabilidade dos polímeros em condições controladas

A biodegradabilidade dos polímeros plásticos e biopolímeros de amido e etanol da cana no solo foram avaliadas pela liberação do dióxido de carbono (CO₂), biomassa de carbono e identificação e quantificação de fungos decompositores em amostras de solo misturadas com bioplástico de polietileno verde da cana, plástico de polietileno convencional, bioplástico de amido, plástico oxi-degradável e celulose como controle.

O delineamento experimental utilizado no ensaio de biodegradação foi o de blocos casualizados, com quatro blocos e sete tratamentos: 1-solo; 2-solo + plástico biopolietileno verde da cana; 3-solo + plástico de polietileno convencional; 4-solo + bioplástico de amido e 5-solo + plástico oxi-degradável; 6-solo + celulose e 7-solo ausente (branco).

Os resultados foram submetidos à análise de variância e a diferença entre as medias foram avaliados pelo teste de Tukey a 5%. Os dados foram analisados pelo software "SAS for Windows" (SAS, 2000).

4.4.2. Variáveis avaliadas

Liberação do dióxido de carbono (C-CO₂) do solo

Para a determinação da biodegradação em laboratório, foram amostrados 100 mg de cada tratamento; tendo a celulose como referência; biopolímero de polietileno verde da cana; polímero plástico de polietileno convencional; biopolímeros de amido da marca Mater-Bi™ e polímero plástico oxi-degradável, cortados em pedaços de 1 mm de diâmetro e misturado com 100 g de solo retirados da segunda parcela e acondicionados em frascos de vidro (Figuras 7).

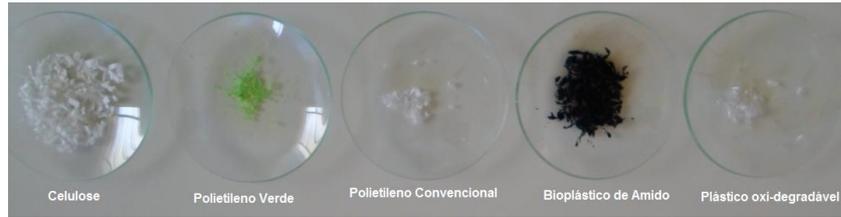


Figura 7. Fragmentos dos plásticos, bioplásticos e celulose para misturar ao solo.

Após a mistura dos fragmentos de polímeros plásticos e biopolímeros de amido e etanol da cana e celulose a 100 g de solo, com teor de água ajustado para 70% da capacidade de retenção de água, em cada frasco de incubação, foi colocado copos descartáveis de 50 mL de capacidade contendo 40 mL de solução de hidróxido de sódio (NaOH) de concentração exatamente conhecida, $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ para absorver o CO_2 liberado do solo pelo processo de retenção passiva. A cada novo período de avaliação os frascos foram trocados por outros contendo solução de NaOH recém preparada, isenta de íons carbonato, para a captação de CO_2 . Esses frascos foram trocados a cada 72 horas, pois o objetivo foi impedir que a capacidade de absorção de CO_2 pela solução de NaOH fosse ultrapassada (Figura 8).



Figura 8. Frascos de vidro contendo solo misturado com plástico e bioplástico e um copo descartável contendo solução de NaOH $0,5 \text{ mol L}^{-1}$.

Os frascos de vidros, depois de fechados, foram levados para a incubação em uma sala climatizada à temperatura de $\pm 28^\circ\text{C}$ e em ausência de luz por 28 dias. Em intervalos de 3 dias, foram realizadas as determinações de CO_2 desprendidos pelas amostras de solo que foram capturados pela solução de NaOH ($0,5 \text{ mol L}^{-1}$) contida nos copos descartáveis de 50 ml. A determinação da quantidade de CO_2 liberada nos frascos foi determinada por condutivimetria (Figura 9a). A metodologia descrita

por Rodella e Saboya (1999) é uma alternativa para a medição de CO_2 liberado do solo. Ela se baseia no decréscimo da condutividade elétrica de uma solução alcalina à medida que o CO_2 é absorvido, pois íons OH^- reagem com o CO_2 para produzir CO_3^{2-} . O fenômeno ocorre porque a mobilidade do íon hidróxido é bem mais elevada do que a da maioria dos ânions, inclusive do íon carbonato (Rodella e Saboya, 1999).

Os resultados da condutividade elétrica foram comparados aos da titulação volumétrica das soluções de NaOH contida nos copos descartáveis (Figura 9b). Após 28 dias de incubação os frascos de vidro com os copinhos descartáveis contendo o NaOH $0,5 \text{ mol}_c \text{ L}^{-1}$, foram adicionados 1mL de BaCl_2 (50%) e três gotas do indicador fenolftaleína (3%) em seguida foi efetuada a titulação com HCl ($0,5 \text{ mol}_c \text{ L}^{-1}$), para quantificação da massa liberada de CO_2 por amostra de solo (mg g^{-1}), conforme a metodologia descrita por Stotzky (1965). O valor médio de CO_2 liberado do solo em cada período de coleta foi o resultado do somatório da quantidade de CO_2 determinado durante 28 dias de incubação das amostras de solo.

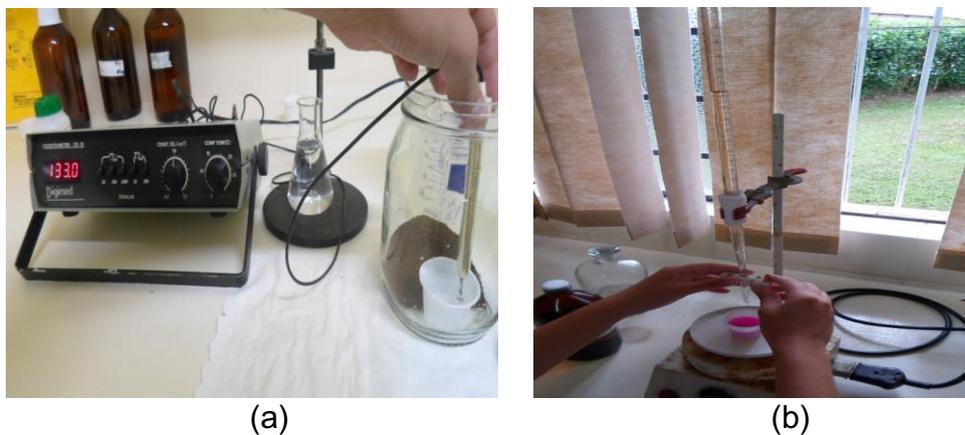


Figura 9. Condutímetro para determinação da liberação do dióxido de carbono $\text{C}_{\text{C-CO}_2}$ (mg) do solo (a), titulação volumétrica com HCl ($0,5 \text{ mol}_c \text{ L}^{-1}$), para quantificação da massa liberada de CO_2 por amostra de solo (mg g^{-1}) (b).

4.4.3. Estimativa da população de micro-organismos

A contagem de micro-organismos no solo foi estimada por métodos indiretos, considerando os propágulos existentes na amostra capazes de formar colônias. No procedimento de isolamento, os micro-organismos foram obtidos em condições naturais e colocados em condições artificiais. Dessa maneira, ocorreu seleção dos micro-organismos, pelo meio de cultura utilizado e pelas condições ambientais do

cultivo. Geralmente, a contagem de micro-organismos do solo é realizada pela técnica de plaqueamento em meio de cultura. Esse procedimento detecta um número menor de espécies de micro-organismos que ocorre naturalmente no solo, pois favorece o crescimento de um pequeno grupo de espécies de metabolismo rápido e adaptadas a sobreviver em solo relativamente deficiente em nutrientes (Brookes e McGrath, 1984; Jahnel 1997; Elsas, 1997).

Para estimar a população de micro-organismo foi preparado uma solução tampão de fosfato 1mM (pH 7,0) em um balão volumétrico de 1000mL de fosfato de potássio diácido (KH_2PO_4) das soluções estoques foi completado o volume com água destilada (pH 7,1 – 7,4). Em seguida foram adicionado 95 mL e 9 mL desta solução tampão 1 mM de fosfato (pH 7,0), em frascos de 250 mL.

Posteriormente foi transferido 10 g de solo úmido para os frascos contendo 95 mL da solução tampão de fosfato sendo agitado manualmente. Com uma pipeta estéril, foi transferido 1 mL desta suspensão para um tubo esterilizado contendo 9 mL da solução tampão fosfatado em diluições decimais seriadas (10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5}), sendo o plaqueamento efetuado em meio de agar. A contagem de unidades formadoras de colônias (UFC) foi realizada após 7 dias de incubação (Jahnel, et al., 1999).

Coleta e Isolamento de micro-organismo decompositor

Os fungos foram isolados conforme metodologia descrita por Menezes (1997) a partir de amostras de fragmentos de plásticos e bioplásticos de amido e etanol da cana coletadas mensalmente de agosto a novembro de 2014, após a incorporação das bolsas de náilon no solo (Figura 10).



Figura 10. Bolsa de náilon contendo fragmento de bioplástico de amido.

No laboratório de Fitopatologia e Microbiologia Agrária da Universidade de Taubaté, as amostras dos diferentes polímeros foram retirados das bolsas e lavados com uma solução de hipoclorito de sódio 12% para retirar as partículas de areia, silte e argila aderidas aos polímeros e, os fragmentos de plásticos e bioplásticos foram distribuídos em placas de Petri com meio de cultura contendo apenas Agar sem fonte de carbono e colocadas em estufa a temperatura de $\pm 28\text{ }^{\circ}\text{C}$ por um período de 48-72 h (Figura 11).

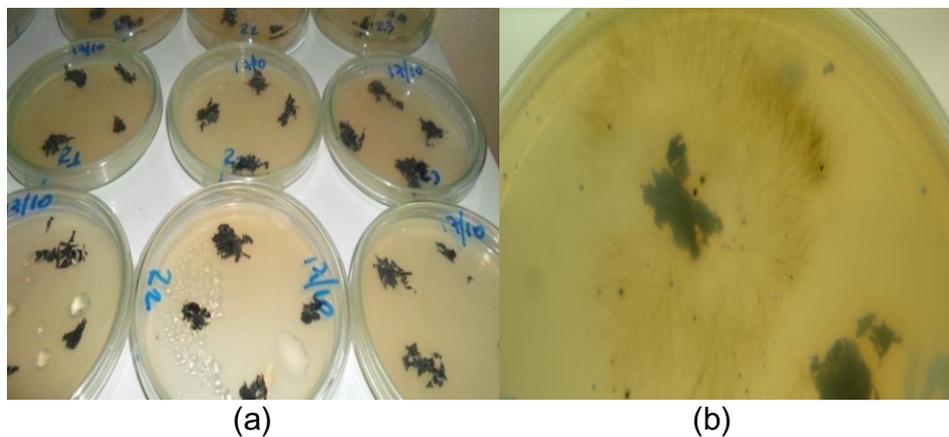


Figura 11. Isolamento de fungos a partir de fragmentos de bioplástico de amido em meio contendo apenas agar sem fonte de carbono (a), desenvolvimento de micélio após 7 dias (b).

Após 72h de incubação os micro-organismos foram transferidos para um meio de cultura ágar batata dextrose Agar-DBA (Figura 12).

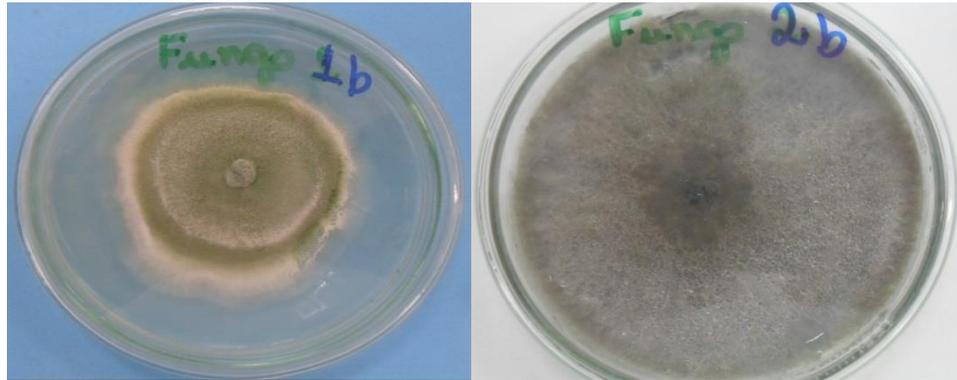


Figura 12. Crescimento de isolados fungos em meio de cultura contendo agar-batata-dextrose (DBA) para a identificação.

Conservação de colônia de fungos

Os isolados de fungos foram conservados em água destilada esterilizada segundo a metodologia descrita por Castellani (1967), que consiste na substituição do meio de cultura por água destilada esterilizada em frascos de vidro (1,0 mL) num volume de aproximadamente metade da capacidade do recipiente. Assim os fungos foram retirados em discos de ágar (6 mm de diâmetro) da extremidade de uma colônia jovem de fungo, introduzindo de um a dois discos da cultura em cada frasco e depois de fechado hermeticamente foi armazenado sobre refrigeração entre 5 a 15°C para identificação posterior (Figura 13).

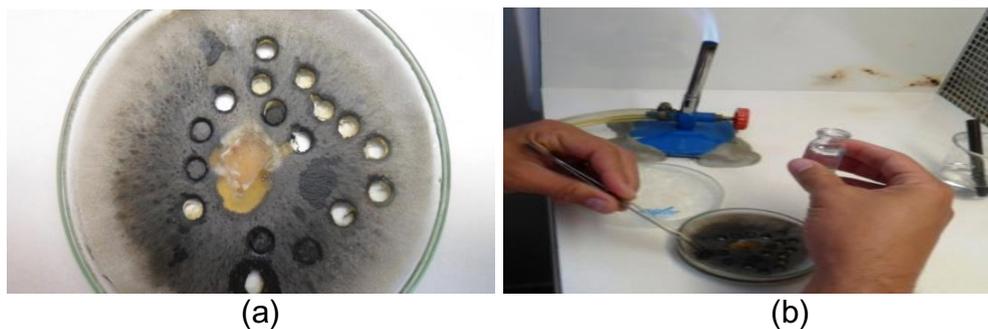


Figura 13. Discos de ágar da extremidade de uma colônia, (a) discos de ágar contendo micélio de fungos preservados em água destilada (b).

Reativação das colônias de fungos

Os discos foram retirados dos frascos de penicilina com o auxílio de uma alça de platina e introduzidos no centro da placa de Petri em um meio de cultura

contendo Agar batata dextrose (DBA) para multiplicação das colônias e, sendo mantidos em sala com temperatura de $\pm 28\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 96h de incubação.

Preparo do Microcultivo

Em seguida foram preparadas placas de Petri contendo lâminas de microscopia dispostas sobre um bastão de vidro em forma de V, colocou-se um pequeno bloco (1 cm) de Agar batata-dextrose.

Com a alça de platina, retirou-se um pequeno fragmento de uma colônia que foi depositado sobre o Agar e recoberto por lamínula estéril. Posteriormente foi acrescentada água destilada estéril na placa para evitar o ressecamento do meio. Estas placas foram fechadas e estocadas em temperatura ambiente (Figura 14).

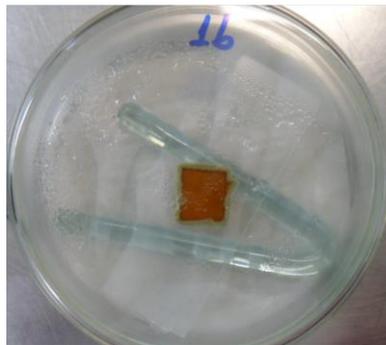


Figura 14. Microcultivo de fungos filamentosos isolados de fragmentos de bioplástico de amido.

Após o microcultivo foi retirada a lamínula com os fungos filamentosos e colocada em uma lâmina contendo uma gota de fixador a base de azul de metileno (lactofenol azul), sendo feito o mesmo com a lâmina do microcultivo. Em seguida colocou-se uma lamínula sobre a lâmina. Retirou-se o excesso de corante com papel higiênico, logo após vedou-se com esmalte e levou o conjunto para a visualização em microscópio ótico. No microscópio utilizou-se a objetiva de 4x, para que se pudessem observar os propágulos depositados na lâmina, após a observação destes, foram utilizadas as objetivas de 10x e 40x, para observar as estruturas fúngicas com mais detalhes.

Foram realizadas as macrofotografias e microfotografias das estruturas fúngicas no microscópio ótico e das frutificações fúngicas na superfície da placa de

Petri, no microscópio ótico e no estereoscópico, sendo utilizada câmera digital Samsung® modelo Power Shot SD750, 14 mega pixels.

A identificação foi realizada a partir das observações macroscópicas baseada nas descrições das colônias no meio de cultura e as observações microscópicas foram baseadas nas características e estruturas celulares dos fungos filamentosos isolados, seguindo a identificação proposta (Menezes, 1993).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os dados relativos à temperatura máxima, média e mínima do ar e a média mensal da precipitação pluviométrica durante o período de realização do estudo (julho de 2014 a junho de 2015), são apresentados nas Figuras 15 e 16. Observa-se na Figura 15 que a temperatura média do ar durante o período experimental foi de 21,7 °C, a média das temperaturas mínimas resultou em 20,9°C e a média das temperaturas máximas em 22,5 °C.

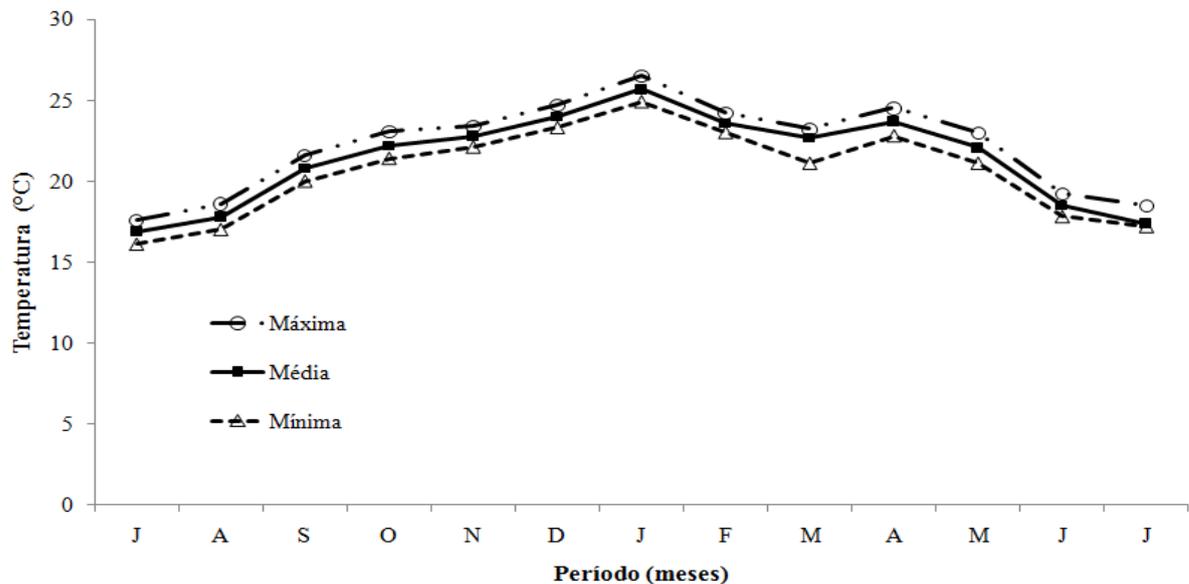


Figura 15. Temperatura do ar (°C) máxima, média e mínima durante o período experimental. Departamento de Ciências Agrárias (UNITAU), Taubaté, SP, 2014/2015.

A precipitação acumulada durante o período experimental foi de 891,4 mm e entre julho e agosto de 2014 o acumulado foi igual a 40 mm e entre setembro de 2014 a março de 2015 o acumulado foi igual a 823 mm.

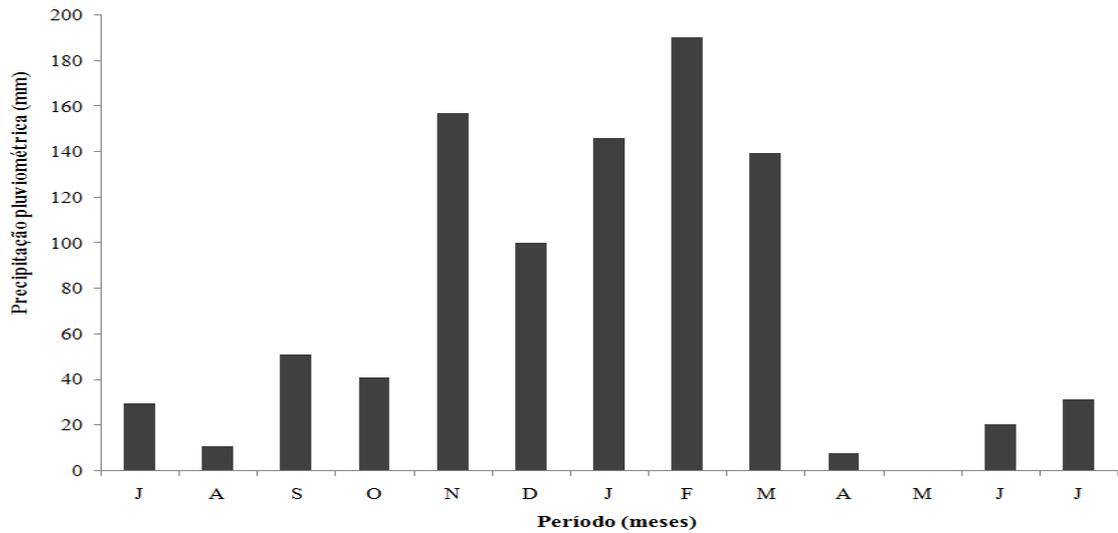


Figura 16. Precipitação pluviométrica durante o período experimental. Departamento de Ciências Agrárias (UNITAU), Taubaté, SP, 2014/2015.

Na figura 17, pode-se observar que a umidade do solo se manteve no intervalo de $11,09 \pm 0,97\%$, uma umidade baixa para a atividade microbiana, sendo um parâmetro que influencia na biodegradação em condições reais.

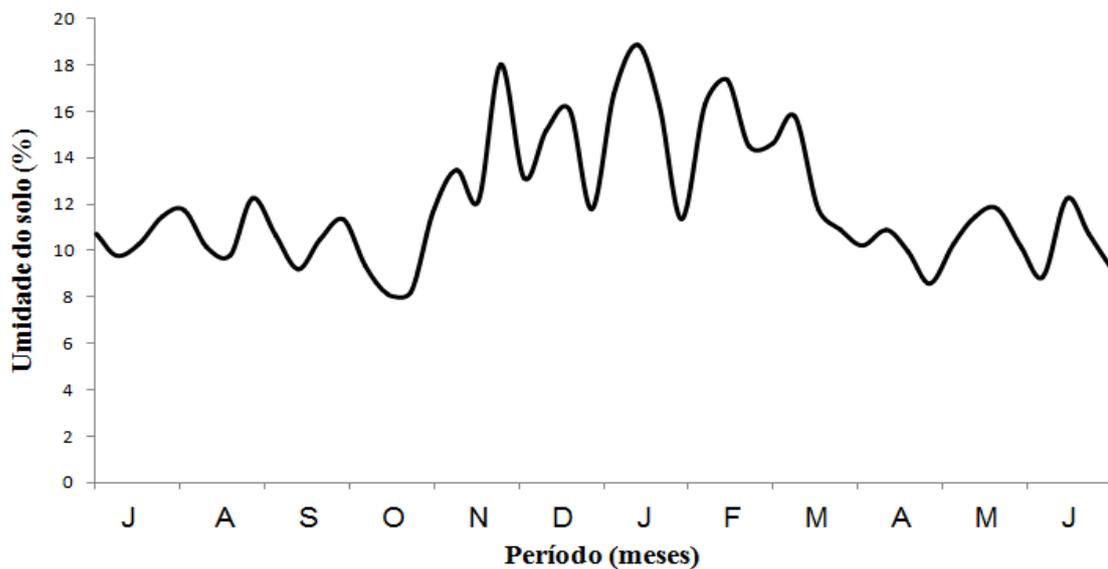


Figura 17. Umidade do solo (%) registrada durante o período experimental (julho de 2014 a julho de 2015).

Na figura 18 verificou-se a umidade do solo em porcentagem e a precipitação em milímetros durante o período experimental, coincidindo com baixa umidade do solo e pouca precipitação entre julho a outubro de 2014 e com a chegada da

estação chuvosa no mês de novembro a umidade do solo foi maior promovendo o aumento da umidade do solo.

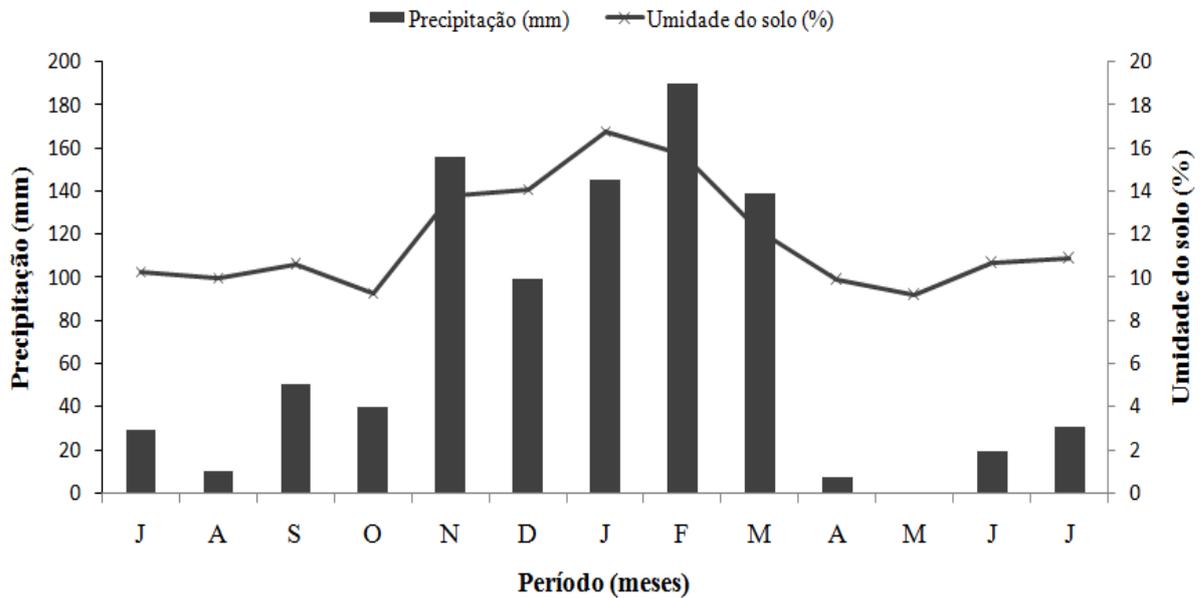
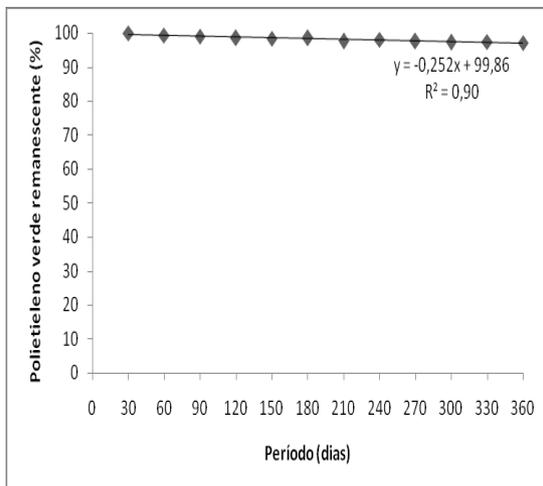


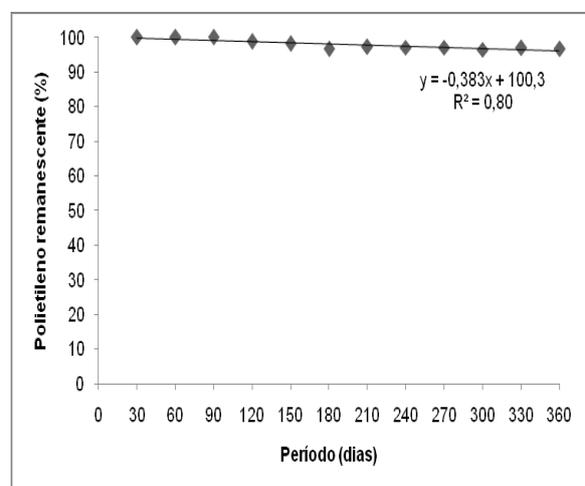
Figura 18. Relação entre a umidade do solo (%) e Precipitação (mm) registrados durante o período experimental.

5.1. Biodegradação dos plásticos e bioplásticos em campo

Dos plásticos avaliados durante o período experimental, o bioplástico de amido foi o que apresentou maior perda de massa em porcentagem entre os tratamentos, sendo constatado 20% de degradação do bioplástico de amido nos primeiros 30 dias de ensaio durante o inverno, atingindo 60% de decomposição no início do verão após 180 dias de ensaio (figura 19).



(a)



(b)

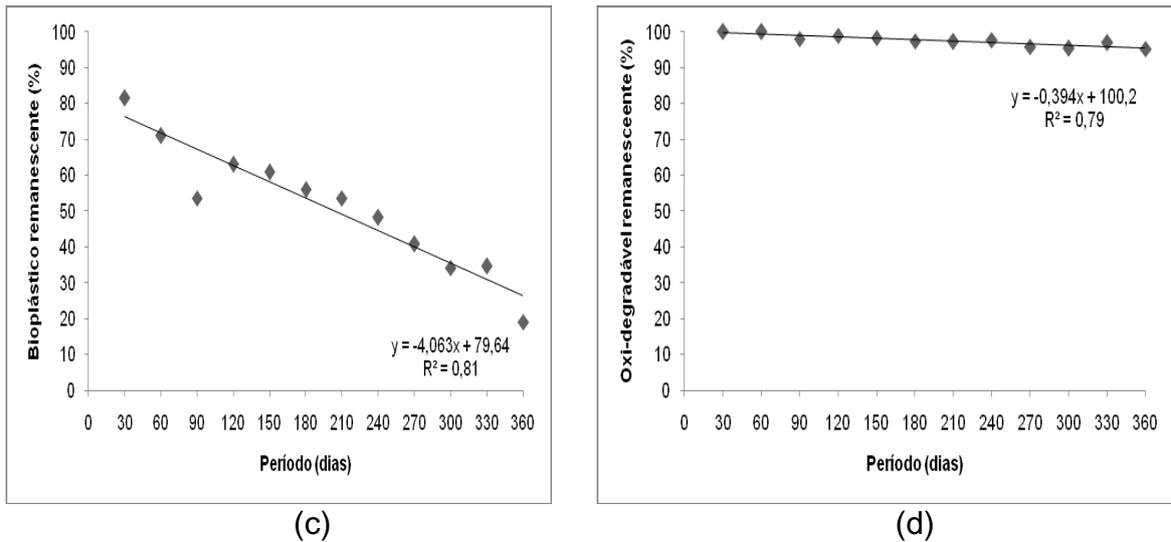


Figura 19. Perda de massa em porcentagem do bioplástico de polietileno verde (a), plástico de polietileno convencional (b), bioplástico de amido (c) e plástico oxidegradável durante o período experimental.

Observa-se na figura 20, que no primeiro mês de ensaio a degradação do bioplástico foi de 20% com uma precipitação acumulada de 40 mm. Na mesma figura 20, as chuvas que ocorreram aos 120, 150, 180, 210 e 240 dias promoveram aumento na umidade do solo, o que, provavelmente, favoreceu a atividade dos micro-organismos. A partir do terceiro mês a taxa de decomposição tornou-se mais acentuada, com um aumento na velocidade de decomposição bastante significativo até o final do período estudado.

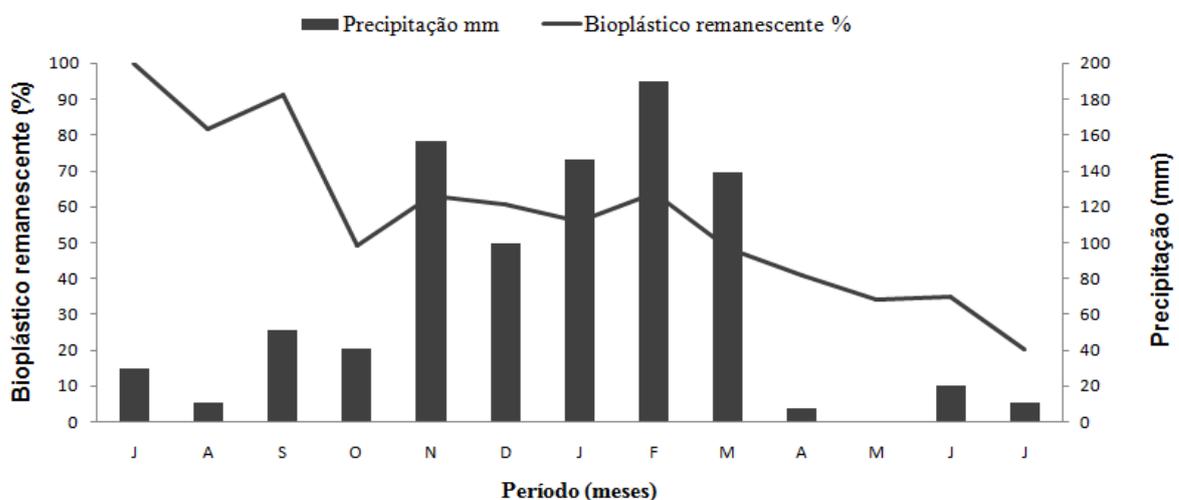


Figura 20. Decomposição do bioplástico de amido (%) e Precipitação (mm) registradas durante o período experimental.

Muitas vezes, o desaparecimento de fragmentos de polímeros das bolsas de náilon não significou necessariamente, que houve uma completa mineralização da fração removida. A precipitação pode contribuir para a remoção dos fragmentos de polímeros das bolsas de náilon. Provavelmente não foi o que ocorreu no início do experimento, pois os índices pluviométricos registrados nos períodos iniciais não se enquadraram como de alta precipitação.

Na figura 21, pode-se observar que a umidade do solo se manteve no intervalo de $11,09 \pm 0,97\%$, apesar da umidade baixa, as condições de campo favoreceram a atividade microbiana, sendo que a umidade é um dos parâmetros que influencia na biodegradação em condições reais.

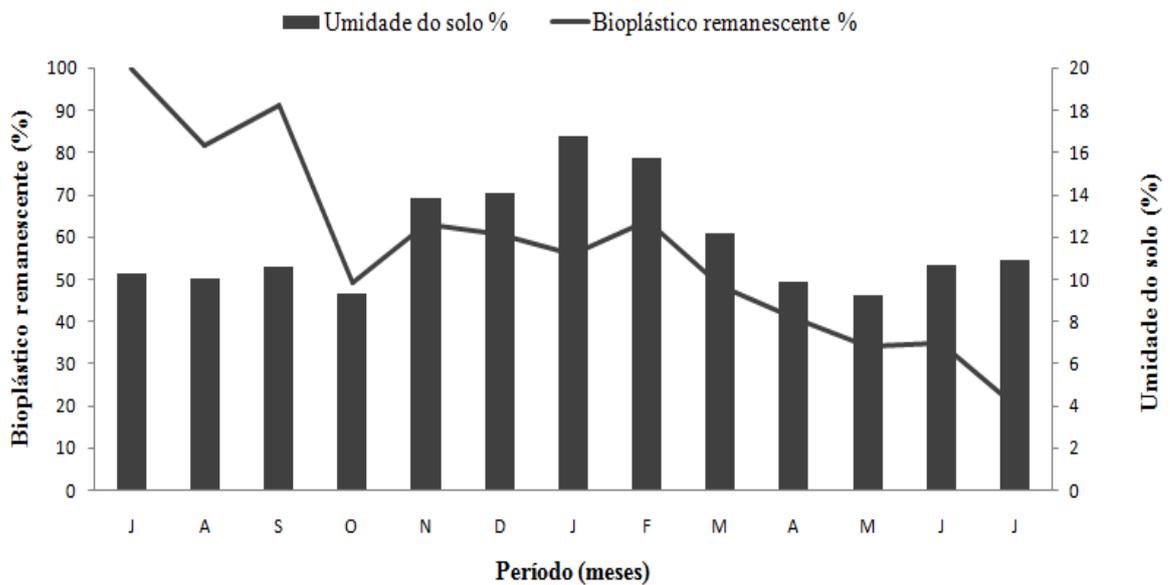


Figura 21. Decomposição do bioplástico de amido (%) e Umidade do Solo (%) durante o período experimental.

De acordo com Pajari (1995), ao afirmar que a atividade dos micro-organismos no solo, durante a decomposição, é regulada principalmente pela composição química do material a ser decomposto, pela temperatura e umidade do solo.

Na figura 22 pode ser observado o processo de biodegradação do bioplástico de amido durante o período de incubação. Depois de 90 dias de ensaio, não foi possível lavar com a solução de hipoclorito de sódio 12% para retirar as partículas de areia, silte e argila aderidas aos polímeros.

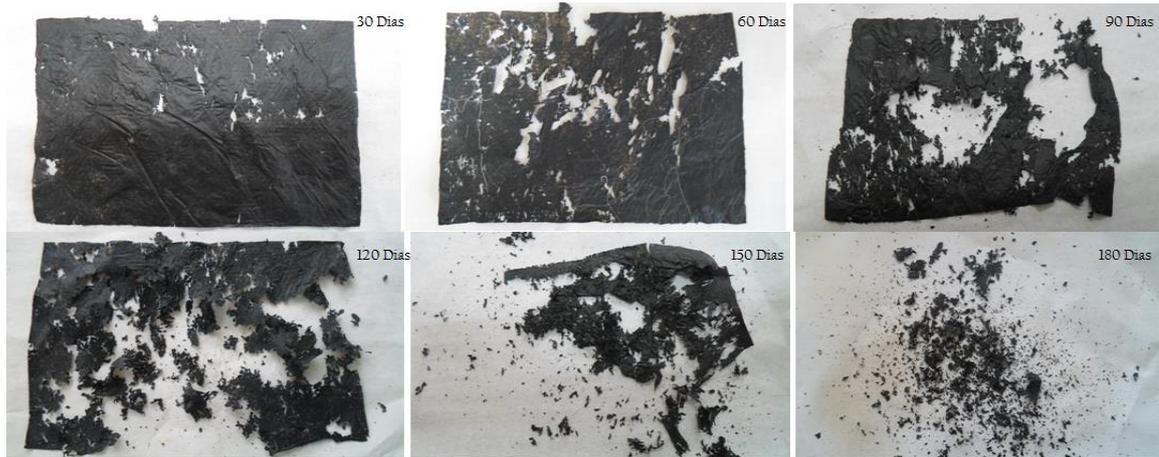


Figura 22. Decomposição do bioplástico de amido no período de 30 a 180 dias de incubação no solo.

A partir do oitavo mês de ensaio de biodegradação foram encontradas minhocas no bioplástico de amido e no bioplástico da cana-de-açúcar devido às características apresentadas pelo solo da área experimental com teor de matéria orgânica de 2,1%, contribuindo para a maior atividade microbiana, o que favoreceu a presença de fungos degradadores nos bioplásticos e gerou fonte de alimento para as minhocas (figura 23).



Figura 23. Presença de minhocas nas bolsas de nylon contendo bioplástico de amido (a) e bioplástico da cana-de-açúcar.

A biodegradação do bioplástico é influenciada pela temperatura, umidade, fertilidade, matéria orgânica do solo e as condições climáticas da região, talvez estas variáveis interagindo em conjunto ou isoladas sejam responsáveis para explicar os diferentes resultados verificados nos estudos de campo realizados por diversos autores (Olsen e Gounder, 2001; Wang et al., 2004; Lopez et al., 2007; Moreno e Moreno, 2008). Olsen e Gounder (2001) utilizando bioplástico na cobertura do solo para a produção de hortaliças na Espanha constataram que 20% do bioplástico foi degradado em 33 dias no verão, 38 dias na primavera, 56 no outono e 83 dias no inverno. Lopes et al (2007) estudando o cultivo do melão em uma região mediterrânea da Espanha, constataram que o bioplástico levou cerca de 6 meses para se decompor após se incorporado ao solo. Já Mirshekari et al (2012) avaliando a eficiência da cobertura do solo com bioplástico e polietileno na produção de milho doce em uma região com elevada temperatura e umidade no Irã, constataram que 50% do bioplástico foi degradado em 56 dias após ter sido utilizado para revestir o solo.

Em relação ao teor de matéria orgânica no solo, Saraiva et al, (2012) constataram que a biodegradabilidade do bioplástico e o polietileno não apresentaram diferença significativa em solos com 1% de matéria orgânica, por outro lado, Barragán et al (2010) observaram elevadas taxas de biodegradação do bioplástico em solos com teores de matéria orgânica acima de 3,9%.

O plástico biodegradável pode ser incorporado ao solo, onde deve degradar rapidamente, isto é, deve perder resistência mecânica e ser degradado, com uma redução no grau de polimerização (Figura 24).



Figura 24. Fragmento de plásticos de polietileno (a) e fragmento de bioplástico de amido (b) incorporado no solo.

5.2. Biodegradação dos plásticos e bioplásticos em condições controladas

5.2.1. Liberação de CO₂ do solo

A tabela 1 apresenta a variação da emissão de C-CO₂ do solo entre os tratamentos em amostras coletadas no segundo mês após a incorporação das bolsas de náilon no solo.

Tabela 1. Valores médios de carbono liberado na forma de CO₂ (mg 100g⁻¹ solo) nos tratamentos

Identificação dos Tratamentos	1° dia	3° dia	6° dia	9° dia	12° dia	15° dia
Solo + Celulose	2,8ab	14,2a	15,0ab	18,2a	23,7ab	71,0ab
Solo + Oxi-degradável	2,0ab	11,7ab	15,0ab	12,4a	22,3ab	61,3ab
Solo + Polietileno verde	0,9b	9,0b	8,9bc	15,2a	21,1ab	62,1ab
Solo + Polietileno conven.	4,1a	13,9ab	12,2ab	16,9a	30,0a	64,9ab
Solo + Bioplástico amido	3,1ab	12,4ab	17,5a	16,6a	25,3ab	92,7a
Solo	2,2ab	10,2ab	10,7abc	19,6a	21,3ab	52,0ab
Branco	0,9b	9,9ab	5,7c	16,0a	10,5b	42,6b
C.V. (%)	56,72	18,44	27,80	30,21	36,84	30,50

Médias seguidas da mesma letra na vertical não diferem estatisticamente entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

As emissões médias de C-CO₂ foram influenciadas significativamente pelos tipos de tratamento utilizados no solo, sendo o maior valor observado no tratamento com bioplástico de amido e o menor no tratamento com apenas solo.

Verifica-se que a liberação de C-CO₂, no 1° dia, manteve-se estável entre os tratamentos, depois do 3° dia a quantidade de C-CO₂ apresentou uma elevação, sendo que os valores do carbono do solo do bioplástico de amido diferiram estatisticamente do polietileno convencional e verde. O bioplástico de amido apresentou o valor mais elevado e diferiu significativamente dos demais tratamentos. A celulose e o bioplástico de amido diferiram significativamente, provavelmente à facilidade de acesso dos micro-organismos ao carbono neste substrato.

Esses resultados sugerem que o bioplástico por apresentar em sua composição o amido tende a se degradar mais rapidamente no solo, pois o amido é

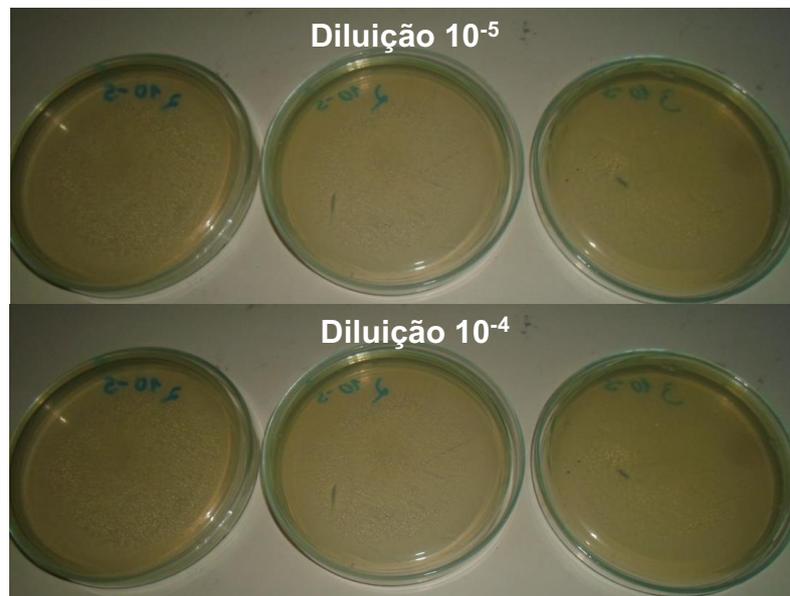
uma molécula orgânica de fácil assimilação pela maioria dos micro-organismos do solo.

De acordo com Bastioli et al. (1990), Kasirajan e Ngouajio, (2012) a incorporação do bioplástico no solo incubado disponibilizou moléculas de amido que por serem solúveis foram rapidamente degradadas em glicose e assimiladas pelos micro-organismos como fonte de energia e convertidas em emissões de C-CO₂.

Foi realizada a titulação volumétrica das soluções de hidróxido de sódio contida nos copos descartáveis colocados no interior dos frascos respirométricos. Os valores do carbono degradado do solo obtidos por condutivimetria e por titulação foram similares, o que permitiu validar os resultados.

5.3. Comunidade de micro-organismos do solo

Após o processo de diluição seriada até 10⁻⁵, as amostras de solo oriunda da coleta de campo foram incubadas em placa de Petri, contendo meio de cultivo BPA e mantidas por 72h. Como pode ser observado na figura 25, a diluição 10⁻³ apresentou melhores condições de crescimento para obtenção de colônias de fungos.



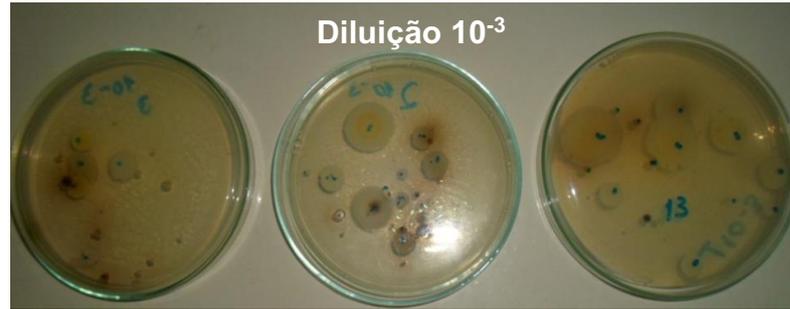
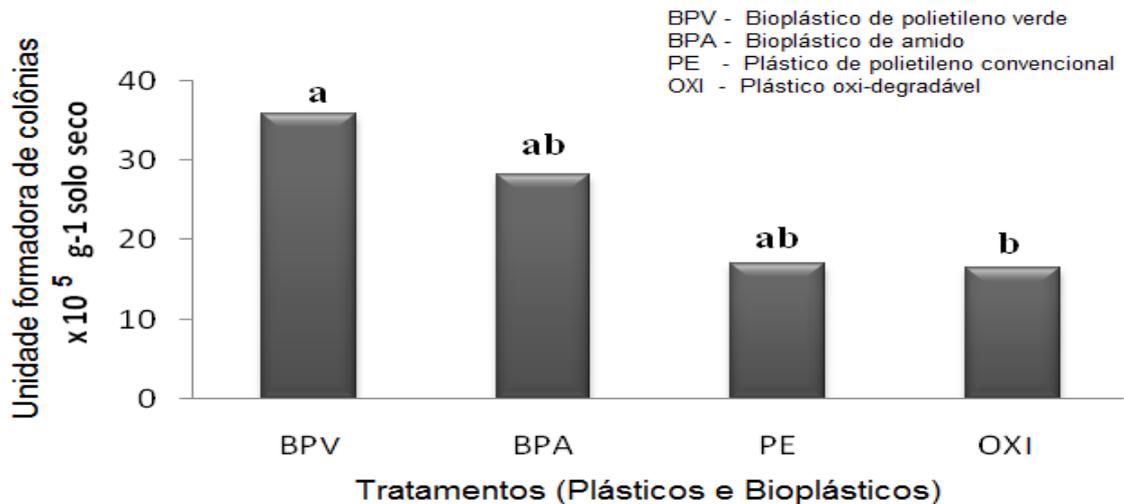


Figura 25. Placas de Petri contendo meio de cultivo BPA mostrando o crescimento de colônias de fungos na diluição seriada da amostra de solo oriunda da coleta de campo.

As UFC de bactérias foram contadas aos 7 dias de isolamento e os resultados apresentados na Figura 26 evidenciaram maior número de colônias nos bioplásticos, sendo que o de sacarose foi o filme que apresentou mais unidades forados de colônias.



Médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

Figura 26. Unidades formadoras de colônias presentes no isolamento do solo sob as bolsas de náilon, aos 7 dias de ensaio.

A contagem dos micro-organismos degradadores presentes no bioplástico de amido pode ser observada na tabela 2.

Tabela 2. Tipos de micro-organismos presentes após 7 dias de incubação do solo em meio de cultura para cada uma das parcelas experimentais de bioplástico de amido, retiradas das bolsas de náilon de biodegradação real após 60 dias.

Bolsas de náilon com bioplástico de amido 60 dias	Repetição	Tipos de micro-organismos presentes após 7 dias de incubação
1	1	2
	2	0
	3	2
2	1	1
	2	0
	3	1
3	1	3
	2	2
	3	2

5.4. Identificação de fungos degradadores

Como o meio de cultura continha somente agar, todas as colônias são de micro-organismos capazes de biodegradar o amido presente no bioplástico, sendo que esta é a única fonte de carbono presente na placa.

Verificou-se que todas as colônias de fungos presentes nos fragmentos de bioplásticos possuíam capacidade de degradar bioplástico, pois a única fonte de carbono para o crescimento dos fungos foi o amido do bioplástico. Os fungos foram isolados somente dos fragmentos de bioplástico de amido, sendo que nos fragmentos do plástico convencional não foi identificado crescimento micelial para realizar o isolamento dos fungos. Foi realizado o isolamento de 20 micélios de fungos e estes foram conservados em meio de Castellani (1967), e armazenados em câmara fria a $\pm 5^{\circ}\text{C}$.

Nas Figuras 27 e 29 estão apresentados os aspectos morfológicos e as estruturas vegetativas e reprodutivas dos fungos dos gêneros *Mucor* sp. e *Trichoderma* sp. que se desenvolveram nos fragmentos de bioplásticos.

Como pode ser observado na figura 27a, o verso da colônia apresentou uma textura que se assemelha a algodão, colonizando toda a superfície da placa de Petri em 7 dias, não apresentando pigmentação no reverso da colônia (figura 27b), sendo uma característica da classe dos zigomicetos que possui rápida velocidade de

crescimento e suas colônias tendem a ocupar toda a superfície da placa. Na figura 27c, com aumento de 10 x no estereomicroscópio, observou-se as hifas filamentosas com desenvolvimento do corpo de frutificação. Na figura 27d, pode-se observar a germinação e desenvolvimento dos esporos do fungo. Na figura 27e, pode ser observado os esporangióforos fechados e na figura 27f, os esporangióforos estão abertos com liberação de esporos.

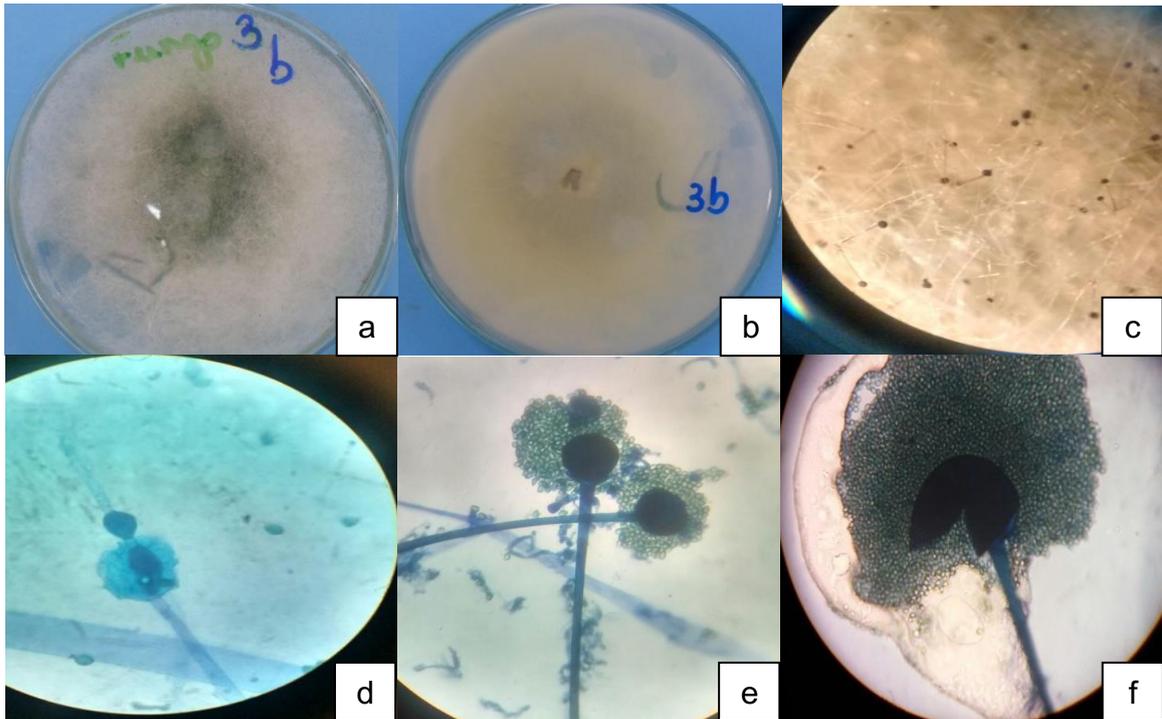


Figura 27. Aspectos morfológicos de *Mucor sp.* Verso algodinoso da colônia (a), reverso da colônia apigmentado (b), hifas filamentosas com corpo de frutificação com aumento de 10x (c), germinação e desenvolvimento de esporo com aumento de 40x (d), esporangióforos fechados com aumento de 40x (e) e esporangióforos abertos com esporos liberados, com aumento de 40x (f).

O gênero melhor representado na figura 28 é o do *Mucor sp.*, que tem papel de destaque, sobretudo na decomposição de esterco e na matéria orgânica fresca e úmida, sendo que, a maioria é saprófita por degradarem preferencialmente moléculas de menor complexidade como açúcar. Segundo Alves, (2002) também encontrou espécies de *Mucor* isoladas a partir de fezes de herbívoros. Segundo Menezes (1993), as espécies do gênero *Mucor sp.* não apresentam rizóides na base dos esporangióforos o que o distingue do gênero *Rhizopus sp.* (figura 28).

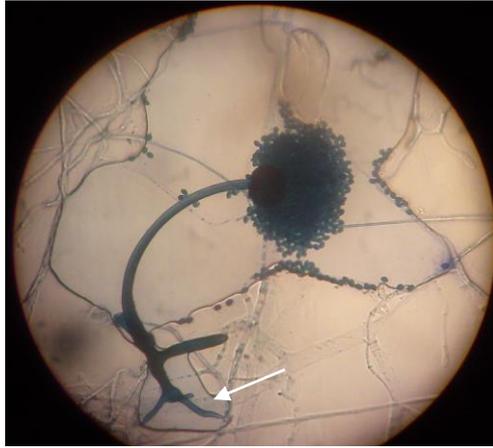


Figura 28. A seta indica ausência de rizóide na base dos esporangióforos de *Mucor* sp com aumento de 40x em microscopia ótica.

Na figura 29 pode ser observado que a colônia apresentou uma coloração com vários tons de verde. As colônias do *Trichoderma* sp. são de rápido crescimento micelial esbranquiçado, e dá origem rapidamente a conidióforos agregados frequentemente, muito ramificados. Os Conidióforos deste gênero são, repetidamente, ramificados, verticilados, muitas vezes dobrados, com alongamentos de hifas estéreis, fiáides em forma de balão, obovóide, em cachos terminais (figura 29e).

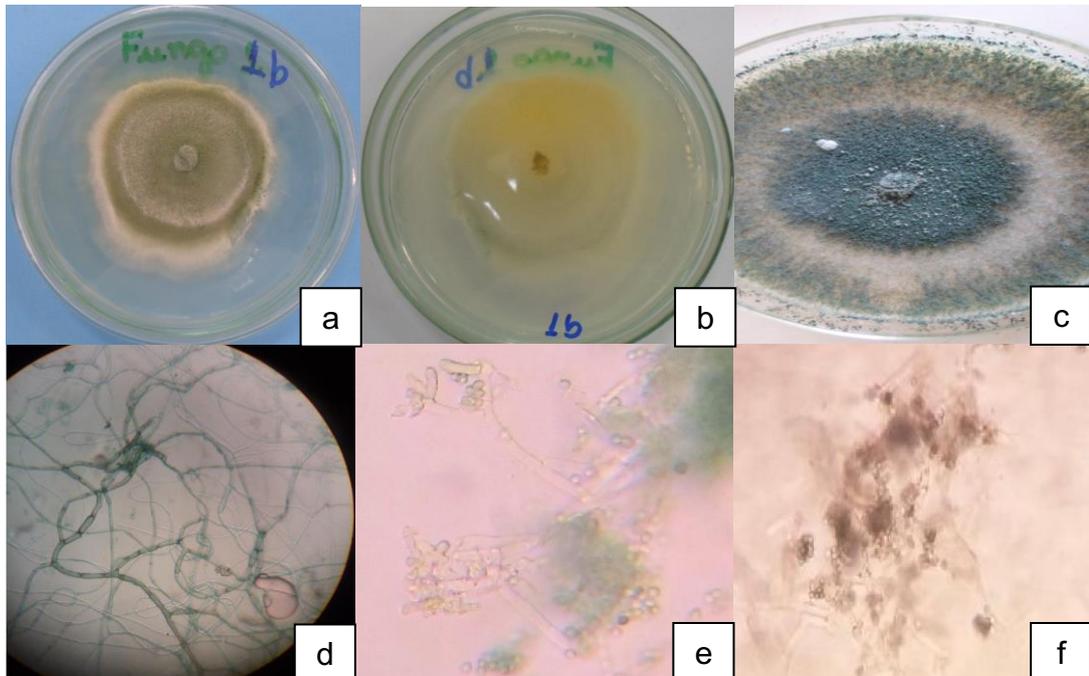


Figura 29. Aspectos morfológicos de *Trichoderma* sp. Verso da colônia com pigmentação (a), Reverso da colônia apigmentado (b), aglomerado de

hifas filamentosas (d), conidióforos com fiáides em grupo (e), conídios esféricos (f).

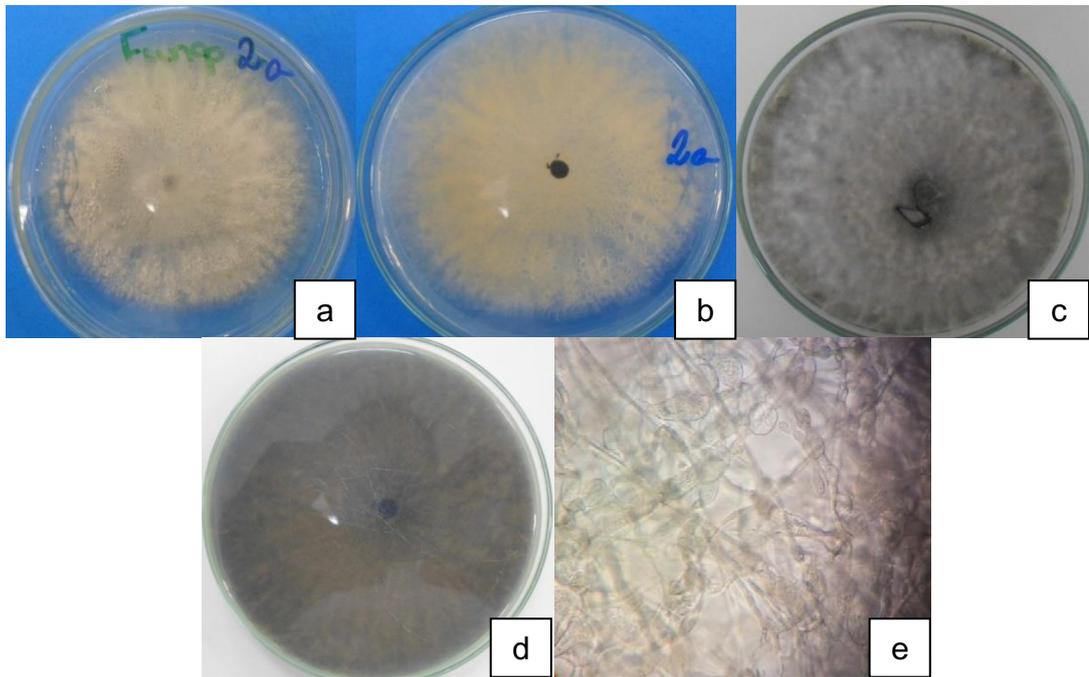


Figura 30. Fungo não identificado isolado de fragmentos de bioplástico de amido.

6. CONCLUSÃO

A biodegradação do bioplástico foi influenciada pela pluviosidade ocorrida no período experimental.

As unidades formadoras de colônias de fungos e bactérias encontradas no solo sob as bolsas de náilon em ensaio de campo evidenciaram um maior número de colônias no solo dos bioplásticos, sendo um indicador da biodegradação dos filmes.

Na biodegradação do bioplástico foi verificada a ocorrência de fungos e os gêneros predominantes que apresentaram crescimento nos fragmentos de bioplástico foram o *Mucor* sp e *Trichoderma* sp;

As emissões médias de C-CO₂ foram influenciadas pelos tipos de tratamento utilizados no solo, sendo o maior valor observado no tratamento com bioplástico de amido.

Os conhecimentos gerados por este estudo podem contribuir para aumentar a segurança do gerador destas matérias e do produtor agrícola usuário desta tecnologia, bem como, auxiliar na disseminação deste produto, que pode aumentar a sustentabilidade da agricultura.

Muitos plásticos são anunciados como biodegradáveis, porém tais afirmações precisam ser avaliadas cuidadosamente. Para um fabricante assegurar a biodegradabilidade, é necessário que o produtor atenda um conjunto de normas especificadas. Até o momento não existe norma brasileira para a avaliação e padronizar a biodegradabilidade de plásticos utilizados para a proteção do solo agrícola sob condições de campo.

Estudos de biodegradação devem ser realizados em diferentes regiões em todo o mundo, sob diferentes condições climáticas e propriedades de solos, onde os filmes biodegradáveis serão potencialmente utilizados.

Devido à rápida decomposição do bioplástico de amido em climas tropicais, é necessário o uso de películas, que incluem agentes de nucleação na fusão de polímeros para melhorar as propriedades mecânicas do plástico.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVES, M.H. 2002. Diversidade e avaliação do potencial biotecnológico quanto à produção de enzimas em isolados de *Mucor* spp. obtidos de fezes de herbívoros, Recife, PE. Tese de Doutorado. Universidade Federal de Pernambuco, Recife.
- AGROBIOFILM, 2010. www.agrobiofilm.eu/pt/bioplasticos (consultado em junho de 2014).
- ASTM (2004) ASTM D6400-04 standard specification for compostable plastics. ASTM International, West Conshohocken.
- BARRAGÁN H.; PELACHO A. M.; CLOSAS L. M. (2010). A Respirometric Test for Assessing the Biodegradability of Mulch Films in the Soil - 28th International Horticultural Congress 2010.
- BASF. - "Production Information Ecoflex F BX 7011". Disponível em: <www.basf.de/ecoflex>. Acesso em: 20 jun 2014.
- BASTIOLI, C.; BELLOTTI, V; GILLI G (1990) The use of agricultural commodities as a source of new plastic materials. Proc. Biodegradable packagings and agricultural films. APRIA Conference. Paris, France, 10–11 May, p.1–36
- BASTIOLI, C. Properties and applications of Mater-Bi Starch-based materials. *Polymer Degradation and Stability*, 59 (1-3): 263-272. 1998.
- BERGLUND, R. (2006). Organic Production of Strawberries - Focus on practical applications. Doctoral thesis. Swedish University of Agricultural Sciences.
- BILLINGHAM N., CHIELLINI E., CORTI A., BACIU R. & WILLES, D. M., 2003, Environmentally degradable plastics based on oxo-biodegradation of conventional polyolefins. In: *Biodegradable Polymers and Plastics*. Kluwer/Plenum Academic. ISBN 9780306478840.
- BONHOMME, S.; CUER, A.; DELORT, A.M.; LEMAIRE, J.; SANCELME, M; SCOTT, G.. Environmental biodegradation of polyethylene. *Polymer Degradation and Stability* 81: 441–452. 2003

- BRIASSOULIS, D. Mechanical behaviour of biodegradable agricultural films under real field conditions. *Polymer Degradation and Stability* 91: 1256 – 1272. 2006.
- BROOKES, P.C.; MCGRATH, S.P. Effects of metal toxicity on the size of the soil microbial biomass. *Journal of Soil Science*, v.35, p.341-346, 1984.
- CARVALHO, L.; OLIVEIRA, M.; DUARTE, E. A cultura outonal do morangueiro com plástico biodegradável-resultados do primeiro ano de monitorização no âmbito do projeto “AGROBIOFILM”. IV Colóquio Nacional da Produção de Pequenos Frutos, *Actas Portuguesas de Horticultura*, n 20, 85-93, 2012.
- CASTELLANI, A. A Maintenance and cultivation of the common pathogenic fungi of man in sterile distilled water: futher researches. *Journal of Tropical Medicine & Hygiene, Mclean*, v. 70, p. 1881-184, 1967.
- CHANDRA, R.; RUSTGI, R. Biodegradable polymers. *Progress in Polymer Science*, v. 23, p. 1273-1335, 1998.
- CHU, C. e MATHEWS, D. Photodegradable plastic mulch in central New York. *HortScience* 19:497–498.1984
- COPABLA, 2012. COMITÊ BRASILEIRO DE DESENVOLVIMENTO E APLICAÇÃO DE PLÁSTICOS NA AGRICULTURA. www.copabla.com.br consultado junho de 2014.
- COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO – CONAB. Acompanhamento da safra brasileira de cana-de-açúcar, v. 2 – Safra 2015/16, n. 1 - Primeiro Levantamento, Brasília, abr. 2015.
- CORBIN, A. Using Biodegradable Plastics as Agricultural Mulches Washington State University Extension, p. 4, 2013.
- CORDEIRO, T. (2011) Influência dos plásticos biodegradáveis na produtividade, precocidade e qualidade do melão “Lusitano” (*Cucumis melo* var. *inodorus*). Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Engenharia Agrônômica.
- COSCIONE, A.R.; ANDRADE, C.A. Protocolos para avaliação da dinâmica de resíduos orgânicos no solo. In: ANDRADE, J. C.; ABREU, M. F. Análise

Química de Resíduos Sólidos para Monitoramento e Estudos Agroambientais. Campinas: Instituto Agrônomo, p.159-177, 2006.

DIANESE, J. C. Patologia vegetal: agressão e defesa em sistemas planta-patógeno. Brasília: Editora Universidade de Brasília, 1990.

DICK, R.P. Soil enzyme assays as indicators of soil quality. In: Doran, J.W.; Coleman, D.C.; Bezdicek, D.F.; Stewart, B.A. (Eds.), *Defining Soil Quality for a Sustainable Environment*, Soil Sci. Soc. Am. Special Publication n.35. Soil Science Society of America, Madison, WI, p. 107-124, 1994.

ELSAS, J.D.VAN; TREVORS, J.T.; WELLINGTON, E.M.H. *Modern soil microbiology*. Marcel Dekker, New York. 1997. 682p.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUARIA - EMBRAPA. Manual de métodos e análise de solo. Rio de Janeiro: Centro Nacional de Pesquisas de Solos, 1997, 212p. (EMBRAPA - CNPS. Documento, 1).

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUARIA - EMBRAPA. 1999. Sistema brasileiro de classificação de solos. Centro Nacional de Pesquisa de Solos: Rio de Janeiro, 412p.

EUROPEAN BIOPLASTICS. Disponível em: www.european-bioplastics.org. Consultado em outubro de 2015.

FERNANDES, S.A.P. Propriedades do solo na conversão de floresta em pastagem fertilizada e não fertilizada com fósforo na Amazônia (Rondônia). Piracicaba, 1999, 131p. (Doutorado – Centro de Energia Nuclear na Agricultura-USP).

GARNAUD, J.C. The intensification of horticultural crop production in the mediterranean basin by protected cultivation. ROME: FAO, 1974. 148p.

GARTHE, J.W. AND P.D. KOWAL. 1993. *Recycling used agricultural plastics*. Penn State Fact Sheet C-8. <http://pubs.cas.psu.edu/freepubs/pdfs/C8.pdf>. Maio de 2014.

GOTO R. Plasticultura nos trópicos: uma avaliação técnico-econômica. *Horticultura Brasileira* 15: 163-65, Suplemento. 1997.

- GRACI, A.; LUCIANO, A.; ZARAGOZA, C. L.; AIBAR, J. L. 2008. Evaluación de alternativas al uso del polietileno como cubierta del suelo para el manejo de malas hierbas y otros aspectos agronómicos en el cultivo del tomate. "Tesis Doctoral". Universidad de Zaragoza.
- GRIFFIN, D. H. Fungal physiology. [S.l.]: John Willey & Sons Incorporation, 1994. 458 p.
- INSTITUTO DE PESQUISA ECONÔMICA APLICADA – IPEA. Relatório de pesquisa sobre pagamento por serviços ambientais urbanos para gestão de resíduos sólidos, 2010.
- JAHNEL, M.C. Método de plaqueamento por gotas e outros parâmetros microbiológicos na avaliação da degradação de lodo ativado de curtume em solos. Piracicaba. 1997. 79p. Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo. (Tese, Doutorado).
- JAHNEL, M. C.; CARDOSO, E. J. B. N.; DIAS, C. T. S. Determinação do número mais provável de microrganismos do solo pelo método de plaqueamento por gotas. Revista Brasileira de Ciência do Solo, Viçosa, MG, v. 23, n. 3, p. 553-559, 1999.
- JENKINSON, D.S.; POWLSON, D.S. The effects of biocidal treatments on metabolism in soil. A method for measuring soil biomass. Soil Biology Biochemistry, v.8, p.209-213, 1976.
- JOUE'T JP. Plastics in the world, *Plasticulture*, v. 120, p. 108 e 26, 2001.
- KASIRAJAN, S.; NGOUJIO, M, Polyethylene and biodegradable mulches for agricultural applications: a review. *Agronomy for Sustainable Development*, v.32, p. 501-529, 2012.
- KHOO, H.H., TAN, B.H.T., CHNG, K.W.L. Environmental impacts of conventional plastic and bio-based carrier bags. *International journal of Life Cycle Assessment*, v. 15, p. 284-293, 2010.

- KYRIKOU, I.; BRIASSOULIS, D. Biodegradation of Agricultural Plastic Films: A Critical Review. *Journal Polymer Environment*, v 15, 125-150. 2007.
- KÖPPEN, W. *Climatologia: con un estudio de los climas de la tierra*. Cidade do México: Fondo de Cultura Econômica, 1948. 479 p.
- LAMONT, W. J. Plastic mulches for the production of vegetable crops. *HortTechnology*, v 3, 35-39. 1993.
- LIAKATAS, A.; CLARK, J. A.; MONTEITH, J. L. Measurements of the heat balance under plastic mulches. Parte 1. Radiation balance and soil heat flux. *Agricultural Forestry Meteorology*, v.36, n 3, 227-239 p. 1986.
- LÓPEZ, J.; GONZÁLEZ, A.; FERNÁNDEZ, J. A.; BAÑÓN, S. Behaviour of biodegradable films used for mulching in melon cultivation. *Acta Horticulturae* , 747: 125-130. 2007.
- MARTÍN-CLOSAS, L.; BACH, M. A.; PELACHO, A. M. Biodegradable mulching in an organic tomato production system. *Acta Horticulturae*, 767: 267-274. 2008.
- MARTÍN-CLOSAS, L.; PELACHO, A. M. (2011) Agronomic Potential of Biopolymer Films ch3. In: Plackett, D. (ed), *Biopolymers - New Materials for Sustainable Films and Coatings*, John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, UK. (doi: 10.1002/9781119994312).
- MENEZES, M.; OLIVEIRA, S. M. *Fungos Fitopatogênicos*. Recife, PE: UFRPE. p. 227, 1993.
- MENEZES, M.; SILVA, D.M.W. *Guia prático para isolamentos de fungo fitopatogênicos*. Recife, PE: UFRPE, 120p. 1997.
- MILES, C., R. WALLACE, A. WSZELAKI, J. MARTIN, J. COWAN, T. WALTERS, AND D. INGLIS. 2012. *Durability of potentially biodegradable alternatives to plastic mulch in three tomato production regions*. *HortScience* 47(9):1270-1277.
- MINUTO, G.; PISI, L.; TINIVELLA, F.; BRUZZONE, C.; GUERRINI, S.; VERSARI, M. Weed control with biodegradable mulch in vegetable crops. *Acta Horticulturae* , 801: 291-298. 2008.

- MIRSHEKARI, B.; RAJABLARIJANI H. R.; ALIKHANI, M.A.; FARAHVASH F.; RASHID, V. Evaluation of biodegradable and polyethylene mulches in sweet corn production. *International Journal of Agriculture and Crop Sciences*, v.20, n 20, 1540-1545, 2012.
- MORENO, M. M.; MORENO, A. Effect of different biodegradable and polyethylene mulches on soil properties and production in a tomato crop. *Scientia Horticulturae*, 116: 256-263. 2008.
- NESMITH, D.S.; RAYMER, P.L.; RAO, M.S.S.; BRIDGES, D.C. A durable lightweight structure for conducting field shading experiments. *HortScience*, v. 27, n 12, p.1274-1275, 1992.
- NEVES, M. F.; CONEJERO, M. A. Estratégias para a cana no Brasil: Um Negócio Classe Mundial. 1 ed. São Paulo: Editora Atlas, 2009.
- NGOUAJIO, M.; AURAS, R.; FERNANDEZ, T. Field Performance of Aliphatic-aromatic Copolyester Biodegradable Mulch Films in a Fresh Market Tomato Production System. *HortTechnology*, 18(4): 605-610. 2008.
- NWUFO, M. I.; FAJOLA, A. O. Production of amylolytic enzymes in culture by *Botryodiplodia theobromae* and *Sclerotium rolfsii* associated with the corn rots of *Colocasia esculenta*. *Acta Microbiologica Hungarica*, v. 35, p. 371-378, 1988.
- OLSEN, J. K.; GOUNDER, R. K. Alternatives to polyethylene mulch film - a field assessment of transported materials in capsicum (*Capsicum annum* L.). *Australian Journal of Experimental Agriculture*, 41: 93-103. 2001.
- OTEY, F. e WESTOFF, R. (1980) Biodegradable starch-based plastic films for agricultural application. Proc. 15th Natl. Agriculture Plastics Congress.
- PAJARI, B. Soil respiration in a poor upland site of scots pine stand subjected to elevated temperatures and atmospheric carbon concentration. *Plant Soil*, 168-169:563-570, 1995.
- PANDEY, A. et al. *Enzyme Technology*. 1. ed. New Delhi: Asiatech Publishers, 2005.

- QUEZADA, R. R M.; MUNGUIA, J.; IBARRA, L.; CEDENO, B. Differences in the degradation of padded photodegradable films, caused by the management of melon cultivation (*Cucumis melo* L.). *Phyton, Intl J Exp Bot* 72:135–142. 2003
- Relatório Técnico Parcial (Projeto AGRISUS:1351/14), disponível em: <http://hdl.handle.net/10400.5/8415>. Consultado em outubro de 2015.
- RODELLA, A. A.; SABOYA, L. V. Calibration for conductimetric determination of carbon dioxide. *Soil Biology and Biochemistry*, v.31, p.2059-2060, 1999.
- SAMUEL, G. J. *Trichoderma*: A review of biology and systematic of the genus. *Journal Of Mycology, Columbus*, v. 100, p. 923-935, 1996.
- SARAIVA, A.; COSTA, R.; CARVALHO, L.; DUARTE, E. The use of biodegradable mulch films in muskmelon crop production. *Basic Research Journal of Agriculture Science and Review*, v. 14, 88-95p. 2012.
- SCARASCIA-MUGNOZZA G., SICA C. & RUSSO G., 2011, Plastic Materials in European Agriculture: actual use and perspectives. *J. of Ag. Eng. - Riv. di Ing. Agr.*, 3, 15:28
- SCHETTINI, E.; VOX, G.; LUCIA, B. D. Effects of the radiometric properties of innovative biodegradable mulching materials on snapdragon cultivation. *Scientia Horticulturae* , 112: 456-461.2007.
- SCOTT, G. 'Green' polymers. *Polymer Degradation and Stability*. V.68, n.1, 2000.
- SGANZERLA E. 1991. Nova Agricultura: A fascinante arte de cultivar com os plásticos. 4 ed., Porto Alegre: Plasticultura Gaúcha, 303p.
- SHEN, L., HAUFE, J., PATEL, M. K. Product overview and market projection of emerging bio-based plastics - PRO-BIP 2009 Final report.
- SHOGREN, R.L. AND HOCHMUTH, R.C., 2004. Field evaluation of watermelon grown on paper-polymerized vegetable oil mulches. *HortScience* 39:1588-1591.
- SIVAN, A. (2011) New perspectives in plastic biodegradation, *Current Opinion in Biotechnology*, 22:422–426

- SOFTWARE STATISTICAL ANALYSIS SYSTEM – SAS. Procedures guides. Version 6. Cary [EstadosUnidos]: SAS by SAS INSTITUTE –Inc. Cary, NC, USA. 2002/2003.
- SPICE, H.R. Polythene film in horticulture. London, Faber and Faber, 1959. 176p.
- STOTZKY, G. Microbial respiration. In: BLACK, C.A., ed. Methods of soil analysis. Madison, American Society of Agronomy, 1965. v.2. p.1550-1570.
- THE PLASTICS PORTAL (2012). www.plasticseurope.org consultado em junho 2014.
- VALENZUELA, P. e GUTIÉRREZ, H. (1999) Acolchado de suelo mediante filmes de polietileno. El Agroeconomico, Mayo. Fundación Chile.
- WANG, YZ.; YANG, K.K.; WANG, X.L.; ZHOU, Q.; ZHENG, C.Y; CHEN, Z.F. Agricultural application and environmental degradation of photobiodegradable polyethylenemulching films. Journal Polymerer Environmental 12:7–10. 2004.