UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Faculdade de Engenharia Química

PATRÍCIA MORAES SINOHARA SOUZA

ESTUDO DE FILMES DE PBAT PARA COBERTURA DE SOLO (MULCHING): FOTODEGRADAÇÃO, BIODEGRADAÇÃO E EFEITOS ECOTOXICOLÓGICOS

Campinas
2019

PATRÍCIA MORAES SINOHARA SOUZA

ESTUDO DE FILMES DE PBAT PARA COBERTURA DE SOLO (MULCHING): FOTODEGRADAÇÃO, BIODEGRADAÇÃO E EFEITOS ECOTOXICOLÓGICOS

Tese apresentada à Faculdade de Engenharia Química da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para obtenção do título de Doutora em Engenharia Química.

Orientadora: Profa. Dra. Ana Rita Morales

Coorientadora: Profa. Dra. Maria Aparecida Marin-Morales

ESTE TRABALHO CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA TESE DEFENDIDA PELA ALUNA PATRÍCIA MORAES SINOHARA SOUZA, ORIENTADA PELA PROFª. DRª. ANA RITA MORALES

Campinas

2019

Agência de fomento e nº dos processos: FAPESP, 16/10777-0, 16/11199-0 e 17/06103-7.

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Área de Engenharia e Arquitetura
Rose Meire da Silva - CRB 8/5974

So89e

Souza, Patrícia Moraes Sinohara, 1988-
Estudo de filmes de PBAT para cobertura de solo (mulching): fotodegradação, biodegradação e efeitos ecotoxicológicos / Patrícia Moraes Sinohara Souza. – Campinas, SP : [s.n.], 2019.

Orientador: Ana Rita Morales.
Coorientador: Maria Aparecida Marin-Morales.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química.

1. Filmes biodegradáveis. 2. Fotodegradação. 3. Biodegradação. 4. Ecotoxicidade. I. Morales, Ana Rita, 1958-. II. Marin-Morales, Maria Aparecida, 1958-. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia Química. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Study of PBAT films for soil covering (mulching) : photodegradation, biodegradation and ecotoxicological impacts
Palavras-chave em inglês:
Biodegradable films
Photodegradation
Biodegradation
Ecotoxicity
Área de concentração: Engenharia Química
Titulação: Doutora em Engenharia Química
Banca examinadora:
Ana Rita Morales [Orientador]
Silvia Pierre Irazusta
Matheus Mantuanelli Roberto
Guilhermino José Macedo Fechine
Elisabete Maria Saraiva Sanchez
Data de defesa: 23-07-2019
Programa de Pós-Graduação: Engenharia Química

Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a)
- ORCID do autor: 0000-0001-9588-3632
- Currículo Lattes do autor: http://lattes.cnpq.br/9647481897872389

Tese de doutorado defendida por Patrícia Moraes Sinohara Souza e aprovada em 23 de julho de 2019 pela banca examinadora constituída pelos doutores:

Profa. Dra. Ana Rita Morales-Presidente
Faculdade de Engenharia Química-UNICAMP

Dr. Guilhermino José Macedo Fechine
Sem vínculo com IES

Dra. Silvia Pierre Irazusta
FATEC-Sorocaba

Dra. Elisabete Maria Saraiva Sanchez
Professora aposentada

Dr. Matheus Mantuanelli Roberto
UNIARARAS

A ata da defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no SIGA/Sistema de Fluxo de Tese e na Secretaria do Programa na Unidade.

Dedico este trabalho
ao meu namorado Charles,
aos meus pais Julio e Fátima,
aos meus irmãos Igor e Juliana,
às minhas avós Tocico e Ana.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à minha orientadora, Profa. Dra. Ana Rita Morales por acreditar neste trabalho e por toda a dedicação em ajudar em cada uma das etapas do doutorado, sempre me incentivando e abrindo portas neste processo contínuo de aprendizado. Agradeço muito pela confiança, respeito e amizade nos últimos anos. Tenho sorte em conviver com essa pessoa tão inspiradora pela sua postura e valores. Muito obrigada também por me acolher tão bem desde o mestrado.

À minha coorientadora, Profa. Dra. Maria Aparecida Marin-Morales, agradeço pelos ensinamentos, confiança, amizade e por criar todas as condições favoráveis para a realização dos bioensaios. Agradeço também por todo seu empenho em sempre manter uma atmosfera tão acolhedora em seu grupo de pesquisa. É muito gratificante e motivador trabalhar em um ambiente como este. Além de todo aprendizado, guardo com carinho tantos momentos de alegria que vivenciei na UNESP-Rio Claro.

À Lais Roberta Deroldo Sommaggio, querida dupla, sou grata pela amizade e pelo grande aprendizado que me proporcionou em cada etapa, desde o planejamento e elaboração dos nossos cronogramas, passando pela execução dos experimentos até as discussões sobre os resultados. Não importava se era final de semana ou feriado, você sempre esteve comigo. Muito obrigada por compartilhar seu conhecimento e por ter sido tão atenciosa. Gratidão!

À Profa. Lucia Mei pela disponibilidade do Laboratório de Processamento de Polímeros e ajuda para o preparo das amostras empregadas neste projeto.

Ao Felipe Mourão Coelho, agradeço por toda dedicação durante sua iniciação científica. Muito obrigada!

À FAPESP, pelo apoio financeiro (Processos 16/10777-0, 16/11199-0 e 17/06103-7.

Agradeço às empresas BASF, CABOT e AD&PG, pela doação do PBAT e aditivos.

À Profa. Elisabete Maria Saraiva Sanchez, agradeço por toda ajuda para a realização dos ensaios de tração e envelhecimento, pela amizade e pela gentileza em sempre nos ajudar.

À amiga Mayara Pollyane, pelo apoio e por fazer os dias terem mais leveza e alegria.

Agradeço à Adriana, Nádia, Matheus, Márcia, Letícia Rocha, Letícia Gonçalves, Letícia Gigek, Dânia, Franco, Gabriel, Rodrigo, Raquel, Cleiton, Jaqueline, Samara, Mileni, Michele, Maria Tereza, Raquel Hara, Paula, Marina, Ingrid, Ivanei, Renato, Carol, Lucas Dognani, Lucas Patero (*in memorian*), Andreia Cattini (*in memorian*), Fernando, Professores Ângela, Leonardo e Everson, pessoas queridas que encontrei pelo caminho. Todos vocês já me ajudaram de alguma forma. Muito obrigada!

Aos meus pais e parceiros Julio e Fátima, irmãos Igor e Juliana e avós Tocico e Ana, por todo apoio e carinho. Ao amado Charles, fonte de paz e alegria.

RESUMO

O polímero poli(adipato-co-tereftalato de butileno) (PBAT) é um dos principais materiais propostos para aplicação como filme *mulch* biodegradável. Todavia, sua alta susceptibilidade à fotodegradação pela exposição à radiação solar compromete sua eficiência. No presente estudo, filmes do PBAT com o aditivo absorvedor de radiação ultravioleta (UV), negro de fumo, em combinação com diferentes estabilizadores à radiação UV foram avaliados quanto à sua eficiência para a fotoestabilização do polímero. Por meio de planejamentos experimentais foi possível determinar duas formulações mais eficientes para cada combinação de aditivos testada, sendo uma com negro de fumo e estabilizador de amina estericamente impedida (HALS) e outra com negro de fumo e o estabilizador fenólico vitamina E. Para esta seleção, foram avaliadas propriedades mecânicas, transmissão de luz, distribuição de massa molar e teor de gel, antes e após ensaio de envelhecimento acelerado. A combinação de negro de fumo e HALS se mostrou mais eficiente para minimizar a cisão de cadeia do PBAT, o que pode ser atribuído ao modo de ação do estabilizador. As amostras selecionadas e o PBAT puro, após envelhecimento, foram caracterizadas quanto à desintegração e biodegradação em solo, para avaliar a influência dos diferentes níveis de fotodegradação sofridos por essas amostras sobre estes processos. Observou-se que as formulações com menor massa molar e menor teor de gel apresentaram maiores taxas de desintegração e biodegradação. Todavia, ao longo do ensaio de respirometria as diferenças de porcentagem de mineralização entre as formulações se tornaram mais sutis, o que sugere o aumento da fração de unidades aromáticas na estrutura polimérica das amostras. Considerando a incorporação no solo como a principal proposta de destinação final para filmes *mulch* biodegradáveis, também foram realizados ensaios ecotoxicológicos com amostras de solubilizados de solo preparados em dois períodos de avaliação, antes e após a fotodegradação e biodegradação dos filmes de PBAT com e sem aditivos. Pelo bioensaio com o organismo *Lactuca sativa* foi constatada ausência de efeitos fitotóxicos. O bioensaio com organismo teste *Allium cepa* revelou ausência de citotoxicidade, genotoxicidade e mutagenicidade. Por fim, a ausência de efeitos genotóxicos também foi verificada pelo bioensaio com a linhagem celular humana HepG2/C3A. Os resultados obtidos no presente estudo confirmam o potencial do uso de PBAT com os aditivos estudados para uso como filmes *mulch.*

ABSTRACT

Poly (butylene adipate-co-terephthalate)-PBAT is one of the main polymeric materials proposed for application as a biodegradable mulch film. However, its high susceptibility to photodegradation by exposure to solar radiation compromises its efficiency. In the present study, PBAT films with carbon black absorber additive in combination with different stabilizers to ultraviolet radiation were evaluated for their efficiency for polymer stabilization. In this study, by using experimental designs, it was possible to determine two formulations that were considered the most efficient. One of them was prepared with carbon black and hindered amine light stabilizer (HALS) and the other prepared with carbon black and phenolic stabilizer vitamin E. This selection was based on analysis of mechanical properties, light transmission, molar mass distribution and gel content, before and after accelerated aging. The combination of carbon black and HALS was more efficient to minimize the PBAT chain scission, which can be attributed to the stabilizer mode of action. The selected samples and pure PBAT, after aging, were characterized in relation to disintegration and biodegradation in soil, aiming to evaluate the influence of the different levels of photodegradation suffered by samples on these processes. It was observed that formulations with lower molar mass and lower gel content presented higher disintegration and biodegradation rates. On the other hand, during the respirometric test, the differences in the mineralization degree among the samples became subtler. This behavior suggests an increasing in fraction of aromatic units for the samples polymeric structure. Considering incorporation in soil as the main purpose for destination of biodegradable mulch films, ecotoxicological tests with aqueous extract of soil and PBAT films were conducted after two monitoring periods - before and after photodegradation and biodegradation. Considering the bioassay with the organism *Lactuca sativa*, it was found absence of phytotoxic effects. The bioassay using the organism *Allium cepa* revealed absence of cytotoxicity, genotoxicity and mutagenicity. Finally, absence of genotoxic effects was also verified by the bioassay using a human cell culture HepG2/C3A. The results obtained in the present study confirm potential of the studied PBAT formulations with additives for mulch film application.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Filme *mulch* aplicado em cultura de morango.....22
Figura 2 - Estrutura do poli(adipato-co-tereftalato de butileno) – PBAT. 24
Figura 3 - Mecanismos de cisão de cadeia por fotodegradação: Norrish I e Norrish II. 26
Figura 4 – Estrutura estável possivelmente formada a partir de radicais livres na região aromática do PBAT. 26
Figura 5 - Estrutura química do Chimassorb 944®. 28
Figura 6 - Estrutura química do Tinuvin 622®. 28
Figura 7 - Mecanismo de ação de estabilizadores tipo HALS. 29
Figura 8 - Ação do antioxidante da vitamina E. 29
Figura 9 - Estrutura do negro de fumo. 30
Figura 10 - Microestrutura do negro de fumo. 31
Figura 11 - Imagens de microscopia eletrônica de transmissão de negro de fumo de alta estrutura e de baixa estrutura. 31
Figura 12 - Degradação de filmes *mulch* de PBAT em campo. 32
Figura 13 - Mecanismo proposto para degradação hidrolítica do PBAT. 33
Figura 14 - Esquema da raiz de *L. sativa*, mostrando as regiões do hipocótilo e da radícula. 39
Figura 15 - A) Metáfase normal; A1) Metáfase com aderência cromossômica; A2) Metáfase poliplóide (material amplificado); A3) C-metáfase; B) Anáfase normal; B1) Anáfase com ponte cromossômica; B2) Anáfase com perda cromossômica; B3) Anáfase com perda e ponte cromossômica; C) Telófase normal; C1) Telófase com ponte cromossômica; C2) Telófase com perda cromossômica; C3) Telófase multipolar com pontes cromossômica e aderência; D) Célula interfásica normal; D1) Célula com núcleo lobulado; D2) Célula binucleada; D3) célula trinucleada. 41
Figura 16 - Migração do DNA no ensaio cometa. 42
Figura 17 - Principais destinos de micronúcleos. 44
Figura 18 – Micrografia do negro de fumo BP 460. 46
Figura 19 - Simulador ambiental empregado no teste de envelhecimento acelerado. 49
Figura 20 - Fluxograma referente à primeira etapa do projeto de pesquisa. 53
Figura 21 - Fluxograma referente à segunda etapa do projeto de pesquisa. 54
Figura 22 - Recipientes de vidro empregados para o ensaio de biodegradação. 57
Figura 23 - Recipiente empregado para ensaio de desintegração. 59
Figura 24 - Agitação mecânica para preparo de amostra de solubilizado. 62
Figura 25 – Paquímetro usado para as medições de radícula em raiz de alface. 62
Figura 26 - Raízes de cebola após germinação em incubação. 64
Figura 27 - Raízes de cebola, após coloração de Feulgen em reativo de Schiff. 65
Figura 28 - Esquema da placa utilizada no ensaio do MTT. CP: controle positivo; B: branco; CN: controle negativo; concentrações das amostras dos solubilizados SOLO e PBAT: [1] - 100 µl/ml, [2] - 250 µL/mL, [3] -500 µL/mL, [4] - 750 µL/mL e [5] - 1000 µL/ml de meio de cultura. 68
Figura 29 - Esquema da placa utilizada no ensaio do MTT. CP: controle positivo; B: branco; CN: controle negativo; concentrações das amostras dos solubilizados NF1.5T1.5 e NF1.5V1.5: [1] - 100 µl/ml, [2] - 250 µL/mL, [3] -500 µL/mL, [4] - 750 µL/mL e [5] - 1000 µL/ml de meio de cultura. 69
Figura 30 – Placa de 96 poços, após adição de DMSO. 70
Figura 31 - Cuba de eletroforese empregada no ensaio do cometa. 72
Figura 32 – Esquematização do ensaio do cometa. 73
Figura 33 - Esquema do ensaio de micronúcleo. 76
Figura 34 - Distribuição de massa molar de amostras de PBAT puro. 78
Figura 35 - Curvas CSDF das amostras PBATUVA e PBATUVA9. 79
Figura 36 - Gráfico de Pareto de Mn para amostras naturais de PBAT com os aditivos negro de fumo e HALS. 81
Figura 37 - Gráfico de Pareto de Mn para amostras envelhecidas de PBAT com os aditivos negro de fumo e HALS. 82
Figura 38 - Gráfico de Pareto de Mn para amostras naturais de PBAT com os aditivos negro de fumo e vitamina E. 83

Figura 39- Gráfico de Pareto de Mn para amostras naturais de PBAT com os aditivos negro de fumo e vitamina E. 84
Figura 40 - Gráfico de Pareto da polidispersidade de amostras naturais de PBAT com aditivos negro de fumo e HALS. 85
Figura 41 - Gráfico de Pareto da polidispersidade de amostras envelhecidas de PBAT com os aditivos negro de fumo e HALS. 86
Figura 42 - Curvas CSDF de filmes de PBAT com negro de fumo e HALS. 87
Figura 43 - Gráfico de Pareto da polidispersidade de amostras naturais de PBAT com os aditivos negro de fumo e vitamina E. 88
Figura 44 - Gráfico de Pareto da polidispersidade de amostras envelhecidas de PBAT com os aditivos negro de fumo e Vitamina E. 89
Figura 45 - Curvas CSDF de filmes de PBAT com negro de fumo e Vitamina E. 90
Figura 46 - Variação do teor de gel de PBAT puro durante o ensaio de envelhecimento acelerado. 92
Figura 47 - Imagem de estruturas de gel da amostra NF1.5T1.5UVA em solução. 94
Figura 48 - Imagem de estruturas de gel da amostra NF1.5T1.5UVA após secagem da solução. 94
Figura 49 - Imagem de estruturas de gel da amostra NF1.5V1.5UVA em solução. 95
Figura 50 - Imagens de estrutura de gel da amostra NF1.5V1.5UVA após secagem da solução. 95
Figura 51 - Gráfico de Pareto do teor de gel de amostras envelhecidas de PBAT com os aditivos negro de fumo e HALS. 96
Figura 52 - Gráfico de Pareto do teor de gel de amostras envelhecidas de PBAT com os aditivos negro de fumo e vitamina E. 97
Figura 53 - Influência de estabilizadores fenólicos e HALS sobre propriedades mecânicas no processo de fotoestabilização. 101
Figura 54 - Gráfico de Pareto do Módulo de Young de amostras naturais de PBAT com os aditivos negro de fumo e HALS. 101
Figura 55 - Gráfico de Pareto do módulo de Young de amostras envelhecidas de PBAT com os aditivos negro de fumo e HALS. 102
Figura 56 - Gráfico de Pareto do Módulo de Young de amostras naturais de PBAT com os aditivos negro de fumo e Vitamina E. 103
Figura 57 - Gráfico de Pareto do Módulo de Young de amostras envelhecidas de PBAT com os aditivos negro de fumo e Vitamina E. 104
Figura 58 - Gráfico de Pareto do alongamento de amostras naturais de PBAT com os aditivos negro de fumo e HALS. 105
Figura 59 - Gráfico de Pareto do alongamento de amostras envelhecidas de PBAT com os aditivos negro de fumo e HALS. 106
Figura 60 - Gráfico de Pareto do alongamento de amostras naturais de PBAT com os aditivos negro de fumo e Vitamina E. 107
Figura 61 - Gráfico de Pareto do alongamento de amostras envelhecidas de PBAT com os aditivos negro de fumo e vitamina E. 109
Figura 62 - Gráfico de Pareto da resistência à tração de amostras naturais de PBAT com os aditivos negro de fumo e HALS. 110
Figura 63 - Gráfico de Pareto da resistência à tração de amostras envelhecidas de PBAT com os aditivos negro de fumo e HALS. 111
Figura 64 - Gráfico de Pareto da resistência à tração de amostras naturais de PBAT com os aditivos negro de fumo e vitamina E. 112
Figura 65 - Gráfico de Pareto da resistência à tração de amostras envelhecidas de PBAT com os aditivos negro de fumo e Vitamina E. 113
Figura 66 - Módulo de Young, antes e após envelhecimento, para amostras selecionadas e PBAT puro. 114
Figura 67 - Alongamento, antes e após envelhecimento, para amostras selecionadas e PBAT puro. 115
Figura 68 - Resistência à tração, antes e após envelhecimento, para amostras selecionadas e PBAT puro. 115
Figura 69 - Gráfico de Pareto da transmissão de luz de amostras naturais de PBAT com os aditivos negro de fumo e HALS. 118

Figura 70 - Gráfico de Pareto da transmissão de luz de amostras envelhecidas de PBAT com os aditivos negro de fumo e HALS.....119
Figura 71 - Gráfico de Pareto da transmissão de luz de amostras naturais de PBAT com os aditivos negro de fumo e Vitamina E.....120
Figura 72 - Gráfico de Pareto da transmissão de luz amostras envelhecidas de PBAT com os aditivos negro de fumo e Vitamina E.....121
Figura 73 - Curvas de mineralização: a) da celulose; b) amostras envelhecidas de PBAT puro e com aditivos. 123
Figura 74 - Identificação das principais bandas em espectro do PBAT puro natural. Em destaque bandas utilizadas para o cálculo de índice de carbonila: b - estiramento do C=O em ligação éster (AL-ITRY; LAMNAWAR; MAAZOUZA, 2012); i - deformação angular dentro do plano do =C-H no anel de benzeno (CAI; JUNGANG; FENG., 2013).....125
Figura 75 - Amostras de PBAT, com e sem aditivos naturais, envelhecidas e degradadas em solo por 15 dias, 4 meses, 8 meses e 12 meses.....128
Figura 76 - Micrografias de SEM das amostras naturais, envelhecidas e degradadas em solo por 15 dias, 4, 8 e 12 meses.....129
Figura 77 - Cavidades (indicadas por setas) em região com esferulitos da amostra NF1.5T1.5UVA.130
Figura 78 - Micrografias da amostra NF1.5T1.5UVA_solo12m: a) 1000 x; b) 5000 x; c) 15000 x. ..131
Figura 79 - Fator de degradação (k) para amostras de PBAT com aditivos.....132
Figura 80 - Resultados de mineralização para amostras de NF1.5T1.5UVA e NF1.5V1.5UVA. 134
Figura 81 - Distribuição de massa molar para amostras de PBAT com aditivos envelhecidas, após 4 meses de degradação em solo.....135
Figura 82 - Curva de DSC: primeiro aquecimento da amostra PBATNAT.....136
Figura 83 - Curva de DSC: resfriamento da amostra PBATNAT.....136
Figura 84 - Regiões da curva de DSC para a amostra PBATNAT no segundo aquecimento: A) região da Tg; B) região da Tm. 137
Figura 85 – Variação do grau de cristalinidade para o PBAT e amostras com aditivos. 138
Figura 86 – Resultados de germinação de sementes de *Lactuca sativa* para amostras de solubilizado.*Estatisticamente significativo em relação ao CN (Kruskal-Wallis; p<0,05; comparações múltiplas pelo teste de Dunn). 140
Figura 87 - Resultados de comprimento de radícula de *Lactuca sativa* para amostras de solubilizado. .*Estatisticamente significativo em relação ao CN (Kruskal-Wallis; p<0,05; ; comparações múltiplas pelo teste de Dunn).....140
Figura 88 - Resultados de comprimento de hipocótilo de sementes de *Lactuca sativa* para amostras de solubilizado.*Estatisticamente significativo em relação ao CN (Kruskal-Wallis; p<0,05; comparações múltiplas pelo teste de Dunn). 141
Figura 89 - Resultados do Índice Mitótico (IM) para as amostras de solubilizado de solo em células meristemáticas de *Allium cepa*. 143
Figura 90 - Células meristemáticas de *Allium cepa*: a- interfase normal; b- prófase normal; c- metáfase normal; d- anáfase normal; e- telófase normal; f- metáfase com aderência cromossômica; g- metáfase poliplóide; h- C-metáfase; i- anáfase com ponte cromossômica (seta); j- anáfase com ponte (seta) e quebra cromossômica (ponta de seta); k- telófase com perda cromossômica (seta); l – telófase com atraso cromossômico (seta); m- telófase com ponte cromossômica (seta); n- telófase com quebra cromossômica (seta); o- micronúcleo (seta).....144
Figura 91 - Resultados de Índice de Alterações Cromossômicas e Nucleares (IACN) para amostras de solubilizado de solo em células meristemáticas de *Allium cepa*. *Estatisticamente significativo (Kruskal-Wallis, p<0,05; comparações múltiplas pelo teste de Dunn). 145
Figura 92 - Resultados de frequência de micronúcleos na região meristemática de *Allium cepa*. Estatisticamente significativo (Kruskal-Wallis, p<0,05; comparações múltiplas pelo teste de Dunn). 145
Figura 93 - Resultados de frequência de micronúcleos na região F1 de *Allium cepa*. Estatisticamente significativo (Kruskal-Wallis, p<0,05; comparações múltiplas pelo teste de Dunn).....146
Figura 94 - Células da região F1 do organismo *Allium cepa*. 147

Figura 95 - Resultados de viabilidade celular para as amostras de solubilizado de solo puro, antes e após o ensaio de biodegradação. 148
Figura 96 - Resultados de viabilidade celular para as amostras de solubilizado de solo e PBAT puro, antes e após o ensaio de biodegradação 148
Figura 97 - Resultados de viabilidade celular para as amostras de solubilizado de solo e NF1.5T1.5, antes e após o ensaio de biodegradação 149
Figura 98 - Resultados de viabilidade celular para as amostras de solubilizado de solo e NF1.5V1.5, antes e após o ensaio de biodegradação 149
Figura 99 – Viabilidade celular para amostras de solubilizado de solo antes e após o ensaio de biodegradação, pelo ensaio com Azul de Tripan. 151
Figura 100 - Porcentagem de DNA na cauda em células HepG2/C3A para as amostras de solubilizado de solo. *Estatisticamente significativo (Kruskal-Wallis, p<0,05; comparações múltiplas pelo teste de Dunn); ** estatisticamente significativo (ANOVA-um critério, p<0,05; comparações múltiplas pelo teste de Dunnett). 151
Figura 101 - Momento da cauda de Olive em células HepG2/C3A para as amostras de solubilizado de solo. *Estatisticamente significativo (Kruskal-Wallis, p<0,05; comparações múltiplas pelo teste de Dunn). 152
Figura 102 – Resultados de CBPI em células HepG2/C3A, para as amostras de solubilizado de solo. 153
Figura 103 - Resultados da frequência de micronúcleos em células HepG2/C3A, para as amostras de solubilizado de solo. *Estatisticamente significativo (Kruskal-Wallis, p<0,05; comparações múltiplas pelo teste de Dunn)). 154
Figura 104 - Resultados da frequência de brotos em células HepG2/C3A, para as amostras de solubilizado de solo. *Estatisticamente significativo (Kruskal-Wallis, p<0,05; comparações múltiplas pelo teste de Dunn). 154
Figura 105 - Resultados da frequência de pontes em células HepG2/C3A, para as amostras de solubilizado de solo. *Estatisticamente significativo (Kruskal-Wallis, p<0,05; comparações múltiplas pelo teste de Dunn). 155
Figura 107 - Curvas de distribuição de massa molar de amostras de PBAT com negro de fumo e vitamina E, antes e depois do envelhecimento acelerado (continuação). 194
Figura 108 - Curvas de distribuição de massa molar de amostras de PBAT com negro de fumo e vitamina E, após degradação em solo por 15 dias, 4 meses e 8 meses 196

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Classificação de negro de fumo quanto ao processo de fabricação. 30
Tabela 2 - Propriedades do PBAT Ecoflex F Blend C1200....46
Tabela 3- Matriz de planejamento dos filmes de PBAT com as combinações "negro de fumo e HALS" e "negro de fumo e Vitamina E"....48
Tabela 4 - Caracterização do solo. 55
Tabela 5 – Valores de pH dos solubilizados 61
Tabela 6 –Mn, Mw e PDI de filmes de PBAT antes e após o envelhecimento. 77
Tabela 7 - Resultados de cromatografia de permeação em gel para os filmes de PBAT. 80
Tabela 8 - Estimativa dos efeitos e valores de p (ANOVA) para de Mn para amostras naturais de PBAT com aditivos negro de fumo e HALS....81
Tabela 9 - Estimativa dos efeitos e valores de p (ANOVA) para de Mn para amostras envelhecidas de PBAT com aditivos negro de fumo e HALS....82
Tabela 10 - Estimativa dos efeitos e valores de p (ANOVA) para de Mn para amostras naturais de PBAT com aditivos negro de fumo e vitamina E....83
Tabela 11 - Estimativa dos efeitos e valores de p (ANOVA) para de Mn para amostras envelhecidas de PBAT com aditivos negro de fumo e vitamina E....84
Tabela 12 - Estimativa dos efeitos e valores de p (ANOVA) para polidispersidade de amostras naturais de PBAT com aditivos negro de fumo e HALS....85
Tabela 13 - Estimativa dos efeitos e valores de p (ANOVA) para polidispersidade de amostras envelhecidas de PBAT com aditivos negro de fumo e HALS. 86
Tabela 14 - Estimativa dos efeitos e valores de p (ANOVA) para polidispersidade de amostras naturais de PBAT com os aditivos negro de fumo e Vitamina E. 88
Tabela 15 - Estimativa dos efeitos e valores de p (ANOVA) para polidispersidade de amostras envelhecidas de PBAT com os aditivos negro de fumo e Vitamina E**.** 89
Tabela 16 - Valores de teor de gel para filmes de PBAT puro no ensaio de envelhecimento acelerado....91
Tabela 17 - Valores de teor de gel para amostras naturais e envelhecidas de PBAT com "negro de fumo e HALS" e "negro de fumo e Vitamina E". 93
Tabela 18 - Estimativa dos efeitos e valores de p (ANOVA) para teor de gel de amostras envelhecidas de PBAT com os aditivos negro de fumo e HALS. 96
Tabela 19 - Estimativa dos efeitos e valores de p (ANOVA) para teor de gel de amostras envelhecidas de PBAT com os aditivos negro de fumo e Vitamina E. 97
Tabela 20 - Propriedades mecânicas de filmes de PBAT puro antes e após envelhecimento acelerado. 98
Tabela 21 - Propriedades mecânicas das amostras naturais e envelhecidas de PBAT com aditivos. 100
Tabela 22 - Estimativa dos efeitos e valores de p (ANOVA) para Módulo de Young de amostras naturais de PBAT com os aditivos negro de fumo e HALS. 102
Tabela 23 - Estimativa dos efeitos e valores de p (ANOVA) para Módulo de Young de amostras envelhecidas de PBAT com os aditivos negro de fumo e HALS. 103
Tabela 24 - Estimativa dos efeitos e valores de p (ANOVA) para Módulo de Young de amostras naturais de PBAT com os aditivos negro de fumo e Vitamina E. 103
Tabela 25 - Estimativa dos efeitos e valores de p (ANOVA) para Módulo de Young de amostras envelhecidas de PBAT com os aditivos negro de fumo e Vitamina E. 105
Tabela 26 - Estimativa dos efeitos e valores de p (ANOVA) para alongamento de amostras naturais de PBAT com os aditivos negro de fumo e HALS. 105
Tabela 27 - Estimativa dos efeitos e valores de p (ANOVA) para alongamento de amostras envelhecidas de PBAT com aditivos negro de fumo e HALS....106
Tabela 28 - Estimativa dos efeitos e valores de p (ANOVA) para alongamento de amostras naturais de PBAT com os aditivos negro de fumo e vitamina E. 108
Tabela 29 - Estimativa dos efeitos e valores de p (ANOVA) para alongamento de amostras envelhecidas de PBAT com os aditivos negro de fumo e Vitamina E. 109
Tabela 30 - Estimativa dos efeitos e valores de p (ANOVA) para resistência à tração de amostras naturais de PBAT com os aditivos negro de fumo e HALS. 110
Tabela 31 - Estimativa dos efeitos e valores de p (ANOVA) para resistência à tração de amostras envelhecidas de PBAT com os aditivos negro de fumo e HALS. 111
Tabela 32 - Estimativa dos efeitos e valores de p (ANOVA) para resistência à tração de amostras naturais de PBAT com os aditivos negro de fumo e Vitamina E. 112
Tabela 33 - Estimativa dos efeitos e valores de p (ANOVA) para resistência à tração de amostras envelhecidas de PBAT com os aditivos negro de fumo e HALS. 113
Tabela 34 - Resultados de transmissão de luz para filmes de PBAT puro e com aditivos 117

Tabela 35 - Estimativa dos efeitos e valores de p (ANOVA) para transmissão de luz de amostras naturais de PBAT com os aditivos negro de fumo e HALS. 118
Tabela 36 - Estimativa dos efeitos e valores de p (ANOVA) para transmissão de luz de amostras envelhecidas de PBAT com aditivos negro de fumo e HALS. 119
Tabela 37 - Estimativa dos efeitos e valores de p (ANOVA) para transmissão de luz de amostras naturais de PBAT com os aditivos negro de fumo e Vitamina E. 120
Tabela 38 - Estimativa dos efeitos e valores de p (ANOVA) para transmissão de luz de amostras envelhecidas de PBAT com os aditivos negro de fumo e Vitamina E. 121
Tabela 39 - Resultados de análise elementar. 122
Tabela 40 - Relação entre a faixa de banda no espectro de FTIR com a ligação química associada. 125
Tabela 41 - Índice de carbonila (IC) para as amostras de PBAT com e sem aditivos. 126
Tabela 42 - Resultados da análise de GPC para as formulações de PBAT com aditivos. 132
Tabela 43 – Resultados de DSC para amostras de PBAT, com e sem aditivos. 137
Tabela 44 – Análises estatísticas dos parâmetros avaliados pelos bioensaios com solubilizados de solo, antes e após a degradação dos filmes. 156
Tabela 45 - Resultados de propriedades mecânicas da amostra NF0.1T1.0UVA. 198
Tabela 46- Resultados de propriedades mecânicas da amostra NF0.5T0.5UVA. 199
Tabela 47 – Resultados de viabilidade celular (%) pela avaliação com azul de tripan em células HepG2/C3A para amostras de solubilizado de solo. 274

LISTA DE SIGLAS

ABNT – Associação Brasileira de Normas Técnicas

ASTM – Sociedade Americana para Testes e Materiais

BA – adipato de butileno

BT – tereftalato de butileno

CSDF – Função de distribuição de cisão de cadeia

DSC – Calorimetria Exploratória Diferencial

FTIR – Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier

GPC – Cromatografia de Permeação em Gel (GPC)

HALS – Estabilizador de luz de amina estericamente impedida

IACN – Índice de alterações cromossômicas e nucleares

IM – Índice mitótico

MMS – Metanossulfonato de metila

MN - Micronúcleo

OECD – Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico

PBAT – poli (adipato-co-tereftalato de butileno)

PDI – Índice de polidispersidade

SEM – Microscopia Eletrônica de Varredura

TGA – Análise termogravimétrica

THF – tetrahidrofurano

LISTA DE ABREVIATURAS

NF – negro de fumo

T – Tinuvin 783

V – vitamina E

NAT – amostras naturais

UVA – amostras envelhecidas

UVA_solo_15d – amostras envelhecidas e degradadas em solo por 15 dias em ensaio de desintegração

UVA_solo_4m – amostras envelhecidas e degradadas em solo por 4 meses em ensaio de desintegração

UVA_solo_8m – amostras envelhecidas e degradadas em solo por 8 meses em ensaio de desintegração

UVA_solo_12m – amostras envelhecidas e degradadas em solo por 12 meses em ensaio de desintegração

NAT_sol – amostras de solubilizado de solo puro e solubilizados das misturas de solo com amostras naturais de PBAT, com e sem aditivos

UVA_bio_sol – amostras de solubilizado de solo puro e solubilizados das misturas de solo com amostras envelhecidas e PBAT, com e sem aditivos, após o ensaio de biodegradação

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 19
2. OBJETIVOS 21
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 22
3.1. Polímeros biodegradáveis: aplicação na agricultura 22
3.2. Fotodegradação 24
3.3. Biodegradação do PBAT 33
3.4. Estudos ecotoxicológicos do polímero PBAT 35
3.4.1. *Lactuca sativa* 38
3.4.2. *Allium cepa* 40
3.4.3. Linhagem celular HepG2/C3A 42
4. MATERIAIS E MÉTODOS 46
4.1. Preparo, caracterização e seleção de filmes *mulch* de PBAT 46
4.1.1. Análise de massa molar por Cromatografia de Permeação em Gel (GPC) 50
4.1.2. Análise do teor de gel 50
4.1.3. Análise de propriedades mecânicas 51
4.1.4. Análise de transmissão de luz 52
4.1.5. Seleção de amostras 52
4.2. Análise de biodegradação por método respirométrico 54
4.3. Análise de desintegração em solo 58
4.3.1. Caracterização estrutural e análise do índice de carbonila (IC) por Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR) 59
4.3.2. Análise visual 60
4.3.3. Análise de morfologia por Microscopia Eletrônica de Varredura (SEM) 60
4.3.4. Análise de massa molar por Cromatografia de Permeação em Gel (GPC) 60
4.3.5. Análise de transições térmicas e grau de cristalinidade por Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) 60
4.4. Análises ecotoxicológicas por bioensaios 61
4.4.1. Bioensaio - *Lactuca sativa* 62
4.4.2. Bioensaio - *Allium cepa* 63
4.4.3. Bioensaio - Cultura de células HepG2/C3A 66
4.4.3.1. Ensaio do MTT 66
4.4.3.2. Ensaio do cometa 70
4.4.3.3. Ensaio do micronúcleo com bloqueio de citocinese 73
4.4.4. Análise comparativa entre os monitoramentos com os bioensaios 76
5. RESULTADOS 77
5.1. Caracterização de estabilidade térmica de aditivos por análise termogravimétrica (TGA) 77
5.2. Caracterização e seleção de filmes *mulch* de PBAT 77
5.2.1. Análise de massa molar por Cromatografia de Permeação em Gel (GPC) 77
5.2.2. Análise do teor de gel 91
5.2.3. Análise de propriedades mecânicas 97
5.2.4. Análise de transmissão de luz 116
5.2.5. Seleção de amostras 122
5.3. Análise de biodegradação em solo 122
5.4. Análise de desintegração em solo 124
5.4.1. Caracterização estrutural e análise do índice de carbonila (IC) Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR) 124
5.4.2. Análise visual 127
5.4.3. Análise de morfologia por Microscopia Eletrônica de Varredura (SEM) 129
5.4.4. Análise de massa molar por Cromatografia de Permeação em Gel (GPC) 131
5.4.5. Análise de transições térmicas e grau de cristalinidade por Calorimetria Diferencial Exploratória (DSC) 135
5.5. Análises ecotoxicológicas por Bioensaios 139
5.5.1. Bioensaio - *Lactuca sativa* 139

5.5.2. Bioensaio - *Allium cepa*.....142
5.5.3. Bioensaio - Cultura de células HepG2/C3A.....147
5.5.3.1. Ensaio do MTT.....147
5.5.3.2. Ensaio do cometa.....150
5.5.3.3. Ensaio do micronúcleo com bloqueio de citocinese.....152
5.5.4. Análise comparativa entre os monitoramentos com os bioensaios..... ... 155
6. CONCLUSÕES.....158
7. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....160
8. REFERÊNCIAS.....161

APÊNDICE A - PROCEDIMENTOS E SOLUÇÕES PARA MANUTENÇÃO DAS CÉLULAS HEPG2/C3A.....183
APÊNDICE B - SOLUÇÕES PARA O ENSAIO DO COMETA.....186
APÊNDICE C - SOLUÇÕES PARA O ENSAIO DO MICRONÚCLEO.....188
APÊNDICE D - CURVAS TERMOGRAVIMÉTRICAS E DERIVADAS DOS ADITIVOS TINUVIN 783 E VITAMINA E.....189
APÊNDICE E - CURVAS DE DISTRIBUIÇÃO DE MASSA MOLAR.....191
APÊNDICE F - GRÁFICOS DE TENSÃO X DEFORMAÇÃO E RESULTADOS DE PROPRIEDADES MECÂNICAS.....197
APÊNDICE G - RESULTADOS DE TRANSMISSÃO DE LUZ.....228
APÊNDICE H - RESULTADOS DO ENSAIO DE BIODEGRADAÇÃO EM SOLO.....244
APÊNDICE I - ESPECTROS DE FTIR.....245
APÊNDICE J - CURVAS DE DSC.....253
APÊNDICE K - RESULTADOS DOS BIOENSAIOS.....268

1. INTRODUÇÃO

Na agricultura, a prática da cobertura de solo com filmes plásticos (*mulching*) é empregada para o controle das plantas invasoras, menor consumo de água de irrigação devido à redução no processo de evaporação, maior facilidade para a colheita e comercialização. Vale destacar que esta prática também possibilita a redução do uso de herbicidas, pois a cobertura plástica reduz a competição entre a cultura e as plantas invasoras (YURI et al., 2014).

Os filmes *mulch* convencionais são produzidos com polietileno de baixa densidade (PEBD). A principal desvantagem do uso deste material está na dificuldade da sua destinação final, que envolve o envio aos aterros sanitários (YURI et al., 2014). Segundo Wilde e Deconinck (2017), a remoção dos filmes *mulch* convencionais demanda cerca de 16 horas por hectare e apresenta um custo acima de 300 euros por hectare. Quando deixados no campo, estes materiais tendem a fragmentar-se e acumular-se progressivamente no solo. O maior interesse da utilização de plásticos biodegradáveis para essa aplicação está na possibilidade de sua incorporação ao solo após o uso (TOUCHALEAUME et al., 2016).

O polímero poli(adipato-co-tereftalato de butileno) (PBAT) vem sendo proposto como uma importante alternativa de material biodegradável para filmes *mulch* na agricultura. Porém, sua alta susceptibilidade aos processos de fotodegradação torna necessária a utilização de aditivos absorvedores e estabilizadores de radiação ultravioleta (UV), que permitam prolongar o período de vida útil do produto (BILCK; GROSSMANN; YAMASHITA, 2010; KIJCHAVENGKUL et al., 2010a).

A exposição do polímero PBAT à radiação UV provoca cisão de suas cadeias poliméricas (GLUSKENS; KABAMBA, 1982; SEVERINI; GALO; IPSALES, 1987; KIJCHAVENGKUL, 2010b). A combinação de radicais formados pela fotodegradação também pode promover a reticulação do material polimérico, provocando a redução de sua ductibilidade (KASIRAJAN; NGOUAJIO, 2012). Além disso, por tornar os filmes de PBAT menos flexíveis, a reticulação também pode limitar a acessibilidade dos microrganismos às cadeias poliméricas, retardando sua biodegradação (KALE et al., 2007).

O presente trabalho propõe o estudo da eficiência de diferentes combinações de aditivos para minimizar a fotodegradação do PBAT. O negro de fumo é considerado um eficiente absorvedor de radiação UV e é comumente empregado em filmes *mulch* convencionais de polietileno. Todavia, a radiação não absorvida pelo negro de fumo pode interagir com o polímero, o que torna importante a utilização de estabilizadores que possam minimizar a ação dos radicais livres formados (KIJCHAVENGKUL et al., 2011). Assim, este trabalho irá

analisar duas alternativas para complementar a ação do negro de fumo: estabilizador de amina estericamente impedida (HALS) e estabilizador fenólico.

Este estudo não se restringe apenas à avaliação do PBAT quanto ao seu potencial de aplicação como filme *mulch* durante o período de vida útil. Uma vez que a principal proposta de destinação final para polímeros biodegradáveis na agricultura é a incorporação em solo, questões como a sua biodegradação e desintegração em solo também serão investigadas.

Além disso, os filmes *mulch* biodegradáveis também devem passar por avaliações acerca das consequências ambientais destes materiais e seus produtos de degradação (SINTIM; FLURY, 2017). Dessa forma, outra contribuição científica do presente trabalho envolve a avaliação ecotoxicológica dos filmes *mulch* de PBAT, presentes em amostras de solo, por meio de diferentes organismos teste: *Allium cepa* (cebola), *Lactuca sativa* (alface) e hepatócitos humanos (HepG2/C3A).

2. OBJETIVOS

O objetivo do presente trabalho foi estudar a fotoestabilização do polímero PBAT com diferentes combinações de aditivos e seus efeitos sobre a desintegração e biodegradação visando à aplicação do material como filme *mulch*. Considerando que a principal proposta de destinação final para este tipo de material é a incorporação no solo, também buscou-se avaliar se efeitos ecotoxicológicos ocorrem antes e após a degradação dos filmes de PBAT, com e sem aditivos.

A estratégia de pesquisa para atingir os objetivos definidos foi estabelecida pelas etapas a seguir:

- Preparação de filmes *mulch* de PBAT puro e com diferentes combinações de aditivos - negro de fumo/HALS e negro de fumo/vitamina E - conforme planejamento experimental e realização de teste de envelhecimento acelerado com as formulações;
- Avaliação das formulações do planejamento experimental e polímero puro quanto às seguintes propriedades: teor de gel, distribuição de massa molar, módulo de Young, alongamento, resistência à tração e transmissão de luz, antes e após o envelhecimento;
- Seleção, dentre as amostras de cada planejamento experimental, das mais promissoras para aplicação como filmes *mulch*, considerando a eficiência para fotoestabilização do PBAT;
- Avaliação da desintegração em solo de amostras envelhecidas de PBAT puro e com aditivos, pelo monitoramento do aspecto visual, massa molar, índice de carbonila, morfologia, transições térmicas e grau de cristalinidade;
- Caracterização da biodegradação em solo de amostras envelhecidas de PBAT puro e com aditivos, pelo monitoramento da percentagem de mineralização;
- Investigação dos efeitos ecotoxicológicos de amostras de solubilizado de solo associado com filmes de PBAT puro e com aditivos, por bioensaios com os organismos-teste *Allium cepa*, *Lactuca sativa* e linhagem celular HepG2/C3A, em dois períodos distintos: previamente ao envelhecimento acelerado (amostras naturais) e após o ensaio de biodegradação com amostras envelhecidas.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Polímeros biodegradáveis: aplicação na agricultura

Na agricultura, é comum a utilização de filmes *mulch* de polietileno de baixa densidade (PEBD) para cobertura do solo, que conferem várias vantagens para as culturas, tais como aumento da produtividade da colheita, melhora nas condições de temperatura e umidade do solo, bem como controle de pragas (KYRIKOU; BRIASSOULIS, 2007; TOUCHALEAUME et al., 2016).

São exemplos de culturas beneficiadas por filmes *mulch*: alface, tomate, abobrinha, pimentão, melão, melancia, morango e videira (CONSÓRCIO AGROBIOFILM, 2013; NETO, 2014).

A aplicação de filmes *mulch* proporciona maior controle das plantas invasoras, menor consumo de herbicidas e menor consumo de água de irrigação, pois reduz o processo de evaporação (GONÇALVES; FAGNANI; PEREZ, 2005; NEGREIROS et al., 2005). Além disso, facilita a colheita e comercialização, uma vez que o produto colhido é mais limpo e sadio (NEGREIROS et al., 2005). A Figura 1 ilustra o filme *mulch* aplicado em campo.

Figura 1 - Filme *mulch* aplicado em cultura de morango



Fonte: Shouman (2018).

Apesar das vantagens dos filmes *mulch*, há um impacto ambiental negativo destes materiais devido ao acúmulo de resíduos, o que também leva à preocupação de agricultores com custos para a adequada destinação em aterros sanitários. A quantidade estimada para aplicação de filmes *mulch* no mundo é de 1,45 milhão de toneladas/ano (YANG et al., 2015).

Além do problema da produção de resíduos, parte dos resíduos plásticos é deixada no campo ou queimada, provocando poluição atmosférica (BRIASSOULIS, 2006; SCARASCIA-MUGNOZZA et al., 2006). Neste contexto, destacam-se os polímeros biodegradáveis, que

permitem a incorporação do plástico ao solo após seu uso, tornando desnecessária a remoção e destinação do material. Estes podem ser obtidos de fontes renováveis (*biobased*) ou de fontes fósseis.

Embora muitas vezes os termos polímeros "*biobased*" e polímeros "biodegradáveis" sejam empregados como sinônimos, estes termos referem-se a conceitos diferentes. De acordo com a Sociedade Americana para Testes e Materiais - ASTM e o Departamento de Agricultura dos Estados Unidos, os plásticos *biobased* são materiais orgânicos, cujo carbono de sua composição são obtidos de fontes renováveis (NARAYAN, 2008; MEI, 2016). A determinação do teor de carbono derivado de fontes renováveis pode ser feita de acordo com o método preconizado pela norma ASTM D6866-16. Para a norma ASTM D6400-19, plásticos biodegradáveis são aqueles cuja degradação resulta da ação de microrganismos de ocorrência natural como bactérias, fungos e algas.

O termo bioplásticos refere-se aos plásticos biodegradáveis, *biobased* ou ambos (PEELMAN et al., 2013). Os plásticos *biobased* podem não ser biodegradáveis, como o polietileno verde produzido no Brasil, pois embora o monômero seja extraído de fonte renovável, o produto de sua transformação (polietileno) não é considerado biodegradável. São exemplos de plásticos *biobased* que são biodegradáveis o poli (ácido lático), polihidroxialcanoatos, celulose e amido (MEI, 2016).

O poli(adipato-co-tereftalato de butileno) (PBAT), polímero biodegradável obtido de fontes fósseis, vem sendo estudado como uma possível alternativa ao uso do polietileno de baixa densidade na aplicação de filmes tipo *mulch* (BILCK; GROSSMANN; YAMASHITA, 2010; KIJCHAVENGKUL et al., 2008a; 2008b; 2011).

Alguns exemplos de *grades* de PBAT produzidos em escala industrial que podem ser empregados para a produção de filmes *mulch* encontram-se listados a seguir (KAVA-CELIKER; MALLIKARJUNAN, 2017; SERRANO-LUIZ; MARTIN-CLOSAS; PELACHO, 2018).

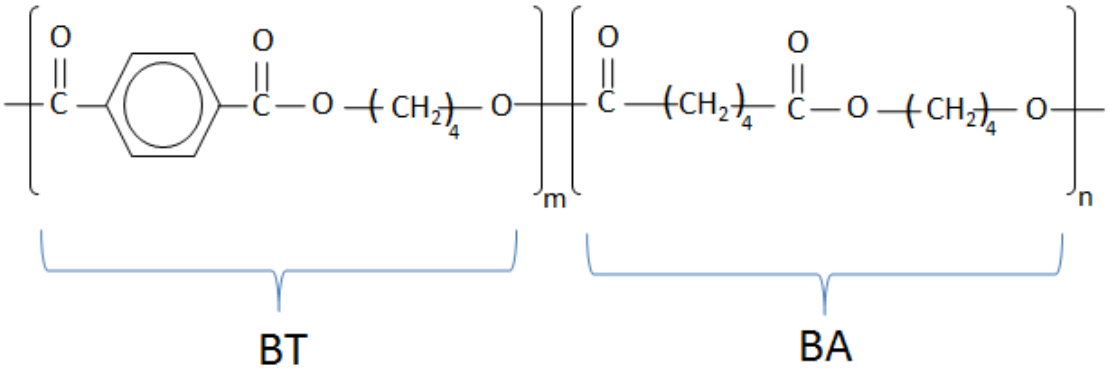
- **Ecoflex®:** empresa - BASF (Alemanha); *grade* - F Blend C1200; composição - PBAT.
- **Mater-Bi®:** empresa - Novamont (Itália); *grade* - CF-04P; composição - PBAT, amido termoplástico e óleos vegetais.
- **Ecovio®:** empresa - BASF (Alemanha); *grade* M2351; composição – blenda de PBAT e PLA.
- **Bioflex®:** empresa - Fkur (Alemanha); *grade* F1130; composição - blenda de PBAT e PLA.

- **Biofilm®:** empresas – Limagrain, Carbios, Groupe Barbier (França); *grade* BF3012; composição - PBAT e farinha de cereais.

Touchaleaume et al. (2016) avaliaram a eficiência agronômica para blendas de PBAT com três diferentes polímeros: PLA, carbonato de propileno e amido. Em todas as formulações foi empregado o negro de fumo como absorvedor de radiação UV. Os materiais testados foram considerados promissores e de eficiência similar ao plástico convencional de polietileno.

O PBAT é um copolímero aleatório constituído por dois tipos de dímeros. Na Figura 2, a unidade repetitiva denominada tereftalato de butileno (BT), formada pelos monômeros 1,4-butanodiol e ácido tereftálico, confere rigidez ao polímero. Já a unidade repetitiva adipato de butileno (BA), formada pelos monômeros 1,4-butanodiol e ácido adípico, confere flexibilidade à cadeia do PBAT (KIJCHAVENGKUL et al., 2010a).

Figura 2 - Estrutura do poli(adipato-co-tereftalato de butileno) – PBAT.



Fonte: adaptado de Kijchavengkul et al. (2010a).

3.2. Fotodegradação

Durante a utilização dos filmes *mulch* em campo, ocorre a exposição dos materiais à radiação solar, especialmente à luz ultravioleta, o que provoca a fotodegradação, que compromete a eficiência do produto quanto à proteção do solo e a prevenção do crescimento de ervas daninhas (KIJCHAVENGKUL et al., 2008a).

A necessidade de se prever a vida útil de produtos quando expostos à radiação ultravioleta tem incentivado muitos estudos de envelhecimento acelerado em laboratório de materiais poliméricos (SANCHEZ, 2007; FERNANDES et al., 2012; LESAFRE et al., 2017). Alguns equipamentos permitem realizar o teste de envelhecimento acelerado com ciclos de radiação e também condensação, para simular condições de chuva e orvalho (POVEDA, 2015).

Quando uma molécula polimérica absorve radiação eletromagnética, sua energia aumenta em quantidade igual à energia do fóton absorvido, de acordo com a Equação 1 (RABEK, 1995).

$$E = E_2 - E_1 = h\upsilon \qquad \text{(Equação 1)}$$

Onde:
E_2 e E_1 - energias de uma molécula no estado final e inicial, respectivamente;
h - constante de Planck
υ - frequência de radiação

A degradação foto-oxidativa dos polímeros é um processo autocatalítico, que consiste de 3 etapas: iniciação, propagação e terminação, conforme ilustram as reações abaixo. A iniciação resulta da quebra de ligações químicas pela ação da radiação, produzindo radicais alquila. Durante a propagação, na presença de oxigênio, formam-se radicais peróxi, os quais reagem com o polímero, formando hidroperóxidos e radicais alquila. A fotodegradação de hidroperóxidos forma novos radicais que dão continuidade à fotodegradação. No processo de terminação, a combinação de diferentes radicais leva à formação de produtos inativos (RABEK, 1995).

$$\text{Iniciação} - \text{Polímero} \rightarrow \text{P}\bullet + \text{P}\bullet$$

$$\text{Propagação} - \text{P}\bullet + \text{O}_2 \rightarrow \text{POO}\bullet$$

$$\text{POO}\bullet + \text{PH} \rightarrow \text{POOH} + \text{P}\bullet$$

$$\text{POOH} \rightarrow \text{PO}\bullet + \bullet\text{OH}$$

$$\text{PH} + \bullet\text{OH} \rightarrow \text{P}\bullet + \text{H}_2\text{O}$$

$$\text{Teminação} - \text{POO}\bullet + \text{POO}\bullet$$

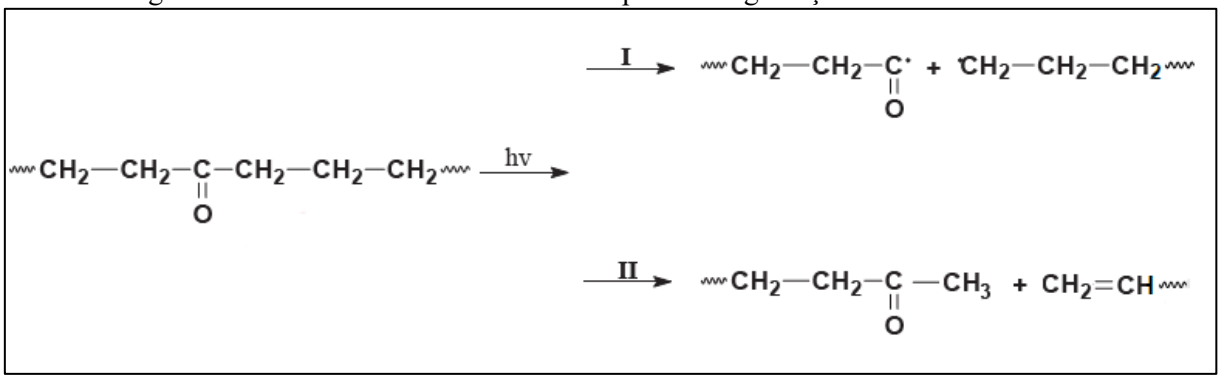
$$\text{POO}\bullet + \text{P}\bullet$$

$$\text{P}\bullet + \text{P}\bullet$$

Onde: PH - polímero; $P^{\bullet}$- radical alquila; $PO^{\bullet}$ - radical alcoxila; $POO^{\bullet}$- radical peroxila; POOH – hidroperóxido; •OH- radical hidroxila (RABEK, 1995).

A exposição de polímeros à radiação ultravioleta pode provocar a cisão de cadeia por reação de Norrish tipo I e/ou tipo II. No mecanismo Norrish tipo I, a cadeia é quebrada formando radicais livres. No caso da reação Norrish tipo II, ocorre a formação de uma ligação dupla C=C na extremidade da cadeia. A Figura 3 ilustra os referidos mecanismos para polímeros que possuem grupos carbonila em sua cadeia principal (DE PAOLI, 2008).

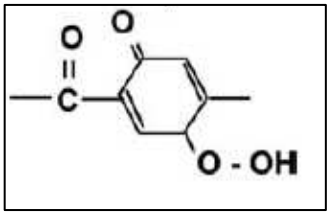
Figura 3 - Mecanismos de cisão de cadeia por fotodegradação: Norrish I e Norrish II.



Fonte: De Paoli (2008).

No polímero PBAT outro grupo fotossensível é o benzeno, o qual pode contribuir para o processo de formação de radicais livres. Rivaton e Gardette (1998) propuseram que radicais aromáticos de PBT poderiam recombinar entre si formando uma estrutura reticulada. Kijchavengkul (2010b) também propôs a ocorrência deste mecanismo para o PBAT. Todavia, em estudo conduzido por Rzepna, Przybytniak e Sadlo (2018) observou-se que os radicais da região aromática do PBAT, a partir de reações com radicais peroxila, formam uma estrutura estável análoga de ortohidroxibenzoatos, ilustrada na Figura 4. Com base nessa observação os autores propuseram que as reticulações no PBAT devem ocorrer pela recombinação de radicais formados na região alifática do polímero.

Figura 4 – Estrutura estável possivelmente formada a partir de radicais livres na região aromática do PBAT.



Fonte: adaptado de Rzepna, Przybytniak e Sadlo (2018).

A reticulação faz com que o filme reduza sua ductibilidade. Esta é uma propriedade importante para filmes *mulch*, por permitir que o material se estenda sem romper diante de movimentações provocadas pelos ventos (KASIRAJAN; NGOUAJIO, 2012).

Dentre as técnicas para avaliar os processos de cisão de cadeia e reticulação provocados pela fotodegradação está a cromatografia de permeação em gel (GPC). Para facilitar a interpretação das curvas de GPC antes e após um processo de degradação é possível utilizar o *software* CSDF 4.1 desenvolvido por Canevarolo (2000), que permite avaliar os efeitos da

degradação em toda a distribuição de massa molar. O *software* desenvolvido por meio de macro em Excel permite inserir dados da análise GPC, antes e após um processo de degradação, e resulta em uma curva denominada Função de Distribuição de Cisão de Cadeia (CSDF). Essa curva é calculada pelas equações 2 e 3.

$$CSDF = \log(N_s + 1) \qquad \text{(Equação 2)}$$

$$N_s = \left(\frac{MWD_i}{MWD_f}\right) - 1 \qquad \text{(Equação 3)}$$

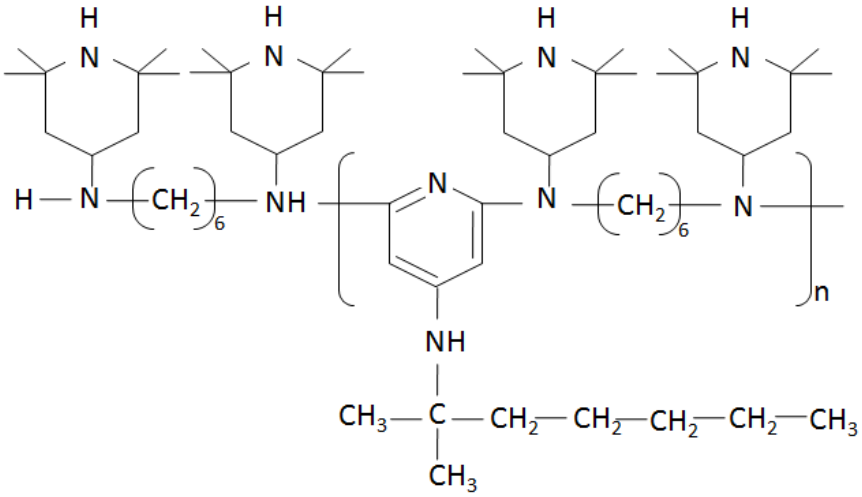
Na equação 2, Ns representa o número de cisões de cadeia no polímero degradado, calculado para cada fração de massa molar que compõe toda a curva de distribuição de massa molar do polímero inicial (ou de referência). Na equação 3, MWD_i e MWD_f são as curvas de distribuição de massa molar inicial e final, respectivamente (CÁCERES; CANEVAROLO, 2009).

Valores positivos da curva CSDF indicam ocorrência do processo de cisão de cadeia, enquanto valores negativos indicam ganho de massa molar por reticulação e/ou ramificação (CÁCERES; CANEVAROLO, 2009).

De forma a minimizar a formação de radicais livres durante o processo de fotodegradação, antioxidantes como o hidroxitolueno butilado-BHT podem ser adicionados à matriz do PBAT (KIJCHAVENGKUL et al., 2011). A alta volatilidade durante o processamento e alta tendência de migração, devido à sua baixa massa molar, reduzem a versatilidade deste composto (GRAY; LEE; SANDERS, 1996). Dessa forma, outros sistemas devem ser investigados.

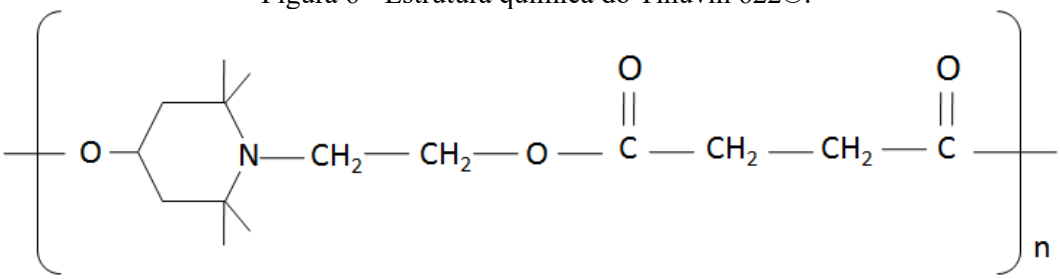
Em estudo conduzido por Poveda (2015), foi reportado que um aditivo estabilizador de luz de amina estericamente impedida (HALS) na matriz de PBAT (concentração de 0,75 % em massa), submetido ao processo de envelhecimento acelerado por 172 horas, com ciclos de 12 horas, sendo de 8 horas de radiação e 4 horas de condensação, apresentou redução das propriedades de alongamento e resistência no escoamento de apenas 0,6 e 0,5%, repectivamente. O aditivo empregado no referido estudo foi o Tinuvin 783® (BASF). Este consiste em uma mistura 1:1 de HALS de baixa massa molar (Chimassorb 944) e alta massa molar (Tinuvin 622), cujas estruturas químicas encontram-se apresentadas nas Figuras 5 e 6, respectivamente.

Figura 5 - Estrutura química do Chimassorb 944®.



Fonte: adaptado de (BASF,2004).

Figura 6 - Estrutura química do Tinuvin 622®.

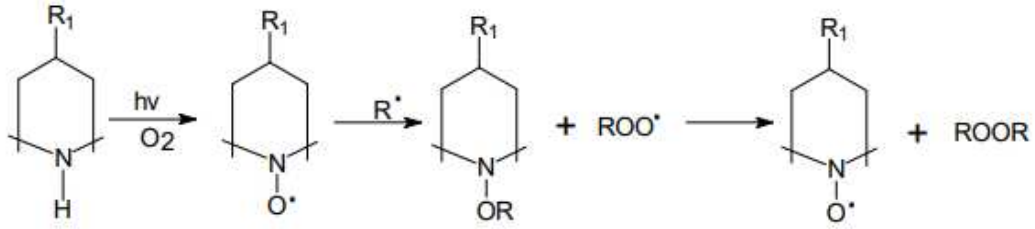


Fonte: adaptado de BASF (2004).

Segundo Dufton (1998), o Tinuvin 783® apresenta ação sinergística, pois sua composição possui um efeito estabilizador superior aos seus componentes individuais. Em teste de envelhecimento por radiação ultravioleta, realizado com polipropileno, foram testados individualmente o Tinuvin 622®, Chimassorb 944® e Tinuvin 783®. A perda de 50% do alongamento na ruptura ocorreu após 240 dias para o Tinuvin 622®, 280 dias para o Chimassorb 944® e 320 dias para o Tinuvin 783®.

O principal mecanismo de estabilização proposto para as aminas estericamente impedidas é atribuído à formação do radical nitroxila, conforme indicado na Figura 7. Este radical se forma pela ação da luz em presença de oxigênio. A nitroxila é regenerada pela reação do produto final com radicais peroxila (AQUINO; ARAÚJO, 2004; DE PAOLI, 2008).

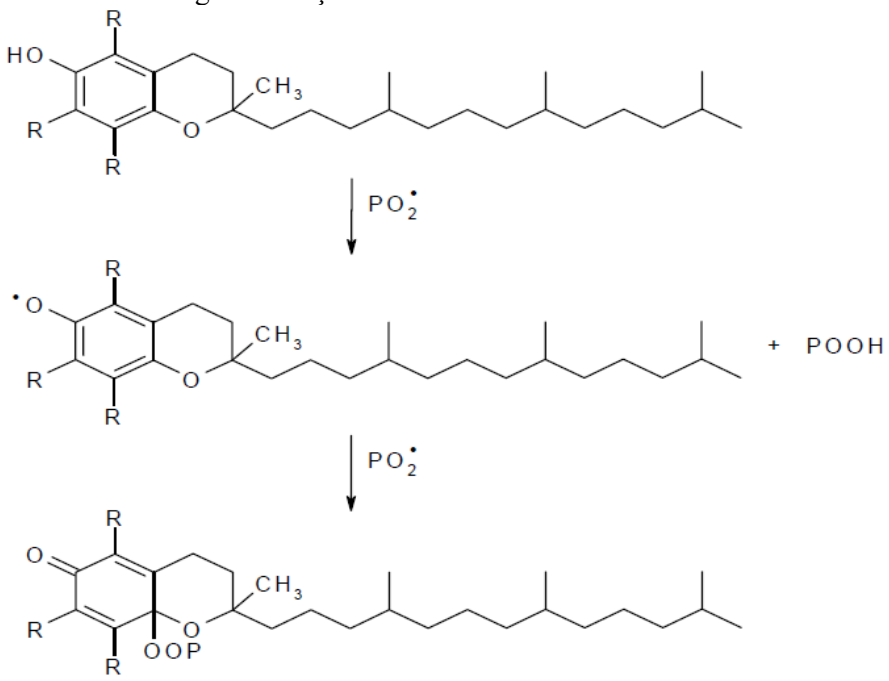
Figura 7 - Mecanismo de ação de estabilizadores tipo HALS.



Fonte: Aquino e Araújo (20014).

Assim como as aminas, os fenóis também podem agir como estabilizadores por impedimento estérico. Primeiramente, o estabilizador fenólico reage com radical peroxila formando hidroperóxido e um radical fenólico, o qual pode, em seguida estabilizar outro radical peroxila, formando ao final do processo estruturas quinonóides. Estas estruturas são caracterizadas por um núcleo benzênico apresentando duas ligações duplas (KLEIN; LUKES; CIBULKOVA, 2005). A vitamina E (α-tocoferol) é um exemplo de estabilizador fenólico com potencial para minimizar os efeitos da fotodegradação (KLEIN; LUKES; CIBULKOVA, 2005; DE PAOLI, 2008). A Figura 8 ilustra o mecanismo de ação antioxidante pela vitamina E.

Figura 8 - Ação do antioxidante da vitamina E.



Fonte: adaptado de Klein, Lukes e Cibulkova (2005).

Ressalta-se que os estabilizadores mencionados não dispensam o uso do negro de fumo, o qual é comumente empregado em filmes *mulch* para bloquear a transmissão de luz no comprimento de onda de radiação fotossinteticamente ativa (400-700 nm), o que previne o

crescimento de ervas daninhas (LAMONT, 2004). Além desta função, o negro de fumo também pode contribuir para inibir a fotodegradação, pois absorve a energia de fótons e reduz a intensidade da luz que reage com o polímero (SHLYAPINTOKH, 1984).

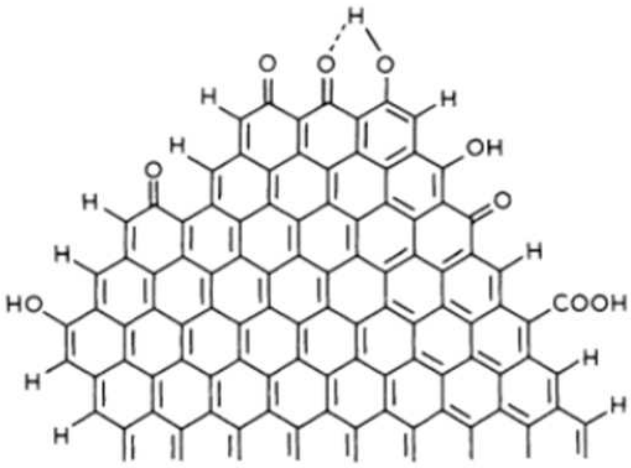
O negro de fumo é formado pela combustão incompleta de substâncias orgânicas e sua classificação pode ser realizada em relação ao processo de fabricação (RABEK, 1990). As principais classes e os tamanhos de partículas para cada processo estão indicados na Tabela 1. A estrutura do negro de fumo encontra-se apresentada na Figura 9. Esta possui grupos oxidados como quinona, fenol, lactona e carboxifenol (STUDEBAKER; RINEHART, 1972).

Tabela 1- Classificação de negro de fumo quanto ao processo de fabricação.

Classificação	Descrição	Tamanho de partículas
Negro de fumo de fornalha	Produzido no fluxo de alta velocidade da fornalha	170-700 Å
Negro de fumo de canal	Produzido pela da queima de gás natural	100-270 Å
Negro de fumo térmico	Produzido pela decomposição térmica do gás natural	1500-5000 Å
Negro de fumo de lamparina	Produzido por combustão incompleta de petróleo ou resíduo de alcatrão de carvão	500-900 Å
Negro de fumo de acetileno	Obtido pela dissociação do acetileno em carbono e hidrogênio	350-500 Å

Fonte: adaptado de Rabek (1990)

Figura 9 - Estrutura do negro de fumo.



Fonte: Rabek (1990)

Além de sua ação absorvedora, o negro de fumo atua como doador ou receptor de espécies químicas em processos de rompimento de cadeias, desativa espécies químicas em

estados excitados de energia e decompõe hidroperóxidos. Sua eficiência na estabilização aumenta com o aumento da concentração de pigmento e diminuição do tamanho de partícula (ALLEN et al., 2000).

Os agregados de negro de fumo são formados pela fusão de unidades denominadas partículas primárias, conforme indicado na Figura 10, e se assemelham a um “cacho de uva” (ASHTON, 2012).

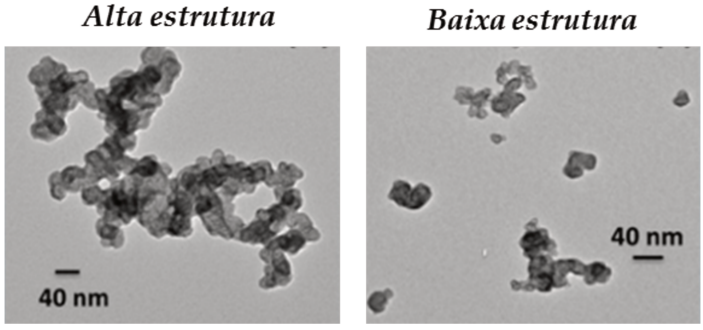
Figura 10 - Microestrutura do negro de fumo.



Fonte: Padrón (1989)

Os negros de fumo de alta estrutura são formados por muitas partículas primárias em cada agregado enquanto os negros de fumo de baixa estrutura possuem uma fraca agregação de partículas (AL-HARTOMY et al., 2011). A Figura 11 ilustra os dois tipos de estrutura.

Figura 11 - Imagens de microscopia eletrônica de transmissão de negro de fumo de alta estrutura e de baixa estrutura.



Fonte: adaptado de Qi et al. (2013).

Foram conduzidos por Kijchavengkul et al. (2008a) estudos em campo com filmes de PBAT associado a diferentes aditivos. Os autores observaram que, na presença de dióxido de titânio (TiO_2), a fragmentação do material iniciou-se após 4 semanas, enquanto que com o negro de fumo (NF) a fragmentação ocorreu apenas após 8 semanas, conforme ilustrado na Figura 12. Os valores de teor de gel medidos na oitava semana de degradação para os filmes com dióxido de titânio e negro de fumo foram 53,8% e 23,2%, respectivamente. Os autores associaram esse resultado à ação catalisadora do dióxido de titânio no processo de fotodegradação. O negro de

fumo, por sua vez, minimizou os efeitos de reticulação por sua habilidade em absorver energia e reduzir a intensidade de luz que reage com o polímero (KIJCHAVENGKUL et al., 2008a).

De acordo com a norma europeia EN 13655 (2002) é recomendado que os filmes para aplicação em *mulching* mantenham resistência à tração e alongamento acima 16 MPa e 200%, respectivamente, durante seu uso. Kijchavengkul et al. (2011) indicaram que para essa aplicação de filmes de PBAT, a resistência à tração final deveria ser igual ou maior que 6 MPa. Este valor foi determinado em estudo prévio (KIJCHAVENGKUL et al., 2008a) para um filme *mulch* testado em cultura de tomate após 8 semanas de sua aplicação, período no qual iniciou-se o processo de desintegração.

Figura 12 - Degradação de filmes *mulch* de PBAT em campo.



Fonte: adaptado de Kijchavengkul et al. (2008a).

Outro parâmetro importante a ser garantido por um filme *mulch* é o bloqueio da radiação fotossinteticamente ativa (RFA). Ngouajio et al. (2008) avaliaram o controle de ervas daninhas por filmes *mulch* de PBAT e negro de fumo com espessuras de 25 e 35 μm em cultura de tomate, na cidade de Holt, localizada em Michigan- Estados Unidos. O primeiro experimento foi realizado por 6 semanas em 2006 e o segundo experimento foi realizado por 5 semanas em 2007. Os filmes empregados em 2006 apresentavam valores de transmissão de RFA próximos a 20%, enquanto aqueles empregados em 2007 apresentaram resultados inferiores a 5% para

esta propriedade (Kijchavengkul, 2010b). Estes filmes foram comparados aos materiais convencionais de polietileno de 25 μm de espessura (transmissão de RFA inferior a 1%). Em ambos os experimentos, os filmes de PBAT permitiram o mesmo nível de proteção da cultura de tomate apresentado pelo polietileno.

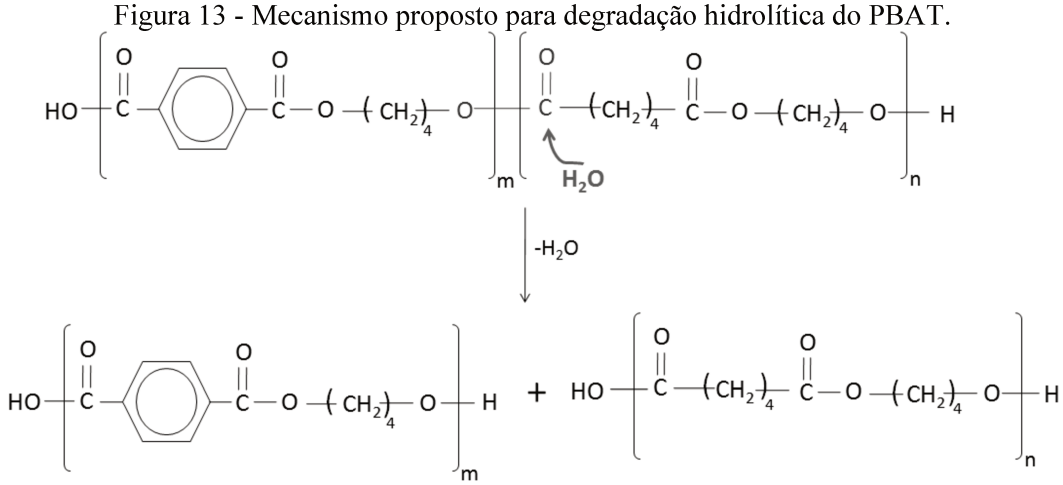
Kijchavengkul et al. (2011), em estudo de formulações de filmes *mulch* de PBAT com diferentes concentrações de aditivos (absorvedor e antioxidante), consideraram valores de transmissão de luz na RFA inferiores a 20% como critério de qualidade para avaliação das amostras. A norma EN 13655 (2002), por sua vez, indica que a transmissão na RFA ideal para filmes *mulch* deve ser inferior a 1%.

3.3. Biodegradação do PBAT

A biodegradação de plásticos depende de dois aspectos principais: fatores ambientais e a estrutura química do polímero (KALE et al., 2007). O PBAT, pela presença de ligações de grupo éster em sua cadeia, que são grupos funcionais hidrolisáveis, é susceptível à degradação hidrolítica (KALE; AURAS; SINGH, 2006).

No mecanismo proposto para a biodegradação do PBAT tem-se uma etapa inicial de desintegração que promove a cisão de cadeia, favorecida pela degradação hidrolítica, esquematizada na Figura 13 (MUTHURAJ; MISRA; MOHANTY, 2015).

Figura 13 - Mecanismo proposto para degradação hidrolítica do PBAT.



Fonte: Muthuraj, Misra e Mohanty (2015).

A degradação hidrolítica dos polímeros biodegradáveis pode ser catalisada por enzimas (AZEVEDO; REIS, 2004). A lipase da bactéria *Pelosinus fermentans* (BIUNDO et al., 2016), esterase da bactéria *Clostridium botulinum* (PERZ et al., 2016a), cutinase do fungo *Humicola insolens* e das bactérias *Thermobifida cellulosilytica* (PERZ et al., 2016b) e

Thermobifida alba (THUMARAT et al., 2015) foram reportadas como capazes de catalisar a hidrólise do PBAT. Estes microrganismos são em geral encontrados em ambiente de compostagem ou, no caso da bactéria *Clostridium*, ambiente anaeróbio (WALLACE et al., 2017).

Além da degradação hidrolítica, a radiação solar também leva à cisão de cadeia do polímero PBAT, favorecendo a formação de substâncias de baixa massa molar (KIJCHAVENGKUL et al., 2010a). Posteriormente, estas substâncias podem ser assimiladas pelos microrganismos e convertidas em CO_2, H_2O e/ou CH_4. Também pode ocorrer incorporação do carbono do polímero à biomassa de microrganismos (CHANDRA, RUSTGI, 1998; SHAH et al., 2008). Zunstein et al. (2018) demostraram, por abordagem baseada em marcação com ^{13}C e espectrometria de massa de íons secundários em nanoescala, que o carbono de cada unidade monomérica do PBAT foi usado por microrganismos do solo, para ganhar energia e formar biomassa.

O método mais comum para avaliar a biodegradação é a respirometria, que quantifica a porcentagem de mineralização. Esta é definida como a razão entre a massa de gás carbônico liberado pela biodegradação e a massa de gás carbônico que seria liberada se todo carbono polimérico fosse mineralizado (KIJCHAVENGKUL et al., 2006).

Palsikowski et al. (2018a) obtiveram resultado de 21% para a mineralização do PBAT modificado com um aditivo extensor de cadeia após o período de 180 dias de ensaio em solo. Os autores realizaram também estudo da desintegração do PBAT em solo e observaram que a presença do extensor de cadeia altera o processo de degradação hidrolítica das amostras, tornando-o mais lento.

A formação de reticulação decorrente do processo de fotodegradação pode reduzir a acessibilidade de microrganismos às cadeias poliméricas e, consequentemente, interferir no processo de biodegradação. Em estudo prévio, conduzido por Kijchavengkul et al. (2008b) para amostras de filmes de PBAT e dióxido de titânio (expostas à radiação ultravioleta em laboratório) com teor de gel de 10%, 30%, 50% e 70%, as taxas de mineralização avaliadas pela norma ASTM D5338/2003 (condições simuladas de compostagem) foram 36%, 43%, 21% e 24%, respectivamente.

Além dos maiores valores de mineralização para formulações com teores de gel de até 30%, as amostras também apresentaram formação de biofilme, visualizado em imagens de microscopia eletrônica de varredura, o que não foi observado para o restante das formulações (KIJCHAVENGKUL et al., 2008b). O biofilme consiste em uma comunidade complexa e

estruturada de microrganismos, envoltos por uma matriz extracelular de polissacarídeos, aderidos a uma superfície (COSTERTON et al., 1995).

Com base nos resultados de mineralização e em imagens de microscopia, os autores concluíram que o processo de reticulação pode reduzir a biodegradabilidade do polímero (KIJCHAVENGKUL et al., 2008b). A reticulação torna os filmes de PBAT menos flexíveis, o que pode limitar a acessibilidade dos microrganismos às cadeias poliméricas (KALE et al., 2007).

Saadi, Cesar e Bewa (2013) realizaram teste de biodegradação do PBAT em solo e composto esterilizados e posteriormente inoculados com fungos, em temperaturas de 30 ºC (solo) e 58 ºC (composto). Os valores de mineralização atingidos em solo e composto foram 11% e 35%, respectivamente. Os autores também realizaram um estudo sobre produtos de degradação do PBAT em ambiente de compostagem empregando a técnica de ionização por dessorção a laser assistida por matriz, seguida pela detecção em um analisador do tipo tempo de vôo (MALDI-TOF). Por meio dessa técnica foram identificados oligômeros formados por 1,4-butanodiol, ácido tereftálico e ácido adípico.

Witt et al. (2001) conduziram a degradação do PBAT comercial em pó em meio de cultura inoculado com o microrganismo *Thermomonospora fusca*, actinomiceto termofílico isolado de ambiente de compostagem. Os autores empregaram a técnica de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa para identificar produtos de degradação. Foram identificados os monômeros 1,4-butanodiol, ácido adípico e ácido tereftálico, o monoéster butil adipato (BA), de ácido adípico (A) e butanodiol (B), além de um diéster (BAB).

3.4. Estudos ecotoxicológicos do polímero PBAT

A Ecotoxicologia permite avaliar a capacidade de substâncias químicas (isoladas ou em combinação) e amostras ambientais como solo, água e sedimento causarem efeitos deletérios aos organismos expostos (NEWMAN; UNGER, 2002).

Não há métodos padronizados sobre a quantificação de plásticos e seus produtos de degradação em solo e as consequências reais para as águas subterrâneas são incertas, sendo de grande relevância a realização de pesquisas que avaliem a dinâmica, o destino e os efeitos destes materiais em ambiente terrestre (BLÄSING; AMELUNG, 2018).

Muitos estudos e regulamentações ambientais consideram a toxicidade de substâncias de forma isolada e individual. Porém, no ambiente, os organismos estão expostos, simultaneamente, a um grande número de produtos químicos diferentes. A avaliação da toxicidade de uma mistura baseada somente em dados toxicológicos de seus compostos

individuais pode levar à subestimação ou superestimação significativas do risco potencial que uma mistura pode apresentar (HEYS et al., 2016).

Diferentes substâncias presentes em uma mistura complexa como o solo podem apresentar os seguintes efeitos: aditivos - a toxicidade da mistura é a soma das toxicidades individuais dos componentes; sinergísticos - a toxicidade da mistura é superior à soma das toxicidades de cada composto; antagônicos - a toxicidade da mistura é inferior à soma das toxicidades de cada composto (HERNÁNDEZ et al., 2013; BEYER et al., 2014; MARIN-MORALES et al., 2016); e potencializador – o efeito de uma substância fracamente ativa é aumentado na presença de um ou mais outros químicos da mistura (HERNÁNDEZ et al., 2013).

Witt et al. (2001) empregaram testes de toxicidade com *Daphnia magna* (norma DIN 38412, parte 30, 1989) e *Photobacterium phosphoreum* (norma DIN 38412, parte 34, 1997), após a degradação de PBAT em pó em meio de cultura contendo o microrganismo *Thermomonospora fusca.* Não foram observados efeitos toxicológicos significativos.

O teste com *Daphnia magna* permite avaliar o efeito danoso para a mobilidade deste organismo. Para isso, indivíduos jovens desses organismos são expostos por um período de 24 horas a várias diluições de uma amostra. O teste com a bactéria luminescente *Photobacterium phosphoreum* mede a radiação bioluminescente da bactéria, após 30 minutos em contato com diluições da amostra teste. O efeito tóxico é mensurado pela medição comparativa de emissão de luz de bactérias expostas a uma série de diluições de uma amostra em relação à luz emitida de um controle (bactérias em suspensão apenas em diluente) (STUHLFAUTH, 1995).

O polímero PBAT comercial, Ecoflex®, é certificado como compostável pela norma americana ASTM D6400 (2019). Para a obtenção dessa certificação, o material não deve interferir no crescimento e desenvolvimento de plantas, o que deve ser verificado pelo guia 208 da Organização de Cooperação e do Desenvolvimento Econômico - OECD (2003). Este teste avalia os efeitos do material sobre a germinação e crescimento da planta, para diferentes espécies. Para isso, as sementes são adicionadas em amostra de solo (controle) e misturas deste solo com 25% e 50% de composto (produzidas ao longo de 12 semanas, após adição do polímero). As plantas empregadas para avaliação ecotoxicológica do Ecoflex® (BREULMANN et al., 2016) foram: trigo (*Triticum sativum*), cevada (*Hordeum vulgare*), mostarda (*Sinapis alba*) e feijão mungo (*Phaseolus aureus*). Os resultados de germinação e biomassa obtidos neste estudo para as misturas de solo/composto não foram significativos em relação à amostra de referência, indicando que o polímero atendeu ao requisito referente à ecotoxicidade exigido pela norma ASTM.

Outro estudo para avaliar a ecotoxicidade com foco na compostagem do Ecoflex® foi realizado com minhocas (*Eisenia fetida*). Neste teste, os organismos foram expostos a um solo referência (controle) e a uma mistura do solo referência e o composto (75%:25%, respectivamente), no qual o polímero se degradou. Os parâmetros avaliados foram mortalidade e biomassa. As avaliações realizadas, após 7 e 14 dias do início do teste, indicaram que as misturas de solo com o composto não apresentaram efeitos adversos para sobrevivência e biomassa do organismo usado no teste (SIEGENTHALER et al., 2012).

Também foram realizados com o produto Ecoflex® (em pó) testes de toxicidade aguda com ratos (OECD 423/2001), irritação de pele (OECD 404/2002) e irritação de olhos (OECD 405/2012) em coelho, sensibilização de pele de porco da Guiné (OECD 406/1992) e avaliação de mutagenicidade pelo teste de *Salmonella/*microssomo (Teste de Ames – OECD 471/1997). Para nenhum dos testes realizados foram constatados efeitos adversos (SIEGENTHALER et al., 2012).

Um dos principais desafios para a avaliação de plásticos sobre a qualidade de uma matriz ambiental, como o solo, é determinar a concentração do material a ser estudado. Por se tratar de uma nova área de pesquisa, não existe ainda um consenso a respeito dessa questão, mas, com base na literatura, algumas considerações já podem ser feitas.

A norma britânica BS 8472 (2011) consiste em uma importante referência neste contexto, pois sugere que amostras de plásticos sejam submetidas ao envelhecimento acelerado, seguido de teste de mineralização, seguido do ensaio de fitotoxicidade. A concentração sugerida é de 6 g de plástico para 3 Kg de solo, ou seja, 0,2% de plástico. Esta norma sugere a realização do ensaio de mineralização pelo método da respirometria, conforme a norma ISO 17556/2012, a qual é similar à norma ASTM D5988/2012, bem como a avaliação de fitotoxicidade por meio do guia da OECD 208 (2003).

É possível estimar o quanto a concentração recomendada pela norma representa em relação à concentração real em campo. Para estimar a concentração real, pode ser feita uma avaliação a partir da densidade do solo, densidade e espessura do plástico (INNOCENTI, 2005). Por exemplo, ao considerar um filme de PBAT de 50 μm de espessura (densidade: 1,26 g/cm^3) (BASF, 2013), a densidade do solo igual a 1,3 g/cm^3 (CETESB, 2013) e um volume de solo de 8.000 cm^3 (considerando que o filme é distribuído em uma camada de 20 centímetros do solo e uma área hipotética de 400 cm^2), teríamos uma concentração de 0,02%. Portanto, a concentração de 0,2% representa uma ordem de grandeza acima da esperada para a concentração de plástico, após sua aplicação em solo. Utilizar uma concentração acima da

esperada em campo pode maximizar a possibilidade de detecção dos efeitos. Assim, caso a toxicidade não seja verificada nesses níveis mais altos, pode-se assumir que as doses normais não conferem risco ambiental (WITT et al., 2001; INNOCENTI, 2005).

No presente trabalho, diferentes organismos teste foram empregados para avaliação de ecotoxicidade referente ao PBAT. Os próximos itens da revisão bibliográfica abordam os bioensaios empregados neste estudo.

3.4.1. *Lactuca sativa*

Ensaios *in vivo* realizados com alface (*Lactuca sativa*) permitem avaliar a fitotoxicidade de compostos químicos e de amostras ambientais como solo, sedimentos, águas superficiais e subterrâneas. As principais vantagens do uso deste organismo-teste são a rápida germinação, baixo custo, simplicidade e reprodutibilidade do teste, além da necessidade de pequenos volumes de amostras para a avaliação (PRIAC; PIERRE-MARIE; CRINI, 2017).

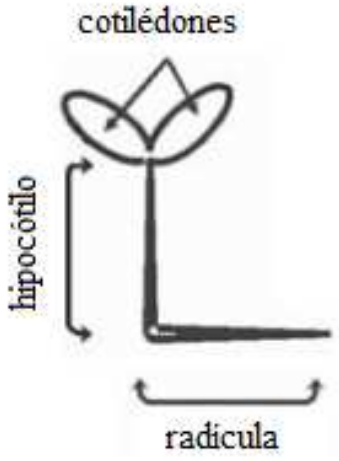
Banks e Schultz (2005) compararam, por meio do teste de germinação, a sensibilidade de diferentes espécies vegetais (alface - *L. sativa*, painço - *Panicum miliaceum*, rabanete - *Raphanus sativus*, trevo vermelho - *Trifolium pratense* e trigo - *Triticum aestivum*) a solo contaminado com compostos derivados do petróleo. Os autores observaram que *L. sativa* foi a única espécie que apresentou diferença estatisticamente significativa da germinação, em relação ao controle (solo não contaminado), sendo considerado o organismo mais sensível, portanto mais eficiente para a avaliação de toxicidade.

Martin-Closas, Botet e Pelacho (2014) testaram os produtos de degradação de PBAT: 1,4-butanodiol e ácido adípico em diferentes concentrações (0, 5, 50 e 500 mg/L em meio de cultura). Os autores avaliaram, por meio de testes realizados com tomate (*Lycopersicon esculentum*) e alface (*L. sativa*), os parâmetros de germinação após 7 dias, crescimento das plantas após 90 dias (monitoramento de massa seca do broto e da raiz) e formação de prolina após 25 dias. A prolina é um aminoácido que se acumula em plantas, quando essa está sob estresse. Ela possui função osmoprotetora, auxiliando na manutenção da integridade proteica, enzimática e das membranas celulares (ASHRAF et al., 2011). Não foram verificadas correlações significativas entre a prolina e a germinação de sementes. O aumento da concentração de ácido adípico levou à diminuição da massa seca de raiz e broto, para o tomate e alface, e o aumento da concentração de 1,4-butanodiol não mostrou relação com toxicidade, para nenhum dos ensaios realizados pelos autores. Para ambos os organismos, verificou-se aumento crescente de concentração de prolina diretamente proporcional ao aumento da concentração de ácido adípico (MARTIN-CLOSAS; BOTET; PELACHO, 2014).

Serrano-Luiz, Martin-Closas e Pelacho (2018) avaliaram extratos aquosos de filmes *mulch* com PBAT em combinação com outros componentes como: amido termoplástico, farinha de cereal, poli (ácido lático) e poli (hidroxibutirato). Para a maioria das amostras não houve alteração da germinação, mas os autores reportaram comprometimento do crescimento de *Lycopersicon esculentue* e *Lactuca* sativa, decorrente da exposição aos extratos. A maioria dos extratos testados inibiu os parâmetros massa seca da raíz e massa seca da parte aérea. Os autores mencionaram a importância de confirmar se estes efeitos adversos seriam permanentes em solo.

Além da germinação, também pode ser avaliado em testes realizados com *L. sativa*, o crescimento das estruturas da raiz (hipocótilo e radícula), indicadas na Figura 14 (QURESHI; ARSHAD; BIBI, 2014; CAPAGNA-FERNANDES; MARIN; PENHA, 2016; PRIAC; PIERRE-MARIE; CRINI, 2017). Em alguns casos, compostos solúveis em concentrações baixas não afetam a germinação, mas podem inibir o alongamento da radícula ou do hipocótilo. Dessa forma, a inibição do alongamento dessas estruturas constitui um importante indicador complementar da germinação (SOBRERO; RONCO, 2004).

Figura 14 - Esquema da raiz de *L. sativa*, mostrando as regiões do hipocótilo e da radícula.



Fonte: adaptado de Sobrero e Ronco (2004).

Outros organismos também têm sido empregados para avaliação de fitotoxicidade de plásticos biodegradáveis em solo. Rychter et al. (2010) avaliaram o efeito fitotóxico do PBAT após diferentes períodos de degradação em solo (4, 10, 16 e 22 meses) e reportaram que não houve diferença significativa na germinação e biomassa em relação ao solo puro (sem adição do material) para *Lepidium sativum* (agrião), *R. sativus* (rabanete) e *Avena sativa* (aveia).

Harada et al. (2019) avaliaram germinação, crescimento e biomassa de *Phaseolus*

vulgaris (feijão) de solo após a degradação por 12 meses de blendas de PBAT e PLA com diferentes aditivos (negro de fumo, sílica de casca de arroz e fertilizante orgânico), sendo que não foi constatada inibição de nenhum dos parâmetros avaliados.

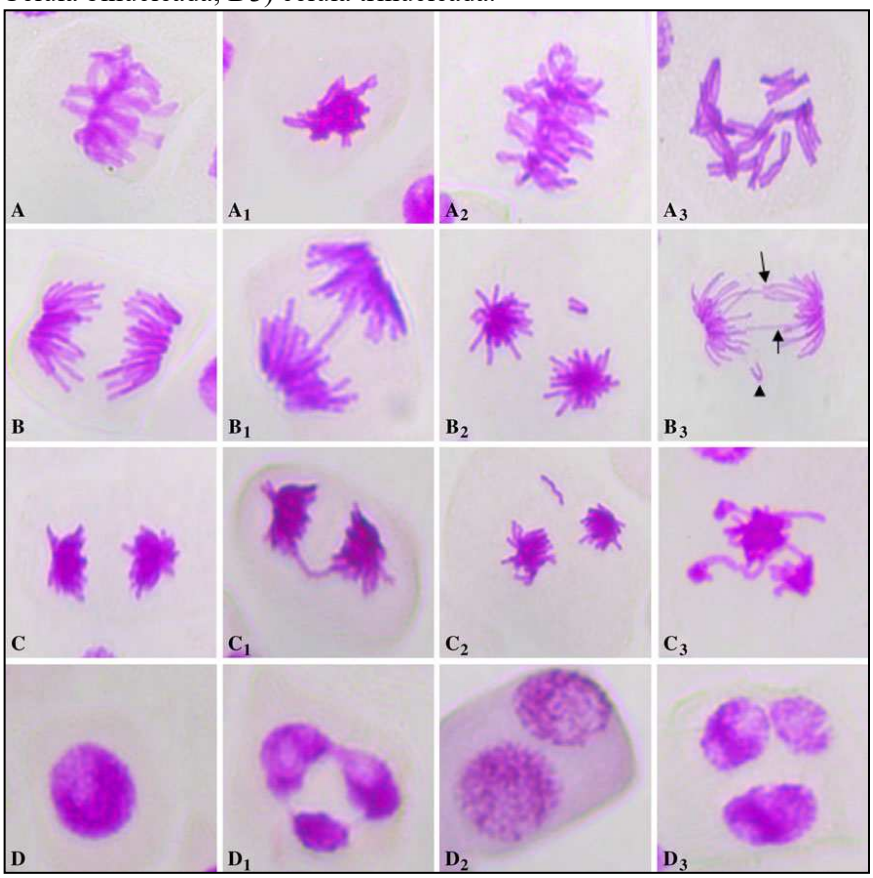
3.4.2. *Allium cepa*

Souza et al. (2013a, 2013b) e Palsikowski (2018b) relataram a utilização do organismo teste *Allium cepa* para avaliação do efeito ecotoxicológico associado à degradação de polímeros biodegradáveis. Este teste *in vivo* pode ser empregado para avaliação de potencial citotóxico, genotóxico e mutagênico de diferentes compostos e misturas ambientais (HERRERO et al., 2012; NEFIC et al., 2013; VENTURA-CAMARGO; ANGELIS; MARIN-MORALES, 2016; SOMMAGGIO et al., 2018a).

O termo genotóxico aplica-se ao agente capaz de promover danos ao material genético. São exemplos de alterações consideradas para avaliação de genotoxicidade: C-metáfases, metáfases poliplóides, metáfases com aderências, metáfases com perdas cromossômicas, anáfases e telófases com atrasos, quebras, perdas e pontes cromossômicas (LEME, MARIN-MORALES, 2009; NEFIC et al., 2013). O organismo *A. cepa* possui poucos cromossomos (2n=16), o que facilita a visualização de alterações em microscópio (SILVEIRA et al., 2017). Algumas alterações estão ilustradas na Figura 15.

Os micronúcleos (MN) também podem ser avaliados em células meristemáticas de *A. cepa*. Os MNs podem ser originados de fragmentos, provenientes de quebras cromossômicas, de perdas de cromossomos inteiros, ou ainda de expulsão de material genético amplificado na célula (FENECH, 2000; FERNANDES; MAZZEO; MARIN-MORALES, 2009). Essas estruturas podem ser consideradas *endpoint* de genotoxicidade, uma vez que podem ser expelidos na forma de mini célula, como reportado por Fernandes, Mazzeo e Marin-Morales (2007), em células meristemáticas de *A. cepa* expostas ao herbicida trifluralina.

Figura 15 - A) Metáfase normal; A1) Metáfase com aderência cromossômica; A2) Metáfase poliplóide (material amplificado); A3) C-metáfase; B) Anáfase normal; B1) Anáfase com ponte cromossômica; B2) Anáfase com perda cromossômica; B3) Anáfase com perda e ponte cromossômica; C) Telófase normal; C1) Telófase com ponte cromossômica; C2) Telófase com perda cromossômica; C3) Telófase multipolar com pontes cromossômica e aderência; D) Célula interfásica normal; D1) Célula com núcleo lobulado; D2) Célula binucleada; D3) célula trinucleada.



Fonte: Souza et al. (2013b)

Palsikowski et al. (2018b) empregaram o sistema *A. cepa* exposto às amostras de solubilizados de solo após degradação de blendas dos polímeros poli(ácido lático)-PLA e poli (adipato-co-tereftalato de butileno)-PBAT. Não foram constatados efeitos citotóxicos e genotóxicos associados ao polímero PBAT. Os autores indicaram a importância de considerar novas pesquisas incluindo diferentes organismos teste (plantas, algas, anelídeos, bactérias e células humanas).

Além da avaliação realizada com células meristemáticas de *A. cepa*, é possível utilizar também células F1. A região F1 da raiz corresponde ao local onde se encontram células que já passaram pelo processo de divisão celular (MA et al., 1995; BIANCHI; MANTOVANI; MARIN-MORALES, 2015). Dessa forma, a contagem de MNs nessas células permite estudar danos permanentes ao material genético, ou seja, o potencial mutagênico de um agente.

3.4.3. Linhagem celular HepG2/C3A

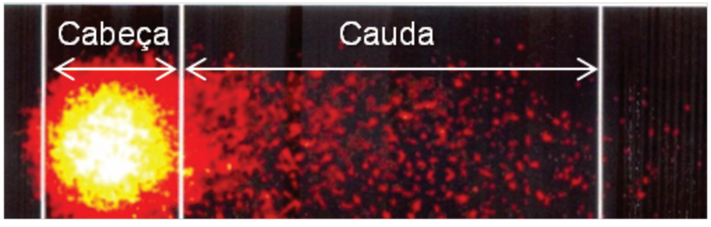
Os modelos *in vitro* com culturas de células são considerados eficientes para a avaliação de genotoxicidade de compostos químicos e amostras ambientais (MAZZEO et al., 2013; MANZANO et al., 2015; MARIN-MORALES et al., 2016; RAGAZZO et al., 2017). A linhagem celular HepG2/C3A é um clone derivado da linhagem de hepatocarcinoma humano HepG2. Este clone apresenta elevada produção de albumina e alfa fetoproteína, produtos específicos do fígado (KELLY, 1994).

Para uma avaliação preliminar da citotoxicidade em cultura celular, é recomendável empregar o ensaio colorimétrico, com o sal brometo de (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazólio) (MTT). A partir dessa avaliação é possível determinar a maior concentração da amostra estudada que permite valores de viabilidade celular acima de 80%, condição recomendada para a realização dos testes do cometa e do MN (CARDONA et al., 2015; SOMMAGGIO et al., 2018b). Este teste baseia-se na habilidade de células viáveis conseguirem converter em seu interior o sal MTT, o qual é solúvel em água, em um sal insolúvel de coloração roxa (formazan). Este produto não consegue atravessar as membranas de células viáveis (FOTAKIS; TIMBRELL, 2006).

A genotoxicidade em células HepG2/C3A pode ser avaliada pelo ensaio do cometa. Neste ensaio, células dispostas em lâminas cobertas de agarose são lisadas, o que permite a remoção de membranas e constituintes celulares solúveis (AZQUETA; COLLINS, 2011). Após este processo, são obtidos nucleóides, que são núcleos sem envoltório nuclear, mas com proteínas que mantêm a forma do núcleo. O DNA, então, é submetido a uma corrida eletroforética (OSTLING, JOHANSON, 1984).

O teste se baseia na quantificação dos fragmentos de DNA que migram para fora do nucleóide, em decorrência de danos ao DNA, formando uma estrutura similar a um cometa, conforme ilustrado na Figura 16 (BREGOLI; POZZI-MUCELLI; MANODORI, 2012).

Figura 16 - Migração do DNA no ensaio cometa.



Fonte: adaptado de Bregoli, Pozzi-Mucelli e Manodori (2012).

Os cometas podem ser analisados por inspeção visual ou usando *softwares* de análise de imagem (KUMARAVEL et al., 2009). A pontuação visual dá uma indicação qualitativa simples do dano do DNA. Em contraste, o uso de *software* para a análise de cometas fornece medidas quantitativas e mais reprodutíveis (GYORI et al., 2014). Um dos *softwares* que realiza este tipo de análise é o *Comet Assay IV*, o qual foi desenvolvido com base no estudo descrito por Olive, Banáth e Durand (1990). Os autores observaram que o momento da cauda foi o parâmetro mais sensível para o estudo de danos nas células. O "momento da cauda de Olive" determinado pelo *software Comet Assay IV* é adimensional e representa o produto da proporção da intensidade da cauda e a distância do centro da massa da cauda em relação ao centro de massa da cabeça do cometa (OLIVE; BANÁTH; DURAND, 1990).

O guia da OECD TG 489 (2014a) sobre o ensaio do cometa para teste *in vivo* recomenda o emprego do parâmetro porcentagem de DNA na cauda para análise e interpretação dos resultados. De acordo com Kumaravel et al. (2009), o parâmetro mais recomendado para fins regulatórios é a porcentagem de DNA na cauda. O momento de cauda em muitos trabalhos é apresentado sem unidades (micrômetros). A apresentação de resultados com unidades depende de calibrações dos *softwares* empregados. Além disso, as equações para o cálculo do momento podem variar entre diferentes *softwares.* Estas questões dificultam a comparação de resultados entre diferentes laboratórios. Ainda assim, este parâmetro também é aceito para fins científicos, sendo recomendada que sua apresentação seja realizada juntamente com parâmetros primários, como a porcentagem de DNA na cauda (HARTMANN et al., 2003; TICE et al., 2000; WANG et al., 2016).

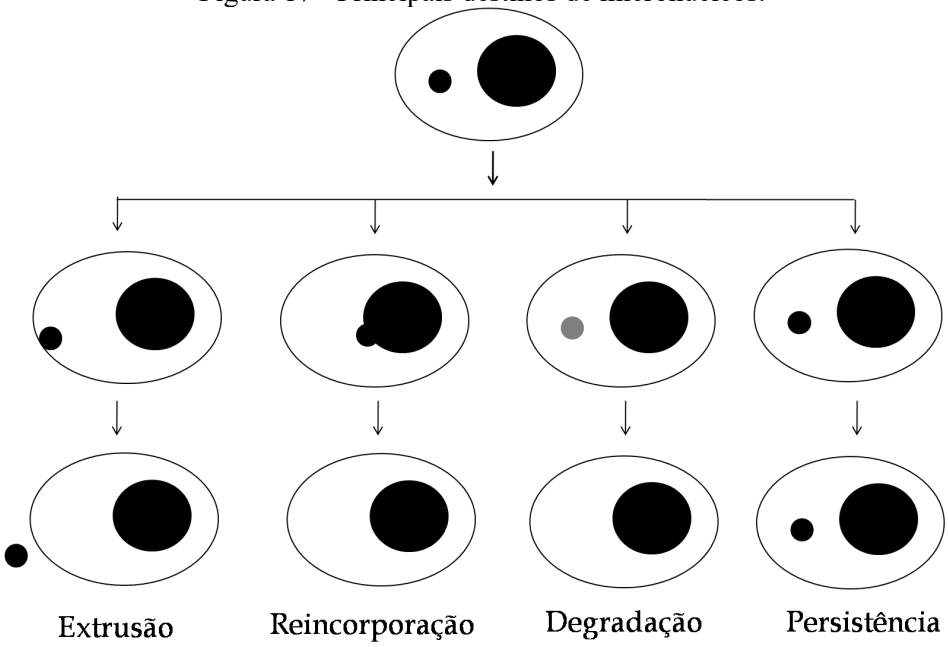
Outra ferramenta amplamente empregada para avaliação de genotoxicidade é o teste do MN *in vitro* com células de mamíferos, considerado um teste de genotoxicidade que avalia danos cromossômicos (OECD, 2014b; OECD, 2017, REN et al., 2017; VERHEYEN; DEUN; MIERT, 2017). Neste teste, as células que completaram um ciclo de divisão nuclear têm a sua citocinese bloqueada, devido ao uso de citocalasina B. Este agente inibe a polimerização da proteína actina, necessária para a formação do anel de microfilamentos responsável pela contração do citoplasma e a consequente clivagem da célula parental em duas células-filhas (FENECH, 2000; SALVADORI; RIBEIRO; FENECH, 2003; OECD, 2014b).

A restrição de análise feita apenas para células binucleadas evita subestimativas da frequência de MNs resultantes de contagem de células que não passaram por um ciclo de divisão celular (FENECH, 2007).

No guia 487 da OECD (2014b) recomenda-se que também seja quantificado no teste de micronúcleo o Índice de Proliferação com Bloqueio de Citocinese (CBPI), o qual indica o número médio de núcleos por célula. Uma redução significativa do CBPI, em relação ao controle, consiste em um indicador de citotoxicidade. Além disso, outros parâmetros de genotoxicidade como broto nuclear e pontes também podem ser avaliados.

Hintzche et al. (2017) realizaram uma revisão de literatura sobre as diferentes possibilidades para o destino de MNs, após sua formação, com base em estudos *in vitro* (células humanas e células de hamsters) e *in vivo* (experimentos com ratos). Os principais mecanismos propostos são: degradação, reincorporação, extrusão e persistência (Figura 17). Segundo os autores, a degradação ocorre mais raramente, enquanto a reincorporação é mais frequente. A maioria dos MNs considerados na revisão apresentou persistência.

Figura 17 - Principais destinos de micronúcleos.



Fonte: adaptado de Hintzche et al. (2017).

No caso da célula fazer uso normal de DNA micronuclear persistente, que não sofreu alteração e/ou reincorporação durante o próximo evento de mitose da célula, podem ser originadas células filhas sem mutações. O MN também pode ser degradado no citoplasma, inativado ou perdido. Contudo, se a célula sobreviver com MN, ela poderá desencadear um processo tumoral. Outra possibilidade é a extrusão do MN para fora do citoplasma. Caso a célula que sofreu o processo de extrusão não sobreviva, não haverá risco para o organismo,

podendo inclusive ser um evento natural de eliminação de células com DNA danificado (HINTZCHE et al., 2017).

Outras duas possibilidades para o destino de células micronucleadas são: cromotripsis e apoptose. O processo de cromotripsis refere-se a um evento catastrófico a nível cromossômico, caracterizado pela ocorrência de um elevado número de quebras no DNA de um ou de vários cromossomos, seguido da sua reorganização de forma aleatória (STEPHENS et al., 2011). Alguns estudos associam este fenômeno ao câncer e doenças congênitas (KLOOSTERMAN; CUPPEN, 2013; HIRSCH et al., 2013). A apoptose consiste em uma forma de morte celular essencial no desenvolvimento e homeostase do tecido (SAIKUMAR et al., 1999). Este mecanismo de morte programada também pode ocorrer nos processos normais de eliminação de células micronucleadas (DECODIER et al., 2002).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Preparo, caracterização e seleção de filmes *mulch* de PBAT

A matriz polimérica utilizada neste estudo foi o PBAT "Ecoflex F Blend C1200" (BASF), cujas propriedades estão compiladas na Tabela 2. Os aditivos empregados foram o negro de fumo BP 460 (CABOT), o estabilizador HALS Tinuvin 783 (BASF) e o estabilizador fenólico vitamina E (α-tocoferol T3251) de pureza 96% (Sigma Aldrich).

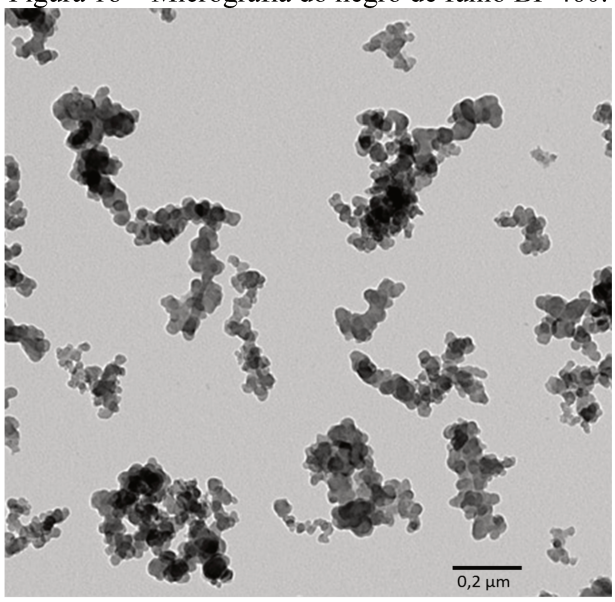
Tabela 2 - Propriedades do PBAT Ecoflex F Blend C1200.

Propriedade	**Resultado**
Densidade	1,25-1,27 g/cm³
Índice de fluidez	2,70-4,90 g/10 min
Temperatura de fusão	110-120 °C
Alongamento na ruptura*	560-710 %
Resistência à tração*	35-44 N/mm²

*propriedades estimadas para filmes de 50 µm de espessura. Fonte: (BASF, 2013)

O negro de fumo empregado neste estudo é de alta estrutura com tamanho médio de partícula primária de 29 nm, produzido pelo processo de fornalha (CABOT, 1988). Uma imagem de microscopia eletrônica de transmissão referente ao negro de fumo, disponibilizada pelo fornecedor, encontra-se apresentada na Figura 18.

Figura 18 – Micrografia do negro de fumo BP 460.



Fonte: CABOT (1988).

Foram conduzidos 2 planejamentos experimentais 2^2 do tipo composto central rotacional, totalizando 11 amostras para cada planejamento. Em um deles, os fatores variados

foram as concentrações de negro de fumo e Tinuvin 783 (estabilizador HALS). No outro, foram variadas as concentrações de negro de fumo e vitamina E. A matriz de cada planejamento, com os níveis codificados e concentrações em massa dos aditivos, encontra-se apresentada na Tabela 3, na qual também estão indicados os valores médios de espessura dos filmes.

As concentrações de negro de fumo e HALS foram definidas com base em dados da literatura (KIJCHAVENGKUL et al., 2011; POVEDA, 2015). A mesma faixa de variação foi adotada para a vitamina E.

As amostras foram preparadas no Laboratório de Processamento de Polímeros da Faculdade de Engenharia Química-UNICAMP (Responsável: Profa. Dra. Lucia Helena Innocentini Mei), em um misturador tipo Drais (MH Equipamentos) e submetidas à pressão a quente para obtenção de placas que foram picotadas para alimentação na extrusora. Em seguida, os filmes foram preparados em extrusora balão da marca AX Plásticos, modelo AX16/26 (L/D=26), com perfil de temperatura de 130 °C (zona 1), 140 °C (zona 2) e 150 °C (zona 3) e velocidade de 5,5 rpm. Também foi preparada uma amostra sem aditivos, somente com o polímero puro, empregando-se as mesmas etapas de processamento.

Tabela 3- Matriz de planejamento dos filmes de PBAT com as combinações “negro de fumo e HALS” e “negro de fumo e Vitamina E”.

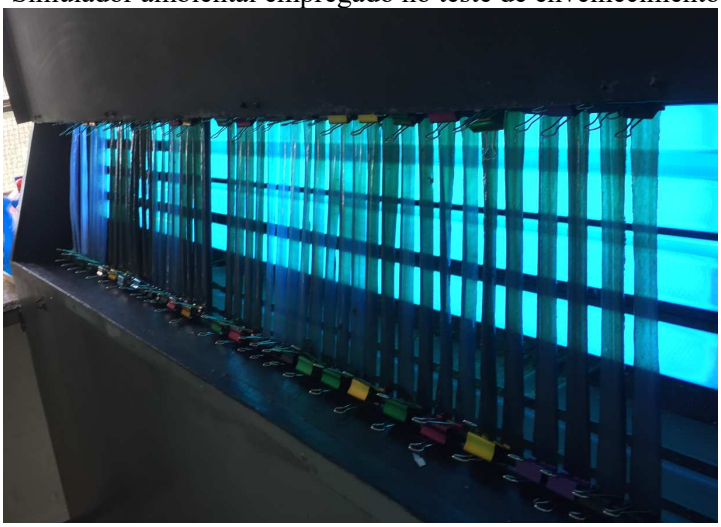
Amostras		Nível codificado		Concentração (% em massa)		Espessura (µm)
		Negro de fumo	HALS	Negro de fumo	HALS	
Filmes de PBAT com negro de fumo e HALS	NF0.1T1.0	-1,414	0	0,1	1,0	32±6
	NF0.5T0.5	-1	-1	0,5	0,5	34±6
	NF0.5T1.5	-1	+1	0,5	1,5	31±6
	NF1.0T0.1	0	-1,414	1,0	0,1	38±3
	NF1.0T1.0(1)	0	0	1,0	1,0	33±5
	NF1.0T1.0(2)	0	0	1,0	1,0	40±5
	NF1.0T1.0(3)	0	0	1,0	1,0	41±5
	NF1.0T2.0	0	+1,414	1,0	2,0	46±8
	NF1.5T0.5	+1	-1	1,5	0,5	43±2
	NF1.5T1.5	+1	+1	1,5	1,5	37±5
	NF2.0T1.0	+1,414	0	2,0	1,0	33±4
Amostras		**Nível codificado**		**Concentração (% em massa)**		**Espessura (µm)**
		Negro de fumo	**Vitamina E**	**Negro de fumo**	**Vitamina E**	
Filmes de PBAT com negro de fumo e Vitamina E	NF0.1V1.0	-1,414	0	0,1	1,0	41±4
	NF0.5V0.5	-1	-1	0,5	0,5	39±4
	NF0.5V1.5	-1	+1	0,5	1,5	44±4
	NF1.0V0.1	0	-1,414	1,0	0,1	43±5
	NF1.0V1.0(1)	0	0	1,0	1,0	41±6
	NF1.0V1.0(2)	0	0	1,0	1,0	41±8
	NF1.0V1.0(3)	0	0	1,0	1,0	35±4
	NF1.0V2.0	0	+1,414	1,0	2,0	41±6
	NF1.5V0.5	+1	-1	1,5	0,5	40±4
	NF1.5V1.5	+1	+1	1,5	1,5	44±7
	NF2.0V1.0	+1,414	0	2,0	1,0	41±5

Fonte: O autor (2019)

Determinou-se, previamente ao processamento, a temperatura de perda de massa para os aditivos HALS e vitamina E, pela técnica de Termogravimetria, realizada com 10 mg de cada material e taxa de aquecimento de 20 ºC/min em atmosfera de ar. O equipamento utilizado para avaliação do HALS foi da marca Shimadzu, modelo TGA-50M e o equipamento empregado na avaliação da vitamina E foi da marca Mettler Toledo, modelo TGA/DSC1, no Laboratório de Caracterização de Biomassa, Recursos Analíticos e de Calibração da Faculdade de Engenharia Química-UNICAMP.

O ensaio de envelhecimento acelerado foi realizado com base na norma ASTM G154/2012, em um simulador ambiental desenvolvido por Felisberti, Sanchez e Saron (2000). O equipamento e a disposição das amostras encontram-se ilustrados na Figura 19.

Figura 19 - Simulador ambiental empregado no teste de envelhecimento acelerado.



Fonte: O autor (2019)

Para a determinação do tempo do ensaio, foram consideradas as culturas de morango, para as quais a prática de *mulching* é consolidada no Brasil. Considerando que a produção de morango pode se estender por até 9 meses após o plantio (GALEGÁRIO et al., 2005) e que o filme *mulch* pode ser aplicado até 40 dias após o plantio (PASSOS, 2013), têm-se uma estimativa do tempo para a exposição do material à radiação solar em campo, de 230 dias. Para estimar o tempo de exposição das amostras no equipamento de envelhecimento acelerado, que correspondesse ao referido período em campo, foram feitas as considerações descritas a seguir.

A radiação solar média no Brasil é de 16 MJ/m^2.dia (PEREIRA et al., 2017). Em 230 dias, a radiação total seria de 3.680 MJ/m^2. Deste total, estima-se que 6,3% (231,8 MJ/m^2) refere-se à radiação do tipo ultravioleta A (SCHIEKE; SCHROEDER; KRUTMANN, 2003).

A lâmpada ultravioleta empregada no ensaio (Cleo Professional 80W-R) possui especificação de 200 W/m^2 para radiação ultravioleta A, o que implica em uma radiação de 14,4 MJ/m^2 em um dia de ensaio, considerando 2 ciclos de 12 horas por dia, sendo 10 horas de radiação e 2 horas de condensação em cada ciclo.

Para estimar o tempo de ensaio, a radiação esperada (231,8 MJ/m^2) foi dividida pela radiação diária fornecida pelo equipamento (14,4 MJ/m^2), resultando na definição de 16 dias para o ensaio de envelhecimento acelerado.

Os valores de temperatura e umidade (mínimos e máximos) atingidos ao longo do ensaio foram quantificados por um termohigrômetro da marca Hikari, modelo HK-T240 e registrados semanalmente. Ao longo do experimento, os valores mínimos de temperatura e umidade variaram entre 36-42 °C e 25-37%, respectivamente. Os valores máximos de temperatura e umidade variaram entre 47-62 °C e 53-72%.

Os filmes de PBAT puro se fragmentaram após 9 dias de ensaio e foram removidos do simulador ambiental. Novas amostras foram colocadas e mantidas por apenas 4 dias, com o objetivo de obter corpos de prova com adequada integridade para futuros testes mecânicos. A amostra NF0.1V1.0 foi retirada após 14 dias de exposição, pelo fato de apresentar fragmentação dos corpos de prova.

A abreviação "NAT" foi empregada para se referir às amostras de filmes processados naturais, ou seja, que não foram expostas à radiação ultravioleta. A abreviação "UVA" foi empregada para as amostras de filmes processados, as quais foram submetidas ao teste de envelhecimento acelerado. Para diferenciar as amostras envelhecidas de PBAT puro após 4 e 9 dias de exposição no simulador ambiental, estas receberam as nomenclaturas de "PBATUVA" e "PBATUVA9", respectivamente.

Antes e após o ensaio de envelhecimento acelerado foram conduzidas as análises de cromatografia de permeação em gel, teor de gel, propriedades mecânicas e transmissão de luz.

4.1.1. Análise de massa molar por Cromatografia de Permeação em Gel (GPC)

A massa molar das amostras foi obtida por meio da dissolução em tetrahidrofurano-THF (grau HPLC) na concentração de PBAT de 2 mg/mL. As soluções de PBAT foram injetadas em um cromatógrafo de permeação em gel da marca Viscotek, modelo VE 2001, no Laboratório de Cromatografia por Exclusão de Tamanho da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Antes da injeção, as amostras solubilizadas foram filtradas em membrana de polivinilideno (PVDF) com porosidade de 0,45 μm.

A avaliação da influência dos fatores sobre a polidispersidade e massa molar numérica média ($\bar{M}n$) antes e após o envelhecimento foi realizada utilizando o *software* Statistica 7, com 95% de nível de confiança.

Para obter informações sobre o processo de cisão de cadeia, bem como ganho de massa molar por reticulação e/ou ramificação foi empregado o *software* CSDF4.1 desenvolvido por Canevarolo (2000).

4.1.2. Análise do teor de gel

Para a quantificação do teor de gel dos filmes, antes e após envelhecimento, foram dissolvidos 50 mg de PBAT em 5 mL de THF. As soluções foram passadas por filtros de porosidade 0,3 μm. Estes foram previamente secos a 50 °C até massa constante. Após a filtragem, procedeu-se nova secagem e pesagem dos filtros, até massa constante. A determinação do teor de gel foi feita dividindo-se o ganho de massa dos filtros, devido à

retenção da fração gel, pela massa inicial de polímero utilizada no preparo da solução (STLOUKAL et al., 2012). As análises foram feitas em duplicata. A avaliação da influência dos fatores sobre o teor de gel após o envelhecimento foi realizada utilizando o *software* Statistica 7, com 95% de confiança.

Para investigar a influência dos ciclos de condensação sobre a formação de gel, 8 amostras adicionais de PBAT puro foram retiradas em períodos de 0, 5, 10, 12, 22, 24, 29, 34 e 36 horas de exposição no simulador ambiental para quantificação do teor de gel.

Para ilustrar a formação de gel foram preparadas 2 soluções com 50 mg de PBAT em 5 mL de THF com as amostras NF1.5T1.5UVA e NF1.5V1.5UVA. No preparo das lâminas, foi utilizada uma gota de cada solução sobre cada lâmina, seguindo-se pelo seu recobrimento com lamínulas. Também foram preparadas lâminas após secagem da solução em temperatura ambiente. Neste caso, as estruturas de gel foram coletadas com uma pinça, depositadas sobre as lâminas. Sobre elas, adicionou-se uma gota de água destilada, e cobriu-se com lamínulas. As lâminas foram observadas em microscópio óptico da marca Nikon, modelo eclipse e-200 (Processo FAPESP 2016/11199-0), no Laboratório de Blendas e Compósitos-COBLEN, da Faculdade de Engenharia Química - UNICAMP.

A aquisição de imagens foi realizada com microscópio óptico da marca Leica, modelo DMLM, no Laboratório de Caracterização de Biomassa, Recursos Analíticos e de Calibração da Faculdade de Engenharia Química-UNICAMP.

4.1.3. Análise de propriedades mecânicas

Foram determinados o módulo de Young, o alongamento e resistência à tração de acordo com a norma ASTM D882-12 em máquina universal de ensaios da marca Tinus Olsen, modelo H5KS, em direção longitudinal da extrusão dos filmes, com velocidade de 500 mm/min e célula de carga de 5.000 N, no Laboratório de Caracterização de Biomassas e Resíduos do Departamento de Engenharia Térmica e de Fluídos da Faculdade de Engenharia Mecânica-UNICAMP.

Os corpos de prova foram preparados com 2,5 cm de largura e 10 cm de comprimento. Para avaliação dos resultados utilizou-se a média referente a 5 corpos de prova. A análise da influência dos fatores sobre as propriedades mecânicas antes e após o envelhecimento foi realizada utilizando o *software* Statistica 7, com 95% de nível de confiança. O mesmo *software* também foi empregado na realização do teste-t (95% de confiança) entre amostras naturais e envelhecidas.

4.1.4. Análise de transmissão de luz

As amostras foram submetidas à varredura no comprimento de onda da radiação fotossinteticamente ativa (RFA), entre 400 e 700 nm, em um espectrofotômetro da marca Shimadzu, modelo 1800, no Laboratório Caracterização de Biomassa, Recursos Analíticos e de Calibração da Faculdade de Engenharia Química-UNICAMP.

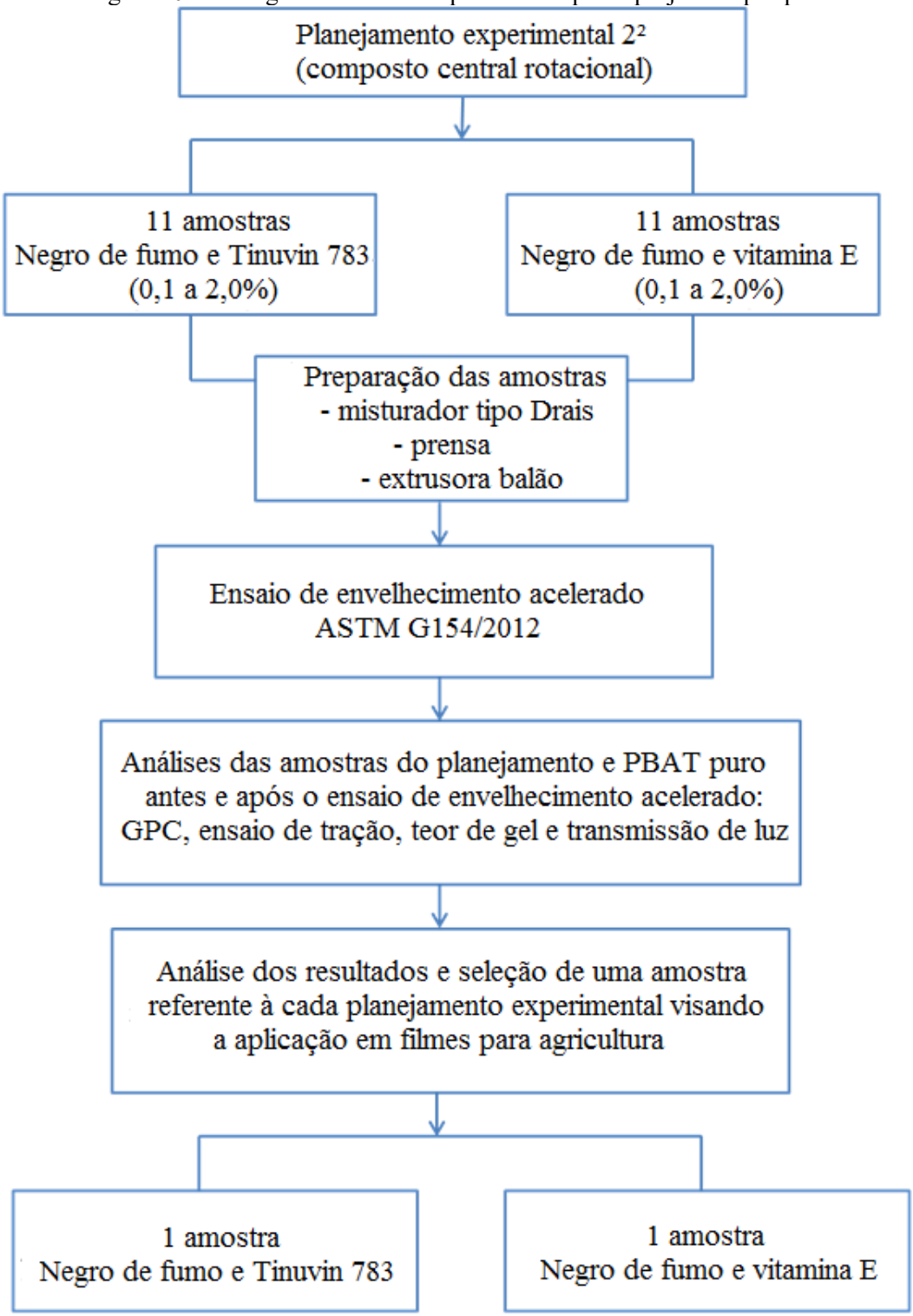
A percentagem média de transmissão de luz foi calculada pela divisão do valor da área abaixo do espectro na região avaliada, pela faixa de variação (700 – 400 = 300 nm) (KIJCHAVENGKUL et al., 2011). A análise foi realizada em duplicata. A avaliação da influência dos fatores sobre a transmissão de luz, antes e após o envelhecimento, foi realizada utilizando o *software* Statistica 7, com 95% de nível de confiança.

4.1.5. Seleção de amostras

Para cada combinação de aditivos foi feita a escolha de uma formulação mais interessante considerando a aplicação de filmes *mulch*. Esta avaliação considerou a resistência das amostras à perda de propriedades mecânicas após o envelhecimento acelerado, principalmente a resistência à tração e alongamento, bem como a capacidade de bloqueio de transmissão à luz no comprimento de onda da RFA.

As etapas da metodologia descritas até o presente item encontram-se apresentadas de forma sucinta no fluxograma da Figura 20, referente à primeira etapa deste projeto de pesquisa.

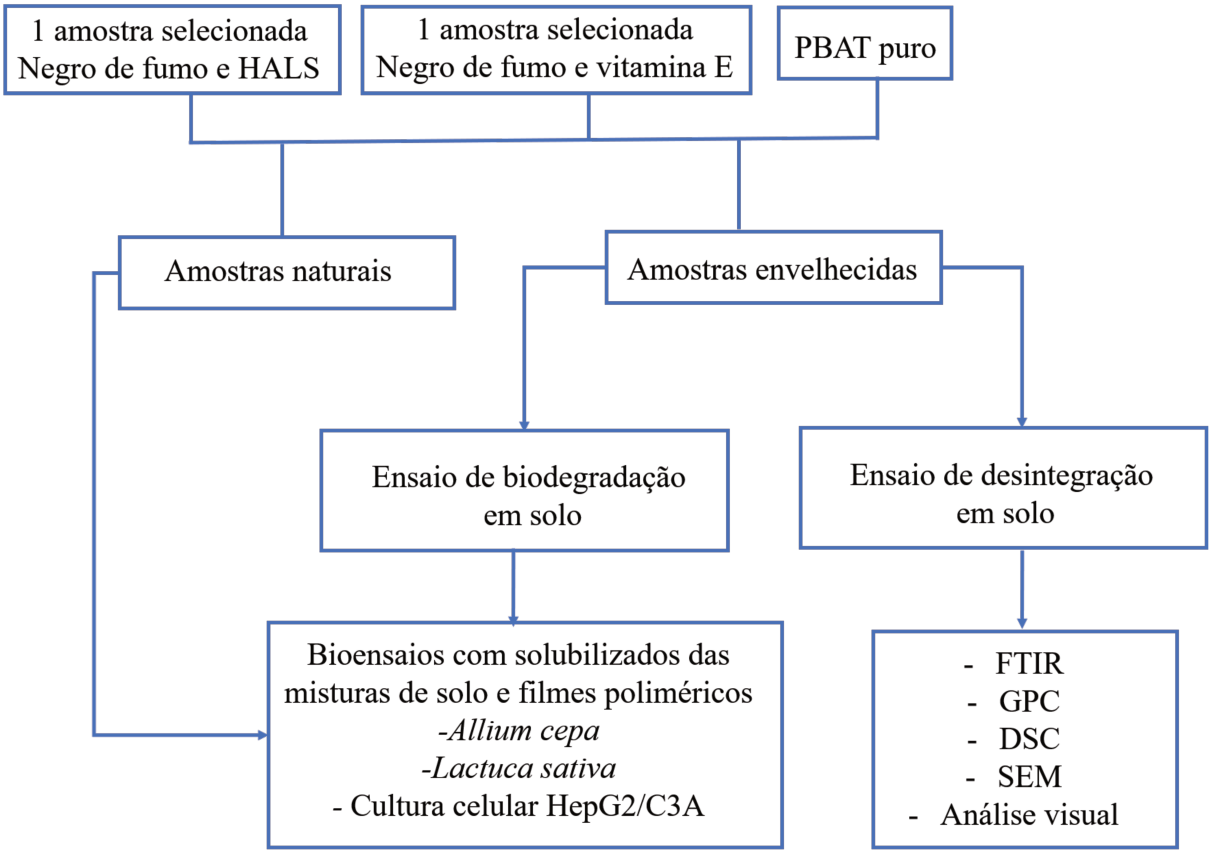
Figura 20 - Fluxograma referente à primeira etapa do projeto de pesquisa.



Fonte: O autor (2019)

As formulações escolhidas prosseguiram para a segunda fase do projeto, juntamente com o polímero PBAT puro, para estudos de desintegração/biodegradação em solo e dos efeitos ecotoxicológicos, conforme o fluxograma da Figura 21. As diferentes metodologias empregadas nesta segunda etapa estão apresentadas entre os itens 4.2 e 4.4.

Figura 21 - Fluxograma referente à segunda etapa do projeto de pesquisa.



Fonte: O autor (2019)

4.2. Análise de biodegradação por método respirométrico

Este ensaio foi realizado no Laboratório de Blendas e Compósitos-COBLEN (Responsável: Profa. Dra. Ana Rita Morales) da Faculdade de Engenharia Química – UNICAMP.

As formulações selecionadas, bem como a amostra de PBAT puro, foram submetidas ao ensaio de biodegradação em solo coletado no Instituto Biológico de Campinas, o qual foi seco em temperatura ambiente por 72 horas e posteriormente peneirado para obtenção de granulometria menor que 2 mm. Os parâmetros pH, matéria orgânica, carbono total e nitrogênio total foram determinados pelo Laboratório de Fertilidade do Instituto Agronômico de Campinas, e encontram-se reportados na Tabela 4. Os teores de argila, silte e areia, bem como a classificação granulométrica do solo, foram determinados pelo Laboratório de Física de Solos do Instituto Agronômico de Campinas e também foram reportados na Tabela 4.

Tabela 4 - Caracterização do solo.

Parâmetro	Unidade	Resultado
Matéria Orgânica	g/dm^3	19
Nitrogênio total	g/dm^3	0,1
Carbono total	g/dm^3	11,05
Argila (<0,002 mm)	%	27,7
Silte (0,053-0,002 mm)	%	14,9
Areia total (2-0,053 mm)	%	57,4
Classificação textural	-	Franco-argiloarenosa

Fonte: O autor (2019)

Para a determinação da umidade, 5 g de solo dispostos em cadinhos de porcelana foram submetidas à secagem em estufa por 24 h em temperatura de 105 °C, e o cálculo realizado conforme a equação 4 (MARIANI, 2005). A análise foi feita em triplicata.

$$\text{Umidade (\%)} = \frac{M_u - M_s}{M_s} \; x\; 100 \qquad \text{(Equação 4)}$$

Onde:
Mu = massa de solo úmido (g);
Ms = massa de solo seco (g).

Para a determinação da capacidade de retenção, 30 g de solo foram adicionados a um filtro de papel disposto em funil. Em seguida foram adicionados 30 mL de água destilada. Após 4 horas de escoamento, 10 g de solo, em triplicata, foram adicionados em cadinhos de porcelana, mantidos em estufa em temperatura de 105 °C por 24 h. O cálculo foi realizado conforme a equação 5 (MARIANI, 2005).

$$\text{Capacidade de rentenção (\%)} = \frac{M_u - M_s}{M_s} \; x\; 100 \qquad \text{(Equação 5)}$$

Onde:
Mu = massa de solo úmido após escoamento da água (g);
Ms = massa de solo seco (g).

Os resultados obtidos para umidade e capacidade de retenção foram 1,1% e 33,5%, respectivamente. Para o ensaio de biodegradação foi calculada a quantidade necessária de água destilada de forma a corrigir a umidade do solo para 60% de sua capacidade de retenção, de

acordo com a Equação 6 (MARIANI, 2005). Dessa forma, para correção da umidade de cada 100 g de solo foram adicionados 19 mL de água destilada.

$$QC_{100} = (0{,}6 \text{ x } CR) - U \qquad \text{(Equação 6)}$$

Onde:
QC100 = quantidade de água necessária para corrigir 100 g de solo (mL);
CR – capacidade de retenção de água do solo (%);
U – umidade do solo (%).

O grau de mineralização em solo foi determinado para as amostras envelhecidas das formulações selecionadas e PBAT puro, de acordo com a norma ASTM D5988/12, com algumas modificações (SAADI; CESAR; BEWA, 2013). O motivo de empregar amostras envelhecidas neste ensaio é a consideração de que, antes da incorporação em solo, o processo de degradação dos filmes *mulch* dispostos sobre a superfície do terreno já se inicia pelas condições ambientais como radiação e precipitações.

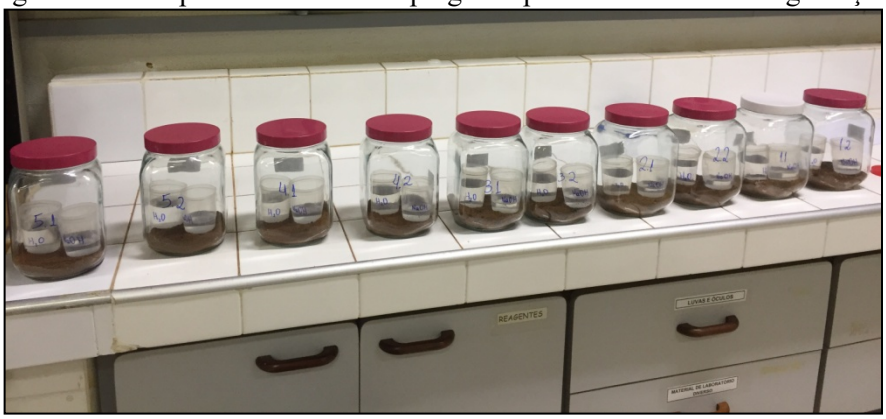
O teste preconizado pela norma ASTM D5988/2012 baseia-se na respirometria, método que determina a quantidade de dióxido de carbono liberada no processo de biodegradação aeróbia de plásticos por meio da captura do CO_2 em solução de hidróxido de bário. As principais modificações em relação à norma foram o uso de frascos de vidro ao invés de dessecador e o emprego de hidróxido de sódio ao invés de hidróxido de bário (MARIANI et al., 2007; SAADI; CESAR; BEWA, 2013).

Para o teste, foram utilizadas amostras de filme cortadas em formato de quadrados de 1 cm². Como material de referência, foi empregada a celulose microcristalina em pó (MC 500, Blanver Farmoquímica). Adicionou-se 400 mg da celulose em 200 g de solo.

A concentração de 400 mg de amostra para 200 g de solo foi adotada também para os filmes de PBAT. Esta quantidade é proporcional àquela recomendada pela norma britânica BS 8472/2011 (6 g de amostra para cada 3 kg de solo). Os ensaios foram conduzidos em duplicata.

As misturas foram mantidas em estufa à temperatura 28 °C durante 182 dias, em recipientes de vidro de 1,3 L, ilustrados na Figura 22.

Figura 22 - Recipientes de vidro empregados para o ensaio de biodegradação.



Fonte: O autor (2019)

Nestes recipientes, foram colocados frascos contendo 20 mL de solução de hidróxido de sódio (NaOH) 0,5 N (marca Dinâmica). Em intervalos de 4 dias (nas primeiras 2 semanas) e semanalmente (a partir da terceira semana), os frascos com NaOH foram retirados, e seu conteúdo adicionado em erlenmeyers de 250 mL. Adicionou-se 1 mL de solução saturada de $BaCl_2$ (marca Dinâmica) para a precipitação de carbonato e 3 gotas de fenolftaleína (marca Dinâmica). A solução foi titulada com ácido clorídrico (HCl) 0,5 N (marca Dinâmica). Após cada monitoramento, uma nova solução de NaOH foi adicionada em cada recipiente de vidro. Um recipiente com 50 mL de água destilada foi mantido em cada frasco ao longo do ensaio para manter a umidade.

O dióxido de carbono produzido em cada frasco reage com a solução de hidróxido de sódio e produz carbonato de sódio (Na_2CO_3), o qual é posteriormente precipitado com a solução de cloreto de bário ($BaCl_2$). A quantidade de dióxido de carbono produzida é determinada pela titulação da solução remanescente de NaOH com HCl. As reações envolvidas estão indicadas a seguir (SAADI; CESAR; BEWA, 2013):

$$CO_2 + 2\,NaOH \rightarrow Na_2CO_3 + H_2O$$
$$Na_2CO_3 + BaCl_2 \rightarrow 2NaCl + BaCO_3$$
$$NaOH + HCl \rightarrow NaCl + H_2O$$

A massa de dióxido de carbono produzida foi calculada de acordo com a equação 7 (MARIANI et al., 2007).

$$\text{mg } CO_2 = (B - V) \times N \times E \qquad \text{(Equação 7)}$$

Onde:
mg CO_2 – massa de dióxido de carbono produzida (mg);
B – volume de HCl 0,5N utilizado na titulação referente ao frasco contendo apenas solo (branco);

V – volume de HCl 0,5 N utilizado na titulação referente ao frasco contendo solo e amostras;
N – normalidade do HCl (0,5 N);
E – equivalente grama do CO_2 = 22.

Para o cálculo da percentagem de mineralização, o resultado da quantidade produzida de dióxido de carbono ($mgCO_2$) foi dividido pela massa de dióxido de carbono teórica ($mgCO_2_t$), que representa a quantidade máxima de CO_2 que pode ser liberada considerando o teor de carbono do material plástico determinado por análise elementar, conforme indicado na equação 8 (ASTM D5988/2012).

$$\text{mg } CO_2_t = \frac{44 \times C}{12} \qquad \text{(Equação 8)}$$

Onde:
$mgCO_2_t$ – massa de dióxido de carbono teórica (mg);
C- quantidade de carbono da amostra (mg);
44 – massa molar do dióxido de carbono;
12 – massa atômica do carbono.

A determinação de carbono para a celulose microcristalina e as amostras envelhecidas de PBAT, com e sem aditivos, foi realizada em um analisador elementar localizado no Laboratório de Recursos Analíticos e de Calibração – LRAC da Faculdade de Engenharia Química-UNICAMP, marca Elementar, modelo Vario MACRO Cube.

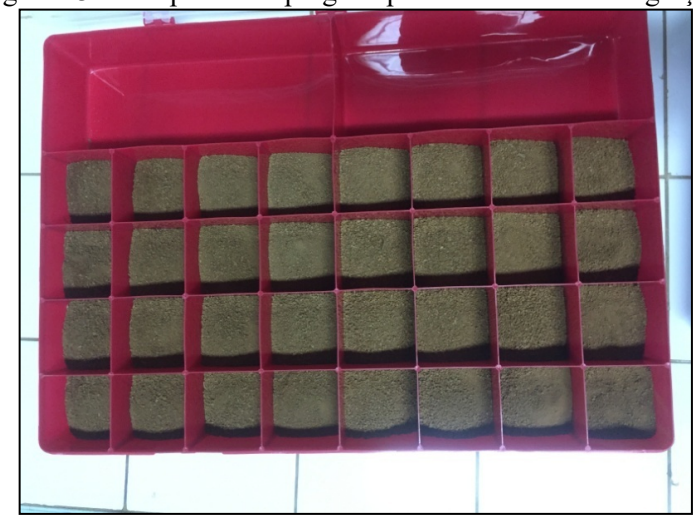
4.3. Análise de desintegração em solo

Este ensaio foi realizado no Laboratório de Blendas e Compósitos-COBLEN (Responsável: Profa. Dra. Ana Rita Morales) da Faculdade de Engenharia Química – UNICAMP.

Nesta etapa foi empregado o mesmo solo do ensaio de biodegradação, cuja caracterização encontra-se apresentada na Tabela 4. Em cada subdivisão do recipiente ilustrado na Figura 23, foram adicionados 100 g de solo (massa seca). A umidade do solo foi corrigida para 60% de sua capacidade de retenção de água, conforme descrito no item 4.2.

As amostras envelhecidas das formulações selecionadas e PBAT puro, com dimensões de 2 x 2,5 cm, foram colocadas a 3 cm de profundidade.

Figura 23 - Recipiente empregado para ensaio de desintegração.



Fonte: O autor (2019)

Após 15 dias, 4, 8 e 12 meses a partir do início do ensaio, as amostras dos diferentes materiais foram retiradas para monitoramento pelas técnicas descritas nos itens 4.3.1. a 4.3.5.

No monitoramento de 8 meses, constatou-se por avaliação tátil-visual que o solo estava muito seco, com agregados. Por esse motivo, após a retirada das amostras fez-se a quantificação de umidade do solo, sendo obtido o valor de 0,8%. Dessa forma, foi realizada adição de 19,3 mL de água para nova correção da umidade do solo para 60% de sua capacidade de retenção de água.

Para as amostras envelhecidas e posteriormente degradadas em solo por 15 dias, 4 meses, 8 meses e 12 meses, foram empregadas as seguintes nomenclaturas: “UVA_solo15d”, “UVA_solo4m” e “UVA_solo8m” e “UVA_solo12m”, respectivamente.

4.3.1. Caracterização estrutural e análise do índice de carbonila (IC) por Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)

A caracterização estrutural dos materiais, antes e após a degradação em solo, foi estudada pela análise de FTIR, utilizando um espectrômetro infravermelho localizado no Laboratório de Recursos Analíticos de Calibração da Faculdade de Engenharia Química-UNICAMP, da marca Thermo Scientific, modelo Nicolet 6700, na faixa de 4000 a 650 cm^{-1} e resolução de 4 cm^{-1}. O índice de carbonila (IC) foi determinado pela razão entre a absorbância referente à banda carbonila (1713 – 1716 cm^{-1}) e a absorbância da banda de referência (PALSIKOWSKI et al., 2018a). No presente estudo considerou-se como referência, a banda em 1018 cm^{-1}, associada à deformação angular dentro do plano de =C-H no anel de benzeno.

4.3.2. Análise visual

A análise visual foi realizada a cada período de monitoramento, sendo realizados registros fotográficos para ilustrar a desintegração das amostras.

4.3.3. Análise de morfologia por Microscopia Eletrônica de Varredura (SEM)

A técnica SEM foi empregada para avaliação morfológica da matriz polimérica das amostras ao longo do tempo. As amostras foram afixadas em suportes metálicos e cobertas com uma fina camada de ouro por 180 s, sendo empregadas corrente de 3 mA e voltagem de 1 V. As imagens foram realizadas com o microscópio da marca LEO Electron Microscopy, modelo Leo 440i em voltagem de 20 kV, no Laboratório de Recursos Analíticos de Calibração da Faculdade de Engenharia Química-UNICAMP. Pela análise de microscopia eletrônica de varredura foram avaliados indícios de degradação na superfície dos materiais.

4.3.4. Análise de massa molar por Cromatografia de Permeação em Gel (GPC)

Os valores de massa molar numérica média ($\bar{M}n$), massa molar ponderal média ($\bar{M}w$) e índice de polidispersidade (PDI) das amostras foram obtidos por meio da dissolução em solvente tetrahidrofurano-THF (grau HPLC) na concentração de PBAT de 2 mg/mL. Em seguida, as soluções foram filtradas em membrana de fluoreto de polivinilideno (0,45 μm) e injetadas em um cromatógrafo de permeação em gel da marca Viscotek, modelo VE 2001, no Laboratório de Cromatografia por Exclusão de Tamanho da Universidade Federal do Rio Grande do Sul-UFRGS. Para cada período de monitoramento foi quantificado o fator de degradação (k), dividindo-se o valor de $\bar{M}n$ de cada período monitorado pelo valor de $\bar{M}n$ obtido no monitoramento seguinte (AL-ITRY; LAMNAWAR; MAAZOUZA, 2012).

4.3.5. Análise de transições térmicas e grau de cristalinidade por Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

A análise de DSC foi realizada na Central Analítica do Instituto de Química-UNICAMP, em um equipamento modelo DSC Q100, marca TA Instruments, em atmosfera inerte de Argônio. As amostras foram aquecidas de 25 ºC até 160 ºC e mantidas nessa temperatura por 5 minutos. Em seguida, foram resfriadas até -80 ºC sendo esta temperatura mantida por 5 minutos. Posteriormente, as amostras foram aquecidas novamente até 160 ºC.

Pela análise de DSC foram obtidos os valores de temperatura de transição vítrea (Tg), temperatura de cristalização (Tc), temperatura de fusão (Tm), entalpia de fusão (ΔHm) e entalpia de cristalização (ΔHm).

O cálculo do grau de cristalinidade (Xc) foi realizado conforme a Equação 9 (FUKUSHIMA et al., 2012):

$$Xc = \frac{\Delta H_f}{\Delta H_m^{\circ} \times (1-w)} \times 100 \qquad \text{(Equação 9)}$$

Onde: ΔH_f : entalpia de fusão;
ΔH_m°: entalpia de fusão do PBAT 100% cristalino: 114 J/g (CHIVRAC et al., 2006);
w – fração mássica de aditivos.

4.4. Análises ecotoxicológicas por bioensaios

Os bioensaios foram realizados com amostras de solubilizado de solo, preparados com base na norma ABNT 10006 (2004), seguindo a proporção de 200 g de massa (base seca) de solo para 800 mL de água. O volume de água destilada acrescentado para o preparo de cada solubilizado e os valores de umidade das amostras de solo estão apresentados na Tabela 5.

As misturas foram submetidas à agitação mecânica por 5 minutos (Figura 24) e mantidas por repouso por 7 dias à temperatura ambiente. Após este período, as amostras foram passadas por membrana de filtração com porosidade de 0,45 μm e acondicionadas em geladeira. O pH dos solubilizados foi analisado com medidor da marca Quimis (Tabela 5). Todos os bioensaios foram realizados no Laboratório de Mutagênese Ambiental (Responsável: Profa. Dra. Maria Aparecida Marin-Morales) do Departamento de Biologia, no Instituto de Biociências da UNESP de Rio Claro.

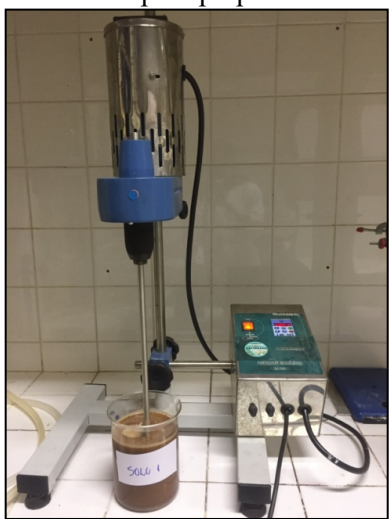
Para os solubilizados preparados no primeiro monitoramento, a partir do solo puro e misturas de solo com as amostras naturais, foi usada a abreviação "NAT_sol". Para os solubilizados preparados no segundo período de monitoramento, com solo puro e mistura de solo com amostras envelhecidas e biodegradadas por 182 dias, foi empregada a abreviação "UVA_bio_sol".

Tabela 5 – Valores de pH dos solubilizados

Amostra	NAT_sol			UVA_bio_sol		
	Quantidade de água (mL)	Umidade do solo (%)	pH	Quantidade de água (mL)	Umidade do solo (%)	pH
SOLO	797,8	1,1	7,2	771,0	12,8	6,4
PBAT	797,8	1,1	6,8	770,3	12,9	6,2
NF1.5T1.5	797,8	1,1	6,9	770,6	13,0	6,4
NF1.5V1.5	797,8	1,1	6,9	767,2	14,4	6,4

Fonte: O autor (2019)

Figura 24 - Agitação mecânica para preparo de amostra de solubilizado.



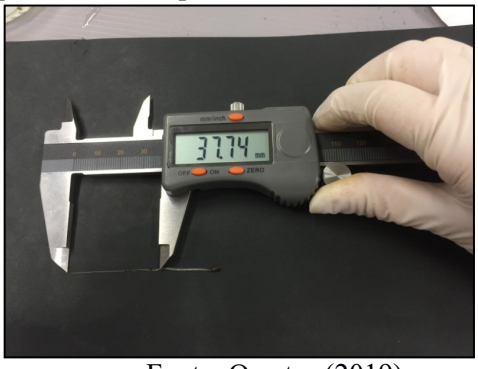
Fonte: O autor (2019)

4.4.1. Bioensaio - *Lactuca sativa*

O bioensaio com o organismo teste *L. sativa* foi realizado com a variedade Grand rapids da marca Isla, de acordo com metodologia proposta por Sobrero e Ronco (2004). Para cada tratamento, foram dispostas 20 sementes sobre papel filtro em placa de Petri. Os ensaios foram realizados em quintuplicata. O controle positivo (CP) foi realizado com a solução de sulfato de zinco 0,05 M. Inicialmente foi preparada uma solução mãe 0,3 M, pela dissolução de 8,63 g de Sulfato de Zinco (marca: Shynth) em 100 mL de água ultrapura. Uma alíquota de 7,5 mL dessa solução foi adicionada em 37,5 mL de água ultrapura, para ser então utilizada nos experimentos. O controle negativo (CN) empregado foi realizado com água ultrapura.

As placas de Petri foram mantidas em uma incubadora, no escuro, por 5 dias a 22 °C. Após este período todas as placas foram congeladas para posterior realização de medidas das radículas e dos hipocótilos, com um paquímetro digital (marca: Digimess), conforme ilustrado na Figura 25.

Figura 25 – Paquímetro usado para as medições de radícula em raiz de alface.



Fonte: O autor (2019)

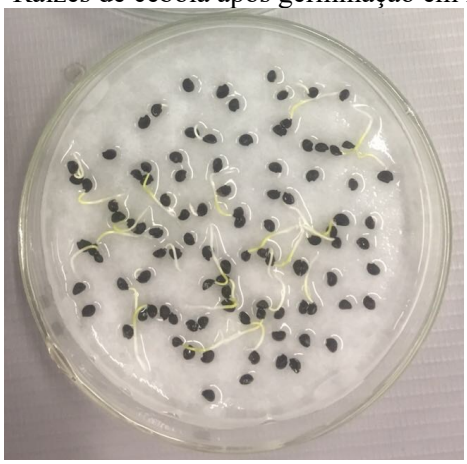
A análise estatística foi realizada com o *software* GraphPad Prism 8.0.1. Os dados de germinação, comprimento de hipocótilo e de radícula foram analisados pelo teste de normalidade D'Agostino & Pearson, seguido do teste Kruskal-Wallis. As análises foram realizadas para comparação dos resultados dos tratamentos com os do CN, com 95% de nível de confiança.

4.4.2. Bioensaio - *Allium cepa*

O bioensaio com *A. cepa* foi realizado de acordo com protocolo proposto por Grant (1982), com algumas modificações. Foram utilizadas sementes da variedade Baia periforme, da marca Isla. Em cada placa de Petri foram dispostas 100 sementes sobre papel filtro. Em seguida, adicionaram-se 6 mL de cada amostra de solubilizado nas placas contendo as sementes, sendo 3 placas para cada tratamento. Como controle negativo (CN) utilizou-se água ultrapura e como controle positivo (CP) foi utilizado solução de metanossulfonato de metila (MMS) 4 x 10^{-4} M, preparado a partir da diluição de 0,154 μL de MMS (marca: Sigma Aldrich) em 20 mL de água ultrapura.

As placas de Petri foram mantidas em incubadora a 22 °C. A germinação ocorreu em ambiente claro por 12 h e ambiente escuro por 12 h. As raízes foram coletadas após atingirem cerca de 1,5 cm de comprimento (Figura 26), tamanho obtido após 5 dias do início da germinação. Após a coleta, as raízes foram fixadas em Carnoy (3 partes de álcool etílico absoluto, marca Synth, e 1 parte de ácido acético glacial, marca LSChemicals), por 4 horas à temperatura ambiente. Passado este período, trocou-se o fixador por um novo recém-preparado. Em seguida as amostras foram acondicionadas em geladeira, até a confecção das lâminas.

Figura 26 - Raízes de cebola após germinação em incubação.



Fonte: O autor (2019)

As raízes foram submetidas, em placa de Petri, a 3 banhos, de 5 minutos cada, em água ultrapura. Em seguida, procedeu-se a hidrólise das raízes com ácido clorídrico (HCl) 1 N a 60 °C em banho-maria, por 8 minutos. A solução de HCl 1 M foi preparada com 83,3 mL de ácido clorídrico (LSChemicals) e 916,7 mL de água ultrapura.

A coloração foi feita pelo método de Feulgen em reativo de Schiff (FEULGEN; ROSSENBECK, 1924 apud MELLO;VIDAL, 1978), por 2 horas em ambiente escuro. Após este tempo, as raízes foram lavadas, por 3 banhos, em água ultrapura, para a retirada do excesso do reativo. Para o preparo do Reativo de Schiff, 300 mL de água de torneira foram aquecidos a 50 °C. Em seguida, acrescentou-se 1,5 g de fucsina básica (marca: Êxodo científica) e agitou-se a solução com auxílio de um bastão de vidro. Acrescentou-se 4,5 g de metabissulfito de sódio (marca: Impex) e 45 mL de HCl 1 M. A mistura foi agitada por 15 minutos e mantida em ambiente escuro por 24 horas. Adicionou-se 1 g de carvão ativado em pó (marca: Impex). A solução foi filtrada e armazenada, em geladeira, em frasco de vidro envolto por papel alumínio. A Figura 27 ilustra as raízes após o processo de coloração.

Figura 27 - Raízes de cebola, após coloração de Feulgen em reativo de Schiff.



Fonte: O autor (2019)

Para confecção das lâminas, foram cortadas as regiões do meristema e F1. Sobre cada uma, adicionou-se uma gota de carmim acético 2%. Este foi preparado pela dissolução de 2 gramas de Carmim (marca: Sigma) em 100 mL de solução de ácido acético glacial (marca: LS Chemicals) 45% em água ultrapura. Em seguida, o material foi coberto com lamínula, retirou-se o excesso de corante com papel filtro e flambou-se, cuidadosamente, a lâmina em lamparina, para não queimar o material biológico presente na lâmina.

As lamínulas foram retiradas após submersão em nitrogênio líquido. Posteriormente, as lâminas foram secas em temperatura ambiente. Após secagem, o material foi coberto com resina sintética Entellan (marca: Merck), sendo colocada uma nova lamínula sobre o material da lâmina. A análise das lâminas foi realizada em microscópio de luz (objetiva de 40 x) da marca Nikon, modelo eclipse e-200 (Processo FAPESP 2016/11199-0). Para análise de micronúcleos na região F1 foi empregada a objetiva de 100 x. A aquisição de imagens foi realizada com microscópio óptico da marca Leica, modelo DMLM, no Laboratório de Caracterização de Biomassa, Recursos Analíticos e de Calibração da Faculdade de Engenharia Química-UNICAMP.

Foram analisadas 500 células por lâmina, sendo 10 lâminas por tratamento, totalizando 5.000 células por tratamento. Após a análise calculou-se o índice mitótico-IM, o índice de alterações cromossômicas e nucleares- IACN e a frequência de MN em células meristemáticas e da região F1 conforme as equações 10, 11 e 12.

$$\mathrm{IM} = \frac{\text{número de células em divisão}}{\text{número de células observadas}}\ x\ 100 \qquad \text{(Equação 10)}$$

$$\text{IACN} = \frac{\text{número de alterações cromossômicas e nucleares}}{\text{número de células observadas}} \; x\,100 \quad \text{(Equação 11)}$$

$$\text{Frequência de MN} = \frac{\text{números de células com MN}}{\text{número de células observadas}} \; x\,100 \quad \text{(Equação 12)}$$

A análise estatística para os parâmetros IM, IACN e frequência de MN nas regiões meristemáticas e F1 foi realizada com o *software* GraphPad Prism 8.0.1, pelo teste de normalidade D'Agostino & Pearson, seguido do teste Kruskal-Wallis, para comparação dos resultados dos tratamentos com os resultados do CN, com 95% de nível de confiança.

4.4.3. Bioensaio - Cultura de células HepG2/C3A

As células HepG2/C3A utilizadas neste estudo foram obtidas no Banco de Células do Rio de Janeiro. As células foram mantidas em frascos de cultura de 25 cm² e foram cultivadas em 5 mL de meio essencial Eagle modificado por Dulbecco - DMEM (suplementado com 10% de soro fetal bovino e 0,1% de solução de antibiótico-antimicótico (penicilina 10.000 U.I./mL/ estreptomicina 10 mg/mL, Cultilab) em estufa de CO_2 a 37 °C, até atingir 80% de confluência. Os procedimentos e as soluções empregadas para manutenção das células estão apresentados no Apêndice A.

4.4.3.1. Ensaio do MTT

O ensaio do MTT foi realizado segundo descrito por Mosmann (1983) com algumas modificações. Desprezou-se o meio de cultura dos frascos com as células, os quais foram lavados duas vezes com solução de tampão fosfato salino (PBS). O excesso de PBS foi retirado dos frascos, com o auxílio de uma pipeta Pasteur. Em seguida, foram adicionados 500 µL de tripsina (0,25%), permanecendo no frasco por 5 minutos em estufa de CO_2 a 37 °C. Após este período, as células foram despregadas da parede do frasco por meio de leves batidas. Adicionou-se 2 mL de meio DMEM com soro a fim de inativar a tripsina. Na sequência, as células passaram por uma seringa de 1 mL e agulha fina para obtenção de células isoladas e uma suspensão celular mais homogênea. O conteúdo de cada 2 frascos foi transferido para um tubo de centrífuga e 40 µL do material foram adicionados em câmara de Neubauer, para contagem celular. O tubo foi centrifugado por 10 minutos a 1.500 rpm.

O sobrenadante de cada tubo foi descartado e o pellet foi ressuspendido em 1 mL de meio DMEM com soro. Foi retirada uma alíquota dessa suspensão, em volume calculado para obtenção de 2,3 x 10^6 células, e posteriormente acrescentou-se meio DMEM com soro de forma

a completar 10 mL. Em cada poço de uma placa de 96 poços foram semeadas 2,3 x 10^4 células por meio da adição de 100 µL da suspensão preparada. Para os poços referentes ao branco não foi feita adição de células. A placa foi incubada em estufa a 37 °C com 5% de CO_2, por 24 horas (período de estabilização). Após a estabilização, retirou-se o meio e foram adicionados 200 µL de cada amostra de solubilizado. As amostras de solubilizado foram previamente filtradas em membrana estéril de polietersulfona (PES), com tamanho de poro de 0,22 µm. Para cada solubilizado foram preparadas 5 diferentes concentrações: 100, 250, 500, 750 e 1000 µL/mL de meio de cultura DMEM incompleto. Em cada placa foram analisadas duas amostras de solubilizados.

Em cada um dos monitoramentos, três placas foram utilizadas para os solubilizados referentes ao SOLO e PBAT, conforme disposição ilustrada na Figura 28. Em três outras placas foram dispostos os solubilizados referentes às amostras NF1.5T1.5 e NF1.5V1.5, conforme indicado na Figura 29.

Utilizou-se como controle positivo (CP) do teste MTT o reagente Triton X-100 (marca: Impex) 1%, diluído em meio DMEM incompleto. Nos poços referentes ao controle negativo (CN) acrescentou-se apenas meio DMEM incompleto.

Após a adição dos tratamentos, as placas foram mantidas por 24 horas em estufa a 37 °C com 5% de CO_2. Em seguida, foi preparada a solução de MTT: diluiu-se 0,005 g de MTT (marca: Sigma Aldrich) em 5 mL de PBS e em seguida adicionou-se 10 mL de meio DMEM incompleto (receita para cada placa). Adicionou-se 150 µL da solução de MTT em cada poço.

Figura 28 - Esquema da placa utilizada no ensaio do MTT. CP: controle positivo; B: branco; CN: controle negativo; concentrações das amostras dos solubilizados SOLO e PBAT: [1] - 100 µl/ml, [2] - 250 µL/mL, [3] -500 µL/mL, [4] - 750 µL/mL e [5] - 1000 µL/ml de meio de cultura.

	H	G	F	E	D	C	B	A
1	CP	B	CN	[1]	[2]	[3]	[4]	[5]
2	CP	B	CN	[1]	[2]	[3]	[4]	[5]
3	CP	B	CN	[1]	[2]	[3]	[4]	[5]
4	CP	B	CN	[1]	[2]	[3]	[4]	[5]
5	CP	B	CN	[1]	[2]	[3]	[4]	[5]
6	CP	B	CN	[1]	[2]	[3]	[4]	[5]
7	CP	B	CN	[1]	[2]	[3]	[4]	[5]
8	CP	B	CN	[1]	[2]	[3]	[4]	[5]
9	CP	B	CN	[1]	[2]	[3]	[4]	[5]
10	CP	B	CN	[1]	[2]	[3]	[4]	[5]
11	CP	B	CN	[1]	[2]	[3]	[4]	[5]
12	CP	B	CN	[1]	[2]	[3]	[4]	[5]

SOLO

PBAT

Fonte: O autor (2019)

Figura 29 - Esquema da placa utilizada no ensaio do MTT. CP: controle positivo; B: branco; CN: controle negativo; concentrações das amostras dos solubilizados NF1.5T1.5 e NF1.5V1.5: [1] - 100 µl/ml, [2] - 250 µL/mL, [3] -500 µL/mL, [4] - 750 µL/mL e [5] - 1000 µL/ml de meio de cultura.

	H	G	F	E	D	C	B	A
1	CP	B	CN	[1]	[2]	[3]	[4]	[5]
2	CP	B	CN	[1]	[2]	[3]	[4]	[5]
3	CP	B	CN	[1]	[2]	[3]	[4]	[5]
4	CP	B	CN	[1]	[2]	[3]	[4]	[5]
5	CP	B	CN	[1]	[2]	[3]	[4]	[5]
6	CP	B	CN	[1]	[2]	[3]	[4]	[5]
7	CP	B	CN	[1]	[2]	[3]	[4]	[5]
8	CP	B	CN	[1]	[2]	[3]	[4]	[5]
9	CP	B	CN	[1]	[2]	[3]	[4]	[5]
10	CP	B	CN	[1]	[2]	[3]	[4]	[5]
11	CP	B	CN	[1]	[2]	[3]	[4]	[5]
12	CP	B	CN	[1]	[2]	[3]	[4]	[5]

NF1.5T1.5

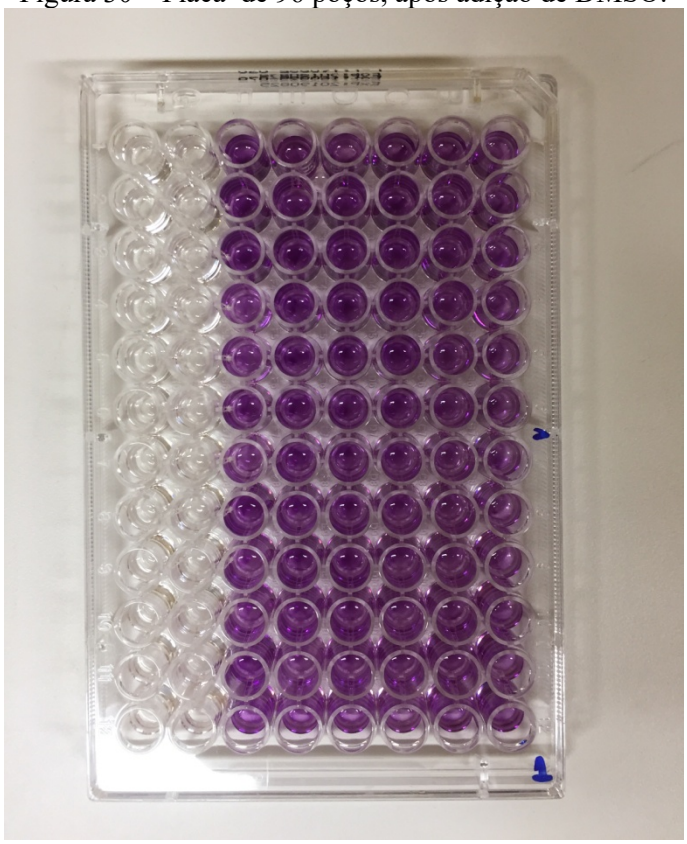
NF1.5V1.5

Fonte: O autor (2019)

As placas foram envolvidas em papel laminado para proteção da luz e incubadas por 3 horas a 37 °C com 5% de CO_2. Decorrido este período acrescentou-se 100 µL de dimetilsulfóxido-DMSO (marca: Êxodo Científica) em cada um dos 96 poços. A análise de absorbância (540 nm) em cada poço foi realizada em leitor de microplacas (marca TECAN, modelo infinite M200PRO). A Figura 30 ilustra uma placa ELISA após a adição de DMSO.

Para a determinação da viabilidade celular inicialmente calculou-se a média das absorbâncias para cada tratamento e cada diluição. Após subtração do valor de absorbância referente ao branco, dividiu-se o resultado pelo valor médio de absorbância do controle negativo e multiplicou-se por 100 para obtenção do resultado em porcentagem. Avaliou-se qual a maior concentração que apresentou viabilidade acima de 80%, critério para a escolha de concentração a ser utilizada nos ensaios de cometa e do MN, uma vez que devem ser evitados, nestes testes, a ocorrência de efeitos citotóxicos (CARDONA et al., 2015; SOMMAGGIO et al., 2018b).

Figura 30 – Placa de 96 poços, após adição de DMSO.



Fonte: O autor (2019)

4.4.3.2. Ensaio do cometa

O ensaio do cometa foi realizado de acordo com Tice et al. (2000) com algumas modificações. A descrição do preparo das soluções utilizadas neste ensaio encontra-se apresentada no Apêndice B.

Os frascos de cultura foram preparados no primeiro dia de ensaio. Desprezou-se o meio dos frascos que continham as células, os quais foram lavados duas vezes com solução de tampão fosfato salino (PBS). O excesso de PBS foi retirado com o auxílio de uma pipeta Pasteur. Em seguida, foram adicionados 500 µL de tripsina (0,25 %), permanecendo no frasco por 5 minutos em estufa com 5% de CO_2, a 37 °C. Após este período, as células foram despregadas da parede do frasco por meio de leves batidas. Foram adicionados 2 mL de meio DMEM completo para inativação da tripsina. A suspensão passou por seringa de 1 mL e agulha fina, para obtenção de células isoladas e uma suspensão celular mais homogênea. O conteúdo de dois frascos foi transferido para um tubo de centrífuga. Em câmara de Neubauer foram adicionados 40 µL desta suspensão para a contagem das células. A centrifugação foi realizada por 10 minutos a 1500 rpm.

O sobrenadante de cada tubo foi descartado e o pellet ressuspendido em 5 mL de meio DMEM completo. Em seguida adicionou-se mais 5 mL e realizou-se nova ressuspensão. Calculou-se o volume necessário da suspensão celular necessário para a confecção de frascos com 5 x 10^5 células, o qual foi acrescentado em cada frasco para o experimento com 5 mL de meio DMEM completo. O experimento foi realizado em triplicata. Os frascos foram transferidos para estufa a 37 °C com 5% de CO_2 por 24 horas para estabilização.

Passadas 24 horas de estabilização, foram adicionadas as amostras de solubilizados nos frascos, na concentração determinada a partir da análise de resultados do ensaio MTT. As amostras de solubilizado foram filtradas em membrana estéril de polietersulfona (PES), com tamanho de poro de 0,22 µm. Foi empregado como controle positivo, solução de MMS 10 mM, preparado pela diluição de 3,33 µL de MMS (marca: Sigma Aldrich) em 4 mL de PBS. Desta solução, foram pipetados 50 µL, os quais foram acrescentados com 5 mL de meio DMEM completo nos frascos referentes ao controle positivo. Para os frascos de controle negativo, empregou-se solução de PBS na concentração de 250 µL/mL de meio DMEM completo.

Após o preparo dos frascos com tratamentos, eles foram mantidos em estufa a 37 °C com 5% de CO_2 por 24 horas. Em seguida o meio foi descartado e os frascos foram lavados 2 vezes com 5 mL de PBS. O excesso de PBS foi então retirado com pipeta Pasteur. Adicionou-se em cada frasco 500 µL de tripsina e estes foram colocados em estufa a 37 °C por 5 minutos. Foram realizadas leves batidas no fundo do frasco, para o desprendimento das células e acrescentou-se 5 mL de meio DMEM completo, para inativação da tripsina. A suspensão celular foi homogeneizada com o uso de uma seringa de insulina. O conteúdo de cada frasco foi transferido para tubos de centrífuga, os quais foram centrifugados por 5 minutos a 1500 rpm. Retirou-se o sobrenadante com pipeta Pasteur, até deixar o volume de 0,5 mL de meio de cultura. O pellet foi ressuspendido e a suspensão celular homogeneizada.

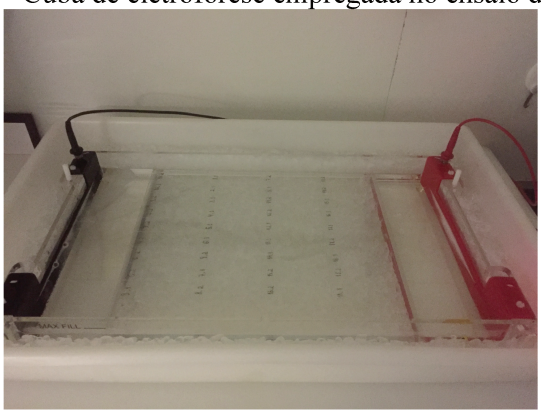
Foram retirados 20 µL de cada tubo, que juntamente com 20 µL de azul de tripan (marca: Gibco) foram analisados em microscópio de luz para contagem de 100 células, sendo que as brancas foram consideradas viáveis (vivas) e as azuis inviáveis (mortas). Para a continuidade do experimento o valor de viabilidade deve ser superior a 80%.

Foram separadas duas lâminas pré-gelatinizadas por frasco. Em cada lâmina adicionou-se uma mistura previamente preparada com 20 µL da suspensão celular e 120 µL de agarose de baixo ponto de fusão (LMP). Cobriu-se o material com lamínula 24 x 50 mm e as lâminas foram colocadas em geladeira por 20 minutos. Passado este período, as lamínulas foram

cuidadosamente extraídas e as lâminas foram transferidas para cubetas de vidro contendo solução de lise gelada, mantidas em geladeira por 1 hora.

Decorrido o tempo da lise, as lâminas foram dispostas em cuba de eletroforese (Figura 31) com o lado fosco voltado para o polo negativo. As lâminas foram cobertas com solução tampão gelada recém-preparada para a desnaturação do DNA por 20 minutos, período após o qual foi iniciada a corrida de eletroforese de 20 minutos, a 39 V e 300 mA.

Figura 31 - Cuba de eletroforese empregada no ensaio do cometa.



Fonte: O autor (2019)

Após a corrida, as lâminas foram retiradas da cuba e neutralizadas com a solução de neutralização por 3 vezes de 5 minutos cada. Após secagem as lâminas foram fixadas em álcool etílico absoluto (marca: Synth) por 10 minutos.

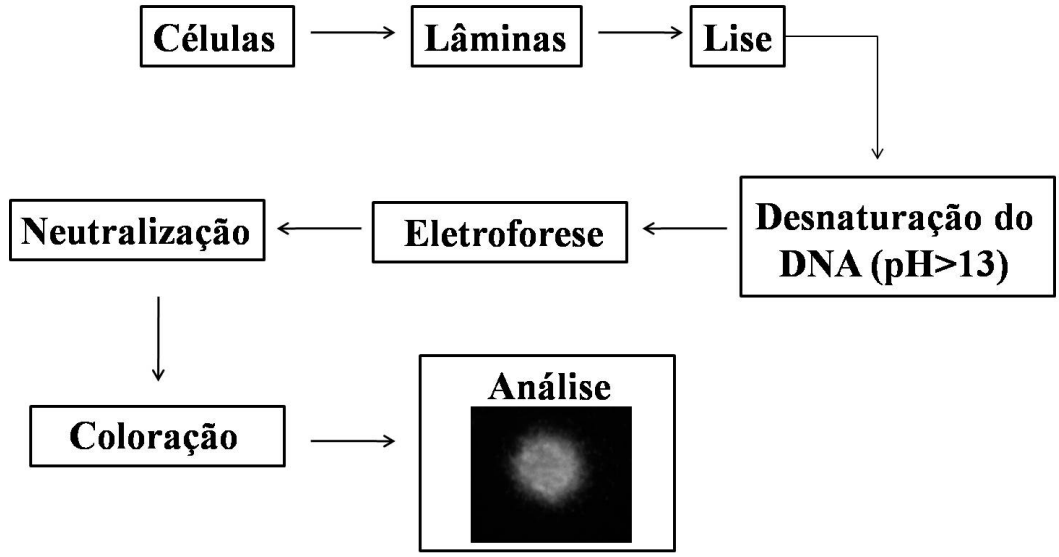
As lâminas foram coradas com solução de GelRed (marca: Biotium), e analisadas em microscópio de fluorescência (marca Leica, modelo: DM 4000B), sendo feita a avaliação dos parâmetros porcentagem de DNA na cauda e momento da cauda de Olive (KUMARAVEL et al., 2009; OECD, 2014a) em 50 nucleóides por lâmina (LOVELL; OMORI, 2008; REISINGER et al., 2018; WIKLUND;AGURELL, 2003), por meio do *software Comet Assay IV*. Os *outliers* foram removidos para evitar superestimativas (BRIAZENI; CAMARGO; MIOT, 2009; YANUARYSKA, 2018). Esta remoção foi feita empregando o *software* GraphPad Prism 8.0.1, pelo método ROUT, conforme recomendado por Motulsky e Brown (2006).

A análise estatística foi realizada com o *software* GraphPad Prism 8.0.1, considerando os valores médios da porcentagem de DNA na cauda e momento de cauda de Olive em cada lâmina. Inicialmente, foi realizada a normalidade pelo teste D'Agostino & Pearson. Por essa avaliação, constatou-se que o parâmetro porcentagem de DNA na cauda no segundo período de monitoramento, após o ensaio de biodegradação, foi o único a apresentar distribuição normal. Dessa forma, foi empregada, neste caso, a análise estatística pelo teste ANOVA-um critério,

com 95% de confiança. Os parâmetros porcentagem de DNA na cauda no primeiro monitoramento e momento da cauda de Olive, em ambos os períodos de avaliação, foram analisados pelo teste Kruskal-Wallis, com 95% de confiança.

A Figura 32 apresenta um esquema com as principais etapas do teste.

Figura 32 – Esquematização do ensaio do cometa.



Fonte: adaptado de Tice et al. (2000).

4.4.3.3. Ensaio do micronúcleo com bloqueio de citocinese

O ensaio do MN com bloqueio de citocinese foi realizado de acordo com Natarajan e Darroudi (1991) com algumas modificações. A descrição do preparo das soluções utilizadas neste ensaio está apresentada no Apêndice C.

Os frascos de cultura foram preparados no primeiro dia de ensaio. Desprezou-se o meio dos frascos que continham as células, os quais foram lavados duas vezes com solução de tampão fosfato salino (PBS). Foi retirado com o auxílio de uma pipeta Pasteur o excesso de PBS. Em seguida, foram adicionados 500 µL de tripsina (0,25 %), permanecendo no frasco por 5 minutos em estufa de CO_2 a 37 °C. Após este período, as células foram despregadas da parede do frasco por meio de leves batidas. Foram adicionados 2 mL de meio DMEM completo, para inativação da tripsina. A suspensão passou por seringa de 1 mL, para obtenção de células isoladas e uma suspensão celular mais homogênea. O conteúdo de cada dois frascos foi transferido para o mesmo tubo de centrífuga. Foram adicionados, em câmara de Neubauer, 40 µL desta suspensão, para a contagem das células. A centrifugação foi realizada por 10 minutos a 1500 rpm.

O sobrenadante de cada tubo foi descartado e o pellet foi ressuspendido em 5 mL de meio DMEM completo. Em seguida adicionou-se mais 5 mL e realizou-se nova ressuspensão. Calculou-se o volume necessário da suspensão celular necessário para a confecção de frascos com 1 x 10^6 células, o qual foi acrescentado em cada frasco, para o experimento com 5 mL de meio DMEM completo. O experimento foi realizado em triplicata. Os frascos foram transferidos para estufa a 37 °C com 5% de CO_2 por 24 horas para estabilização.

Passadas 24 horas de estabilização foram adicionadas as amostras de solubilizados nos frascos, sendo empregada para cada tratamento a maior concentração que apresentou viabilidade celular acima de 80% em todas as repetições do ensaio MTT. As amostras de solubilizado foram filtradas em membrana estéril de polietersulfona (PES), com tamanho de poro de 0,22 µm. Foi empregado como controle positivo solução de MMS 10 mM, preparado pela diluição de 3,33 µL de MMS (marca: Sigma Aldrich) em 4 mL de PBS. Desta solução, foram pipetados 50 µL, que foram acrescentados com 5 mL de meio DMEM completo nos frascos referentes ao controle positivo. Para os frascos de controle negativo empregou-se solução de PBS diluída em meio DMEM completo na concentração de 250 µL/mL.

Após o preparo dos frascos com os tratamentos, eles foram mantidos em estufa a 37 °C com 5% de CO_2 por 24 horas. Em seguida o meio foi descartado e os frascos foram lavados 2 vezes com 5 mL de PBS. O excesso de PBS foi então retirado com pipeta Pasteur. Foram adicionados 5 mL de meio DMEM completo. Em cada frasco foram acrescentados 50 µL de solução de citocalasina B a 350 µg/mL (solução de uso). Os frascos foram incubados por 30 horas em estufa a 37 °C com 5% de CO_2.

O meio de cultura de cada frasco foi transferido para tubo de centrífuga. Os frascos foram lavados 2 vezes com 5 mL de PBS, o qual foi descartado e o excesso retirado com pipeta Pasteur. Adicionou-se 500 µL de tripsina (0,25%) e os frascos foram colocados em estufa a 37 °C, por 5 minutos. Decorrido este período, foram realizadas leves batidas no fundo dos frascos para desprendimento das células. A tripsina foi inativada com o mesmo meio de cultura que havia sido previamente reservado e a suspensão foi passada por seringa de 1 mL para obtenção de células isoladas e uma suspensão mais homogênea. Em seguida o conteúdo dos frascos foi novamente transferido para seus respectivos tubos de centrífuga. Os tubos foram centrifugados por 5 minutos a 1500 rpm.

Após centrifugação, retirou-se o sobrenadante de cada tubo até que restasse o volume de 0,5 mL. O material foi homogeneizado com pipeta Pasteur e, após este procedimento, a suspensão celular foi mantida no interior da pipeta. Em cada tubo foram adicionados 5 mL de

solução hipotônica de citrato de sódio 0,01% gelada, seguido por homogeneização com pipeta Pasteur. A solução de citrato foi mantida até que passasse o período de 5 minutos após sua adição. Foram adicionadas 2 gotas de formol 40% e, novamente, foi realizada a homogeneização. Os tubos foram centrifugados por 5 minutos a 1500 rpm. O sobrenadante foi retirado até restar no frasco 0,5 mL e o material foi ressuspendido. A suspensão foi mantida no interior da pipeta. Em seguida foram acrescentados 5 mL de fixador Carnoy em cada tubo e realizou-se homogeneização com a pipeta.

Os tubos foram mantidos em geladeira até o momento de confecção das lâminas. Para o seu preparo, o primeiro procedimento foi a centrifugação por 5 minutos a 1.500 rpm. Retirou-se o sobrenadante até restar cerca de 0,5 mL de fixador, sendo então realizada uma nova homogeneização.

As lâminas foram previamente lavadas com Extran (marca: Merck) e enxaguadas abundantemente com água e mantidas em água ultrapura na geladeira até o momento do seu uso. Em cada lâmina foi adicionada, com auxílio de uma pipeta Pasteur, uma fina lâmina de água ultrapura e foram ainda pingadas 3 a 4 gotas do material do tubo. No momento da adição das gotas, a lâmina foi levemente inclinada para escorrer o filme de água. As lâminas foram secas em temperatura ambiente.

A coloração das lâminas foi feita com reagente de Schiff por 1 hora e 40 minutos, seguida de coloração com Giemsa 5% por 5 minutos. Após cada processo de coloração, as lâminas foram lavadas com água ultrapura e secas à temperatura ambiente. Foram analisadas duas lâminas referentes a cada frasco. A análise foi feita em microscópio de luz (aumento de 1000 x) da marca Nikon modelo eclipse e-200. No total foram avaliadas 1.000 células por lâmina e 2 lâminas referentes à cada frasco para avaliação de presença de pontes nucleoplasmáticas, brotos ou MNs (FENECH, 2007). Também foi realizada a quantificação do índice de proliferação por bloqueio de citocinese (CBPI) de acordo com o guia 487 da OECD (2014b), pela contagem de 500 células por lâmina, cujo cálculo foi feito de acordo com a Equação 13.

$$\mathrm{CBPI} = \frac{\mathrm{N1}+(2\ \mathrm{x}\ \mathrm{N2})+(3\ \mathrm{x}\ \mathrm{N3})+(4\ \mathrm{x}\ \mathrm{N4})}{\mathrm{NÚMERO\ TOTAL\ DE\ CÉLULAS}} \qquad \text{(Equação 13)}$$

Onde:

N1: número de células com 1 núcleo;

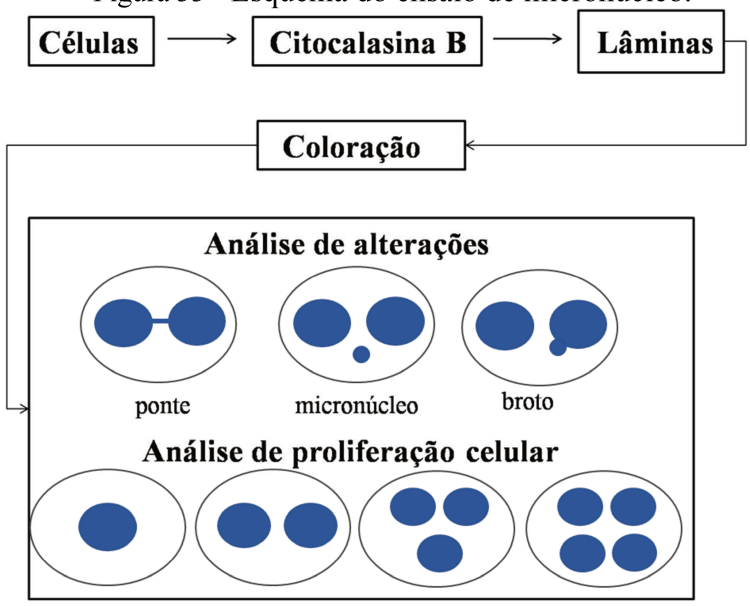
N2: número de células com 2 núcleos;

N3: número de células com 3 núcleos;

N4: número de células com 4 núcleos.

A Figura 33 apresenta um esquema com as principais etapas do teste.

Figura 33 - Esquema do ensaio de micronúcleo.



Fonte: adaptado de Fenech (2007).

A análise estatística foi realizada com o *software* GraphPad Prism 8.0.1, com o teste de normalidade D'Agostino & Pearson. Para o parâmetro CBPI do primeiro monitoramento (antes do ensaio de biodegradação), o qual apresentou distribuição normal, foi empregado o teste ANOVA-um critério, com 95% de confiança. Para os parâmetros de frequência de pontes, MNs e brotos em ambos os monitoramentos e o parâmetro CBPI, após o ensaio de biodegradação, empregou-se o teste Kruskal-Wallis (95% de confiança).

4.4.4. Análise comparativa entre os monitoramentos com os bioensaios

Os parâmetros determinados em todos os bioensaios foram submetidos à análise estatística para comparação dos resultados do monitoramento final (após o ensaio de biodegradação) com os resultados do monitoramento inicial. Para o parâmetro de DNA na cauda, devido à distribuição normal dos dados, empregou-se o teste ANOVA - um critério ($p<0,05$) para esta comparação. Para os outros parâmetros foi empregado o teste de Kruskal-Wallis ($p<0,05$). O software empregado para esta análise foi o GraphPad Prism 8.0.1.

5. RESULTADOS

5.1. Caracterização de estabilidade térmica de aditivos por análise termogravimétrica (TGA)

A análise termogravimétrica dos aditivos HALS e vitamina E indicou que os aditivos perderam 5% de massa nas temperaturas de 361 e 287 °C, respectivamente. Dessa forma, os aditivos apresentam estabilidade térmica que atende à temperatura atingida no processamento dos filmes, de 150 °C. As curvas termogravimétricas e derivadas encontram-se apresentadas no Apêndice D.

5.2. Caracterização e seleção de filmes *mulch* de PBAT

Os resultados referentes às análises de GPC, teor de gel, propriedades mecânicas e transmissão de luz, antes e após o ensaio de envelhecimento acelerado, serão discutidos a seguir.

5.2.1. Análise de massa molar por Cromatografia de Permeação em Gel (GPC)

A Tabela 6 mostra os resultados de massa molar numérica média ($\bar{M}n$), massa molar ponderal média ($\bar{M}w$) e índice de polidispersidade (PDI) obtidos pela análise de GPC para o polímero PBAT puro, antes e após o envelhecimento. As curvas de GPC estão apresentadas no Apêndice E.

Tabela 6 –$\bar{M}n$, $\bar{M}w$ e PDI de filmes de PBAT antes e após o envelhecimento.

Amostras	$\bar{M}n$ (g/mol)	$\bar{M}w$ (g/mol)	PDI
PBATNAT (1)	53.000	117.000	2,21
PBATUVA (2)	6.000	31.000	5,17
PBATUVA9 (3)	2.000	10.000	5,00

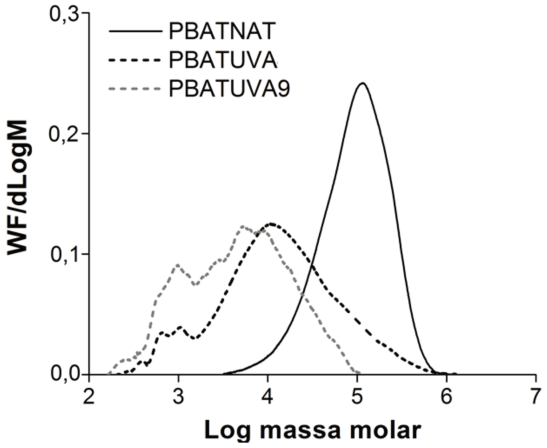
(1) – amostra de PBAT puro antes do envelhecimento; (2) – amostra de PBAT puro envelhecida por 4 dias em simulador ambiental; (3) – amostra de PBAT puro envelhecida por 9 dias em simulador ambiental. Fonte: O autor (2019)

Os resultados de massa molar $\bar{M}n$ e $\bar{M}w$ das amostras envelhecidas reduziram em relação à amostra natural, evidenciando a ocorrência do processo de cisão de cadeia decorrente da fotodegradação. A ocorrência de hidrólise devido ao vapor de água produzido no equipamento, nos ciclos de condensação, também pode ter contribuído para a alta redução dos parâmetros $\bar{M}n$ e $\bar{M}w$, que foi de 96% e 91%, respectivamente. Essa questão será discutida com mais detalhes no item 5.2.2.

Quando comparadas às amostras naturais, as amostras envelhecidas apresentaram maior índice de polidispersidade, coerente com a formação de espécies de baixa massa molar

durante o envelhecimento acelerado, e o alargamento das curvas de distribuição de massa molar, conforme ilustrado na Figura 34.

Figura 34 - Distribuição de massa molar de amostras de PBAT puro.

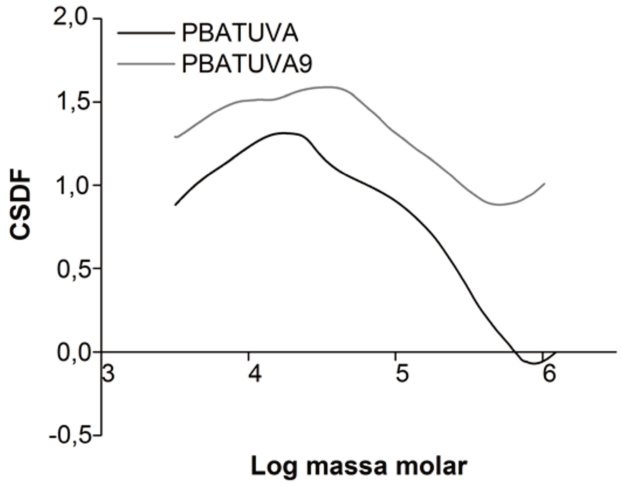


Fonte: O autor (2019)

A metodologia CSDF foi empregada no presente estudo para facilitar a interpretação das alterações na distribuição da massa molar das amostras, pois permite transformar duas curvas de GPC (antes e após o processo de degradação) em uma única curva cujos valores positivos indicam a ocorrência de cisão de cadeia, enquanto valores negativos indicam a ocorrência de reticulação e/ou ramificação (PINHEIRO; CHINELATTO; CANEVAROLO, 2004).

A curva CSDF da amostra PBATUVA (Figura 35) apresentou uma pequena região negativa, que ocorreu para as cadeias de massa molar próxima a 10^6 g/mol. Todavia, o processo de cisão de cadeia foi predominante, e revelado pela maior frequência de valores positivos da curva CSDF.

Figura 35 - Curvas CSDF das amostras PBATUVA e PBATUVA9.



Fonte: O autor (2019)

Para a amostra PBATUVA9, observou-se um processo de cisão de cadeia ainda mais avançado, com formação de mais espécies de baixa massa molar, a qual pode ser observada na região entre 10^2 e 10^4 g/mol na curva de distribuição (Figura 34), e também pela curva CSDF da Figura 35, que apresentou valores ainda mais positivos em relação à amostra PBATUVA.

Na Tabela 7 estão apresentados os resultados $(\bar{M}n)$, $(\bar{M}w)$ e PDI obtidos pela análise GPC para as amostras de PBAT com as diferentes combinações de aditivos.

Mesmo com exposição no simulador ambiental por um período superior ao polímero puro, todos os valores de $\bar{M}n$ e $\bar{M}w$ das amostras envelhecidas com aditivos foram superiores aos obtidos para a formulação PBATUVA9. Dessa forma, é possível inferir que o processo de cisão de cadeia decorrente da fotodegradação foi minimizado pela ação dos aditivos.

Para as amostras naturais com os aditivos negro de fumo e HALS, os valores de PDI variaram entre 1,80 a 2,48. As amostras envelhecidas apresentaram variação de PDI entre 2,15 a 3,97. Para avaliar se os fatores influenciaram a distribuição de massa molar antes e após o envelhecimento, os resultados de PDI foram submetidos à análise estatística.

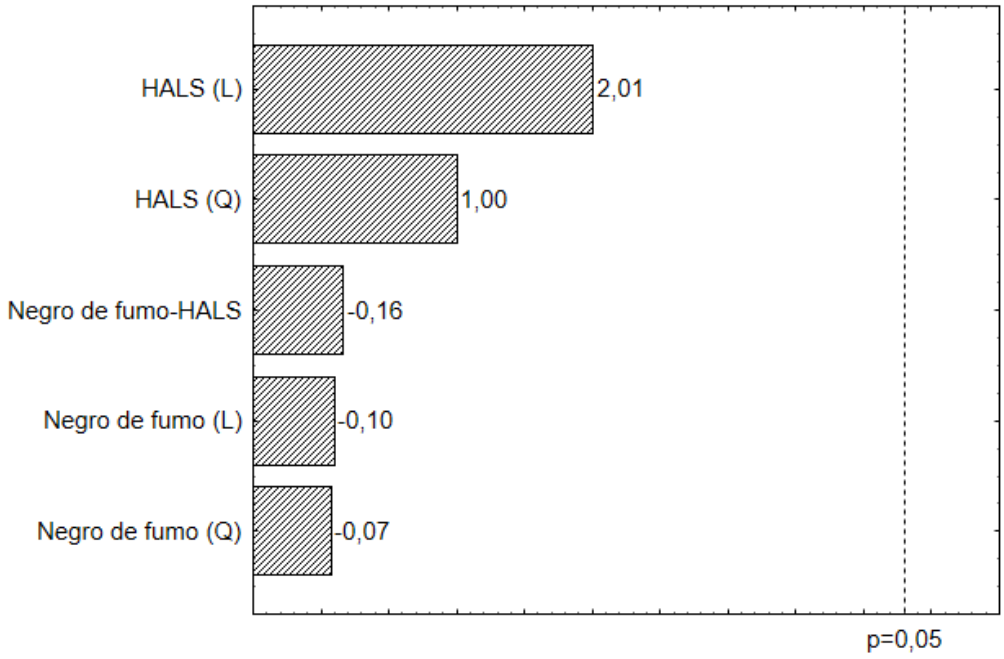
Tabela 7 - Resultados de cromatografia de permeação em gel para os filmes de PBAT.

Amostras		$\bar{M}n$ (g/mol)	$\bar{M}w$ (g/mol)	PDI
Filmes de PBAT com negro de fumo e HALS	**NF0.1T1.0NAT**	60.000	134.000	2,23
	NF0.1T1.0UVA	37.000	147.000	3,97
	NF0.5T0.5NAT	56.000	127.000	2,27
	NF0.5T0.5UVA	49.000	134.000	2,73
	NF0.5T1.5NAT	58.000	129.000	2,22
	NF0.5T1.5UVA	52.000	127.000	2,44
	NF1.0T0.1NAT	52.000	122.000	2,35
	NF1.0T0.1UVA	52.000	133.000	2,56
	NF1.0T1.0(1)NAT	50.000	124.000	2,48
	NF1.0T1.0(1)UVA	46.000	132.000	2,87
	NF1.0T1.0(2)NAT	61.000	134.000	2,20
	NF1.0T1.0(2)UVA	53.000	124.000	2,34
	NF1.0T1.0(3)NAT	60.000	130.000	2,17
	NF1.0T1.0(3)UVA	60.000	129.000	2,15
	NF1.0T2.0NAT	75.000	135.000	1,80
	NF1.0T2.0UVA	57.000	127.000	2,23
	NF1.5T0.5NAT	59.000	123.000	2,08
	NF1.5T0.5UVA	49.000	131.000	2,67
	NF1.5T1.5NAT	59.000	147.000	2,49
	NF1.5T1.5UVA	52.000	122.000	2,34
	NF2.0T1.0NAT	56.000	125.000	2,23
	NF2.0T1.0UVA	34.000	114.000	3,35
Filmes de PBAT com negro de fumo e Vitamina E	**NF0.1V1.0NAT**	34.000	81.000	2,38
	NF0.1V1.0UVA	3.000	20.000	6,67
	NF0.5V0.5NAT	28.000	76.000	2,71
	NF0.5V0.5UVA	7.000	43.000	6,14
	NF0.5V1.5NAT	32.000	79.000	2,47
	NF0.5V1.5UVA	14.000	55.000	3,93
	NF1.0V0.1NAT	38.000	78.000	2,05
	NF1.0V0.1UVA	13.000	54.000	4,15
	NF1.0V1.0(1)NAT	28.000	78.000	2,79
	NF1.0V1.0(1)UVA	15.000	53.000	3,53
	NF1.0V1.0(2)NAT	35.000	80.000	2,29
	NF1.0V1.0(2)UVA	8.000	49.000	6,13
	NF1.0V1.0(3)NAT	36.000	80.000	2,22
	NF1.0V1.0(3)UVA	20.000	65.000	3,25
	NF1.0V2.0NAT	37.000	79.000	2,14
	NF1.0V2.0UVA	25.000	58.000	2,32
	NF1.5V0.5NAT	34.000	75.000	2,21
	NF1.5V0.5UVA	11.000	45.000	4,09
	NF1.5V1.5NAT	34.000	77.000	2,26
	NF1.5V1.5UVA	19.000	62.000	3,26
	NF2.0V1.0NAT	25.000	72.000	2,88
	NF2.0V1.0UVA	12.000	46.000	3,83

Fonte: O autor (2019)

O gráfico de Pareto da Figura 36 mostra os efeitos lineares (L), quadráticos e efeito da interação negro de fumo-HALS sobre a massa molar numérica média ($\bar{M}n$) das amostras naturais. Nenhum dos fatores foi significativo. As estimativas de efeito estão apresentadas na Tabela 8.

Figura 36 - Gráfico de Pareto de $\bar{M}n$ para amostras naturais de PBAT com os aditivos negro de fumo e HALS.



Fonte: O autor (2019)

Tabela 8 - Estimativa dos efeitos e valores de p (ANOVA) para de $\bar{M}n$ para amostras naturais de PBAT com aditivos negro de fumo e HALS.

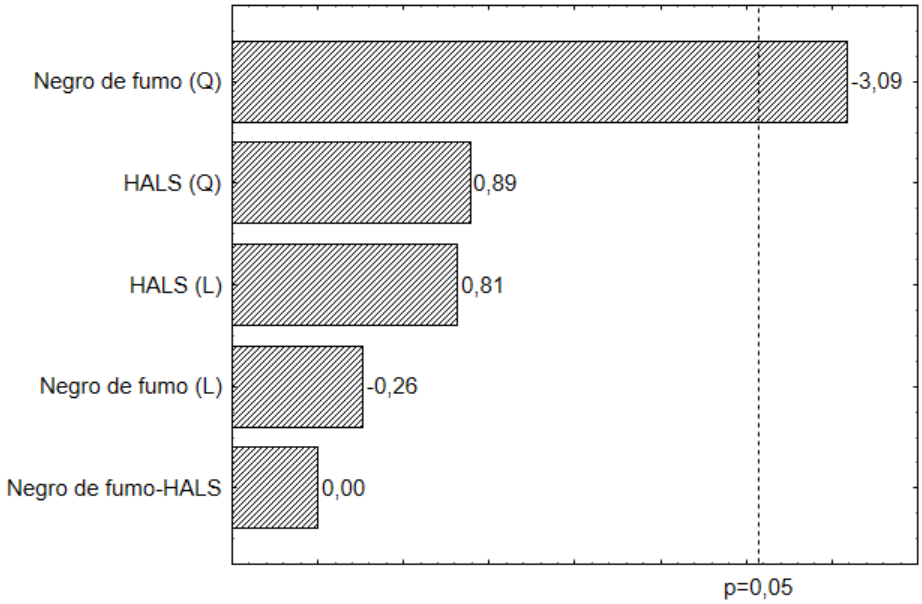
Fatores	**Efeito**	**Erro**	**p**
Negro de fumo (L)	-414,21	4.301,16	0,93
Negro de fumo (Q)	-375,00	5.119,41	0,95
HALS (L)	8.631,73	4.301,16	0,18
HALS (Q)	5.125,00	5.119,41	0,42
Negro de fumo-HALS	-1.000	6.082,76	0,88

Fonte: O autor (2019)

Para as amostras envelhecidas de negro de fumo e HALS, apenas o fator negro de fumo (quadrático) foi significativo para $\bar{M}n$, conforme indicado no gráfico de Pareto da Figura 37 e na estimativa de efeitos da Tabela 9. O sinal do efeito foi negativo. Atribui-se este resultado a possível formação de aglomerados de negro de fumo (BREWER, 2004) para a maior

concentração empregada deste aditivo (2% em massa), reduzindo sua eficiência para absorção de energia ultravioleta e provocando a redução de massa molar.

Figura 37 - Gráfico de Pareto de $\bar{M}n$ para amostras envelhecidas de PBAT com os aditivos negro de fumo e HALS.



Fonte: O autor (2019)

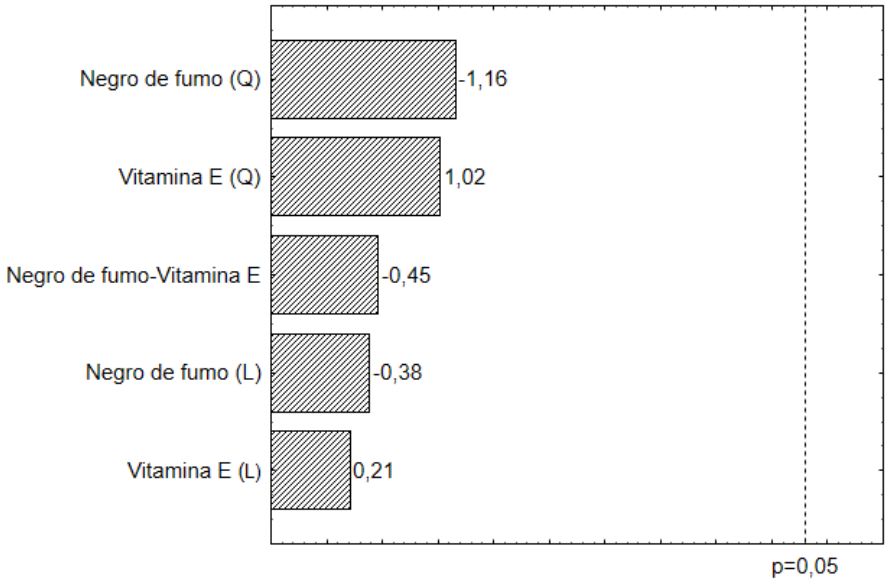
Tabela 9 - Estimativa dos efeitos e valores de p (ANOVA) para de $\bar{M}n$ para amostras envelhecidas de PBAT com aditivos negro de fumo e HALS.

Fatores	**Efeito**	**Erro**	**p**
Negro de fumo (L)	-1.060,70	4.011,15	0,80
Negro de fumo (Q)	-14.750,00	4.774,23	0,03
HALS (L)	3.267,80	4.011,15	0,45
HALS (Q)	4.250,00	4.774,23	0,41
Negro de fumo-HALS	0,00	5.672,63	1,00

Fonte: O autor (2019)

Considerando as amostras naturais com negro de fumo e vitamina E nenhum fator influenciou de forma significativa os resultados de $\bar{M}n$, conforme indicado no gráfico de Pareto da Figura 38 e Tabela 10.

Figura 38 - Gráfico de Pareto de $\overline{Mn}$ para amostras naturais de PBAT com os aditivos negro de fumo e vitamina E.



Fonte: O autor (2019)

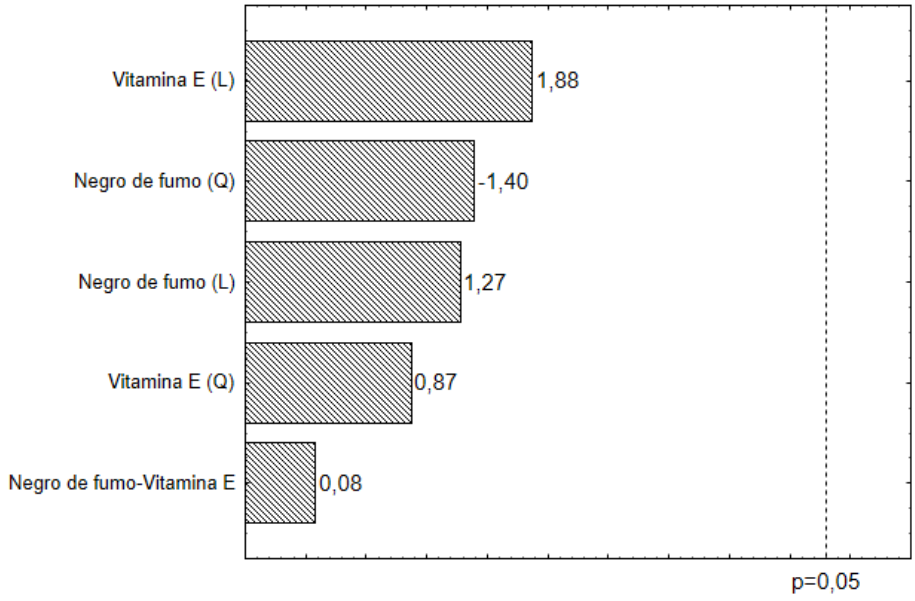
Tabela 10 - Estimativa dos efeitos e valores de p (ANOVA) para de $\overline{Mn}$ para amostras naturais de PBAT com aditivos negro de fumo e vitamina E.

Fatores	**Efeito**	**Erro**	**p**
Negro de fumo (L)	-1.181,98	3.082,21	0,74
Negro de fumo (Q)	-4.250,00	3.668,56	0,37
Vitamina E (L)	646,45	3.082,21	0,85
Vitamina E (Q)	3.750,00	3.668,56	0,41
Negro de fumo-Vitamina E	2.000,00	4.358,90	0,69

Fonte: O autor (2019)

Também não foram verificados efeitos significativos para amostras envelhecidas com os aditivos negro de fumo e vitamina E, conforme indicado no gráfico de Pareto da Figura 39 e a estimativa de efeitos na Tabela 11.

Figura 39- Gráfico de Pareto de $\overline{Mn}$ para amostras naturais de PBAT com os aditivos negro de fumo e vitamina E.



Fonte: O autor (2019)

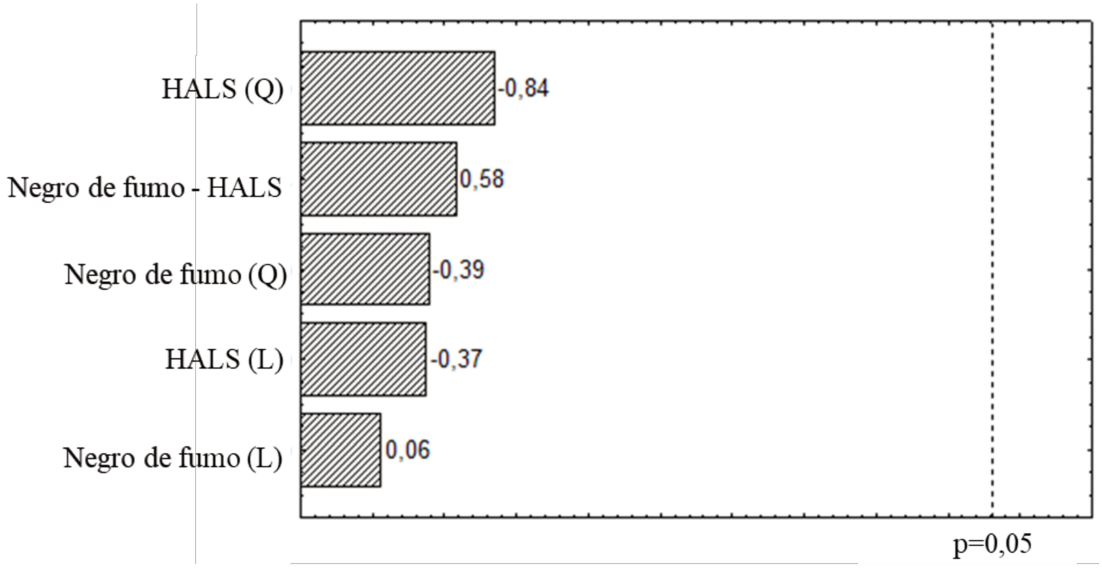
Tabela 11 - Estimativa dos efeitos e valores de p (ANOVA) para de $\overline{Mn}$ para amostras envelhecidas de PBAT com aditivos negro de fumo e vitamina E.

Fatores	**Efeito**	**Erro**	**p**
Negro de fumo (L)	5.431,98	4.262,24	0,33
Negro de fumo (Q)	-7.083,33	5.073,08	0,30
Vitamina E (L)	7.992,64	4.262,24	0,20
Vitamina E (Q)	4.416,67	5.073,08	0,48
Negro de fumo-Vitamina E	500,00	6.027,71	0,94

Fonte: O autor (2019)

O gráfico de Pareto da Figura 40 evidencia que os fatores avaliados não foram significativos para a polidispersidade das amostras naturais. Os dados de estimativa de efeitos estão apresentados na Tabela 12.

Figura 40 - Gráfico de Pareto da polidispersidade de amostras naturais de PBAT com aditivos negro de fumo e HALS.



Fonte: O autor (2019)

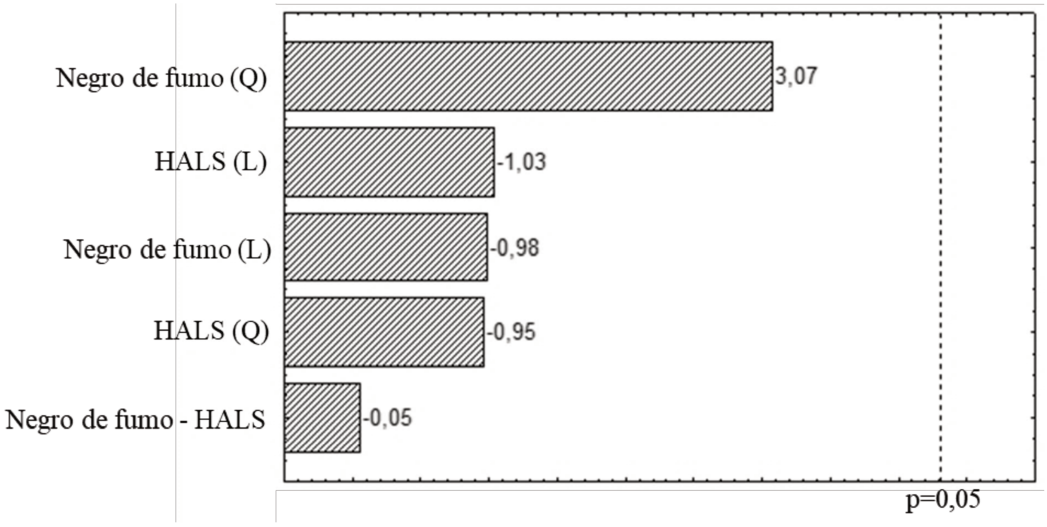
Tabela 12 - Estimativa dos efeitos e valores de p (ANOVA) para polidispersidade de amostras naturais de PBAT com aditivos negro de fumo e HALS.

Fatores	**Efeito**	**Erro**	**p**
Negro de fumo (L)	0,01	0,28	0,96
Negro de fumo (Q)	-0,13	0,33	0,73
HALS (L)	-0,11	0,28	0,74
HALS (Q)	-0,28	0,33	0,49
Negro de fumo-HALS	0,23	0,40	0,63

Fonte: O autor (2019)

Também não houve influência significativa dos fatores avaliados sobre a polidispersidade de amostras envelhecidas, conforme os resultados da análise estatística apresentados na Figura 41 e Tabela 13.

Figura 41 - Gráfico de Pareto da polidispersidade de amostras envelhecidas de PBAT com os aditivos negro de fumo e HALS.



Fonte: O autor (2019)

Tabela 13 - Estimativa dos efeitos e valores de p (ANOVA) para polidispersidade de amostras envelhecidas de PBAT com aditivos negro de fumo e HALS.

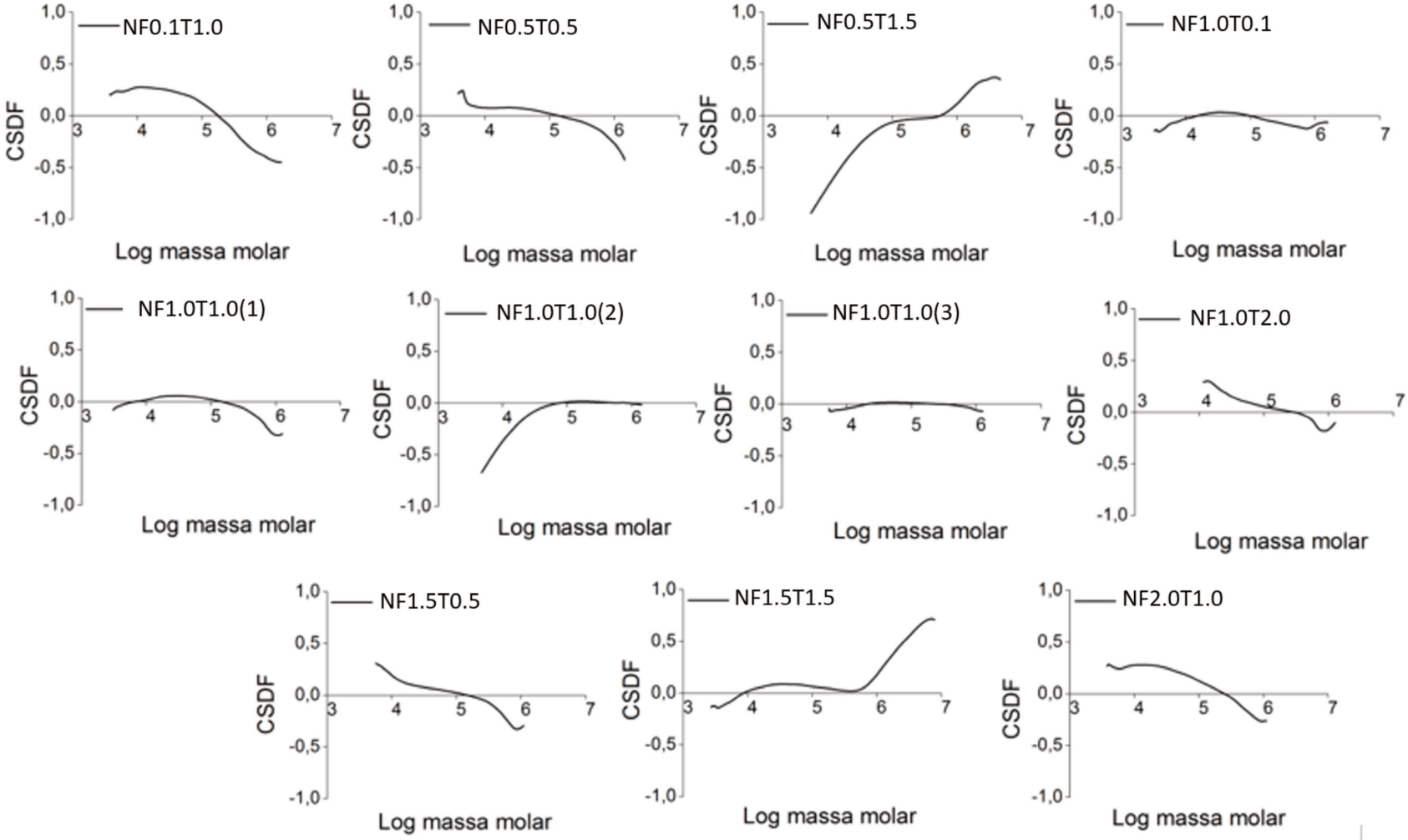
Fatores	**Efeito**	**Erro**	**p**
Negro de fumo (L)	-0,26	0,26	0,43
Negro de fumo (Q)	0,97	0,31	0,09
HALS (L)	-0,27	0,26	0,41
HALS (Q)	-0,30	0,31	0,44
Negro de fumo-HALS	-0,02	0,37	0,96

Fonte: O autor (2019)

Observou-se também, pelos resultados de GPC, que todas as amostras com negro de fumo e HALS envelhecidas apresentaram redução do $\bar{M}n$ em comparação às respectivas amostras naturais. O parâmetro $\bar{M}w$, por sua vez, aumentou após o envelhecimento para as seguintes amostras: NF0.1T1.0UVA; NF0.5T0.5UVA; NF1.0T0.1UVA; NF1.0T1.0(1)UVA e NF1.5T0.5UVA. Este comportamento é coerente considerando as curvas CSDF apresentadas na Figura 42.

Todas as curvas apresentaram regiões de cisão de cadeia (valores positivos) que justificam a redução de $\bar{M}n$. Quanto às amostras que apresentaram aumento de $\bar{M}w$ após o envelhecimento, estas apresentaram um maior grau de reticulação e/ou ramificação, evidenciado por valores mais negativos da curva CSDF, nas porções de maior massa molar da curva de distribuição (acima de 10^5 g/mol).

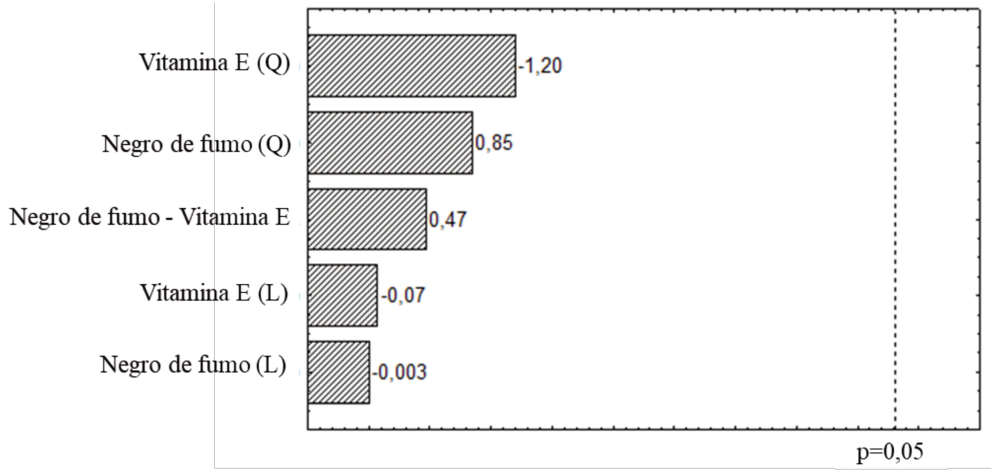
Figura 42 - Curvas CSDF de filmes de PBAT com negro de fumo e HALS.



Fonte: O autor (2019)

Os valores de polidispersidade das amostras naturais de PBAT com negro de fumo e vitamina E variaram entre 2,05 a 2,88. Nenhum dos fatores apresentou influência estatisticamente significativa sobre a polidispersidade dessas amostras, conforme indicado pelo gráfico de Pareto (Figura 43) e os dados de estimativa de efeitos (Tabela 14).

Figura 43 - Gráfico de Pareto da polidispersidade de amostras naturais de PBAT com os aditivos negro de fumo e vitamina E.



Fonte: O autor (2019)

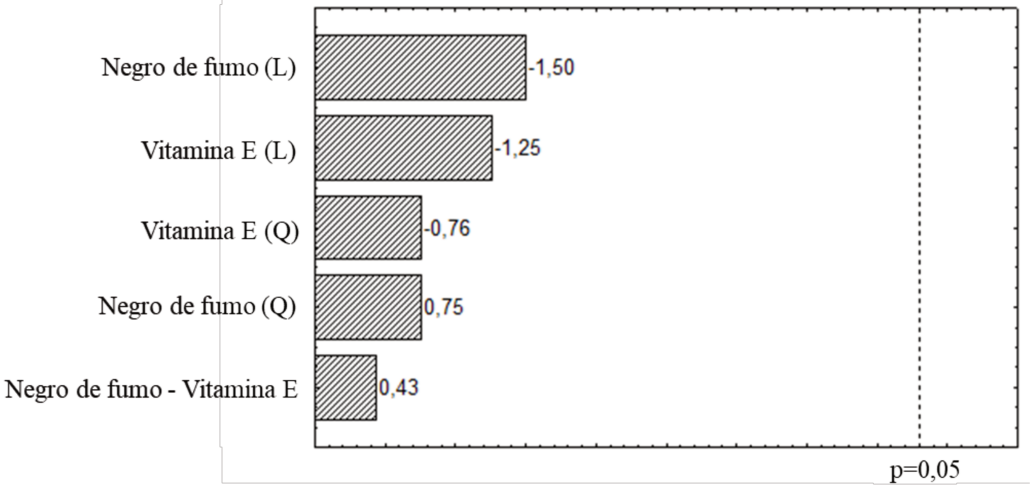
Tabela 14 - Estimativa dos efeitos e valores de p (ANOVA) para polidispersidade de amostras naturais de PBAT com os aditivos negro de fumo e Vitamina E.

Fatores	Efeito	Erro	p
Negro de fumo (L)	-0,001	0,22	1,00
Negro de fumo (Q)	0,22	0,26	0,49
Vitamina E (L)	-0,02	0,22	0,95
Vitamina E (Q)	-0,31	0,26	0,35
Negro de fumo-Vitamina E	0,15	0,31	0,69

Fonte: O autor (2019)

Após o envelhecimento, os dados de polidispersidade variaram entre 2,32 a 6,67. Para as amostras envelhecidas os fatores avaliados também não apresentaram influência estatisticamente significativa sobre a polidispersidade, conforme mostrado no gráfico de Pareto da Figura 44 e estimativa de efeitos da Tabela 15.

Figura 44 - Gráfico de Pareto da polidispersidade de amostras envelhecidas de PBAT com os aditivos negro de fumo e Vitamina E.



Fonte: O autor (2019)

Tabela 15 - Estimativa dos efeitos e valores de p (ANOVA) para polidispersidade de amostras envelhecidas de PBAT com os aditivos negro de fumo e Vitamina E.

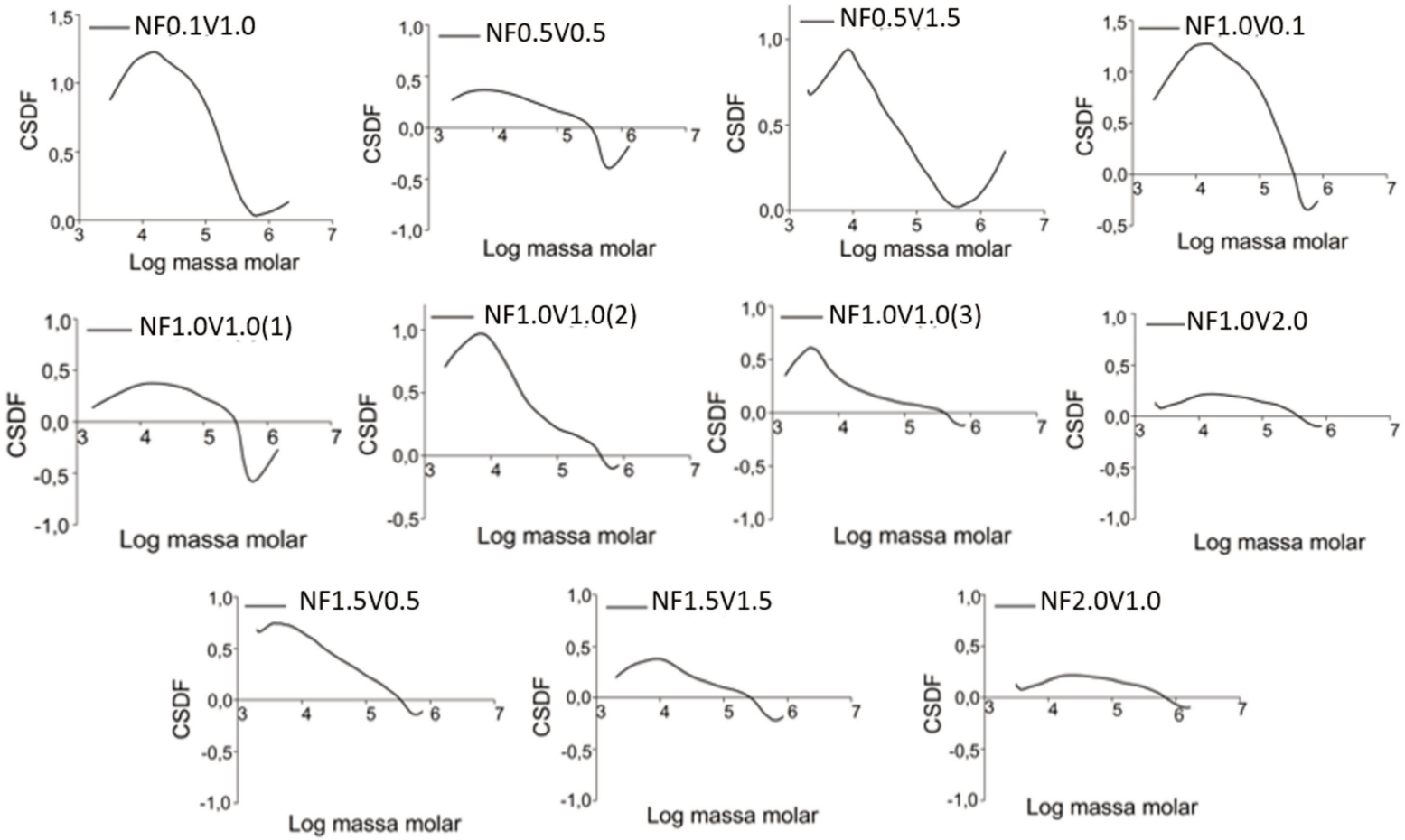
Fatores	Efeito	Erro	p
Negro de fumo (L)	-1,7	1,12	0,27
Negro de fumo (Q)	1,00	1,34	0,53
Vitamina E (L)	-1,41	1,12	0,34
Vitamina E (Q)	-1,01	1,34	0,53
Negro de fumo-Vitamina E	0,69	1,59	0,71

Fonte: O autor (2019)

As curvas CSDF para as amostras com negro de fumo e vitamina E (Figura 45) apresentaram predominância de valores positivos para todas as formulações, indicando maior cisão de cadeia em relação às curvas referentes ao PBAT com negro de fumo e HALS.

Uma vez que as formulações preparadas neste estudo apresentam as mesmas concentrações de negro de fumo nos dois planejamentos experimentais realizados, é possível inferir que o aditivo HALS em combinação com o negro de fumo é mais eficiente para minimizar o processo de cisão de cadeia de PBAT ao longo do período de envelhecimento acelerado. Em presença de luz e oxigênio, o aditivo HALS forma radicais nitroxila, os quais capturam radicais alquila formando os ésteres hidroxilamina. Estes ésteres reagem com radicais peroxila, o que permite a fotoestabilização e a regeneração de radicais nitroxila (AQUINO; ARAÚJO, 2004). Por outro lado, a vitamina E age pela conversão de radicais peroxila em hidroperóxidos e posteriormente reage com radicais peroxila, formando uma estrutura quinonóide (KLEIN; LUKES; CIBULKOVA, 2005). Devido à regeneração da nitroxila, o aditivo HALS permite uma ação mais prolongada para a fotoestabilização, levando à sua maior eficiência em relação ao aditivo fenólico (GENSLER et al., 2000).

Figura 45 - Curvas CSDF de filmes de PBAT com negro de fumo e Vitamina E.



Fonte: O autor (2019)

5.2.2. Análise do teor de gel

Os valores de teor de gel quantificados para o polímero PBAT puro estão apresentados na Tabela 16. Ao longo do tempo monitorado os resultados apresentaram ora aumento, ora diminuição. Este comportamento é diferente do reportado por Stloukal et al. (2012), em que os valores de teor de gel nas primeiras 10, 40 e 50 horas do teste de envelhecimento acelerado foram 8%, 34% e 37%, respectivamente. Todavia, os autores conduziram o teste em um equipamento que não utiliza ciclos de condensação.

Tabela 16 - Valores de teor de gel para filmes de PBAT puro no ensaio de envelhecimento acelerado

Período (horas)	Teor de gel (%)
0	0±0
5	25±5
10	78±3
12	26±3
22	59±15
24	26±2
29	53±10
34	59±9
36	31±5
96	13±3

Fonte: O autor (2019)

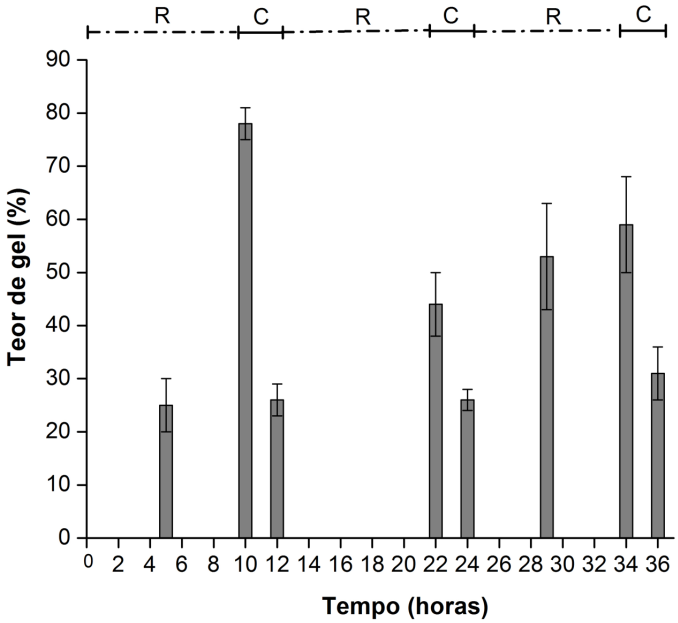
Conforme observa-se na Figura 46, nas primeiras 36 horas do experimento, o PBAT apresentou aumento dos valores de teor de gel ao longo dos ciclos de radiação e diminuição durante os ciclos de condensação, o que pode estar associado ao processo de hidrólise devido à ação do vapor d'água formado no simulador ambiental.

Kijchavengkul et al. (2011) realizaram testes de envelhecimento com 12 formulações de filmes de PBAT contendo negro de fumo e hidroxitolueno butilado-BHT. Todas as amostras apresentaram aumento crescente dos valores de teor de gel ao longo de 6 semanas. Neste caso o equipamento empregado no ensaio de envelhecimento foi feito com 2 ciclos de 12 h por dia, com 8h de radiação e 4 h de condensação. No referido estudo as formulações não sofreram em nenhum momento diminuição do teor de gel ao longo do período do ensaio atingindo valores entre 23 e 64%, após 6 semanas.

É possível que a presença de aditivos, que levam à proteção contra a fotodegradação, possa minimizar o processo de hidrólise em amostras submetidas aos ensaios de envelhecimento acelerado pelo fato de diminuir a cisão de cadeia em comparação ao polímero puro. Isso porque a flexibilidade de cadeias poliméricas é favorecida quando os valores de massa molar são mais baixos, e quanto maior a flexibilidade, mais água pode

penetrar nos espaços entre as cadeias, aumentando assim a taxa de degradação hidrolítica (KALE et al., 2007).

Figura 46 - Variação do teor de gel de PBAT puro durante o ensaio de envelhecimento acelerado. R-ciclo de radiação; C-ciclo de condensação.



Fonte: O autor (2019)

Lyu et al. (2007) observaram a relação entre a massa molar numérica média e a taxa de hidrólise para o poliéster poli(ácido lático) (PLA). No estudo, amostras de PLA foram expostas por 500 dias à solução de tampão fosfato salino em diferentes temperaturas (37 °C, 55 °C, 77 °C e 90 °C). Para todas as temperaturas foi observado decréscimo dos valores de $\overline{Mn}$ até que este atingisse um valor crítico, a partir do qual ocorria o aumento da taxa de hidrólise.

A variação dos valores de teor de gel indicada na Figura 46 sugere que a hidrólise é favorecida nos ciclos de condensação. Ressalta-se que, mesmo permanecendo 12 dias a menos no simulador ambiental do que as formulações com aditivos, a amostra de PBAT puro apresentou o menor teor de gel (13%) ao final do ensaio. A sua maior susceptibilidade à fotodegradação e a maior redução de sua massa molar podem, portanto, ter intensificado o processo de hidrólise para esta amostra.

A Tabela 17 mostra os resultados de teor de gel para as formulações de PBAT com aditivos. Antes do envelhecimento, todos os resultados foram nulos. A formação de gel ocorreu ao longo do experimento de envelhecimento acelerado, comportamento que

corrobora outros estudos de fotodegradação do polímero PBAT (KIJCHAVENGKUL et al., 2010a; KIJCHAVENGKUL et al., 2011; STLOUKAL et al., 2012).

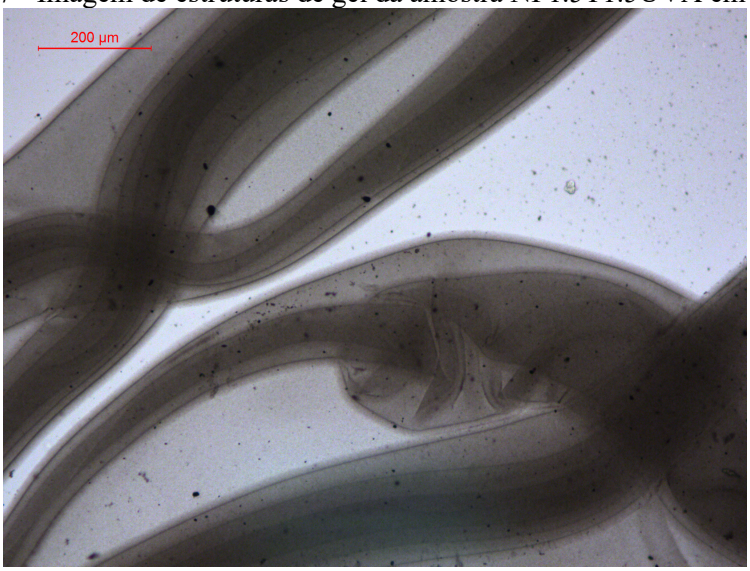
Tabela 17 - Valores de teor de gel para amostras naturais e envelhecidas de PBAT com "negro de fumo e HALS" e "negro de fumo e Vitamina E".

Amostras		Teor de gel (%)
Filmes de PBAT com negro de fumo e HALS	**NF0.1T1.0NAT**	0±0
	NF0.1T1.0UVA	62±1
	NF0.5T0.5NAT	0±0
	NF0.5T0.5UVA	56±3
	NF0.5T1.5NAT	0±0
	NF0.5T1.5UVA	71±1
	NF1.0T0.1NAT	0±0
	NF1.0T0.1UVA	53±2
	NF1.0T1.0(1)NAT	0±0
	NF1.0T1.0(1)UVA	49±1
	NF1.0T1.0(2)NAT	0±0
	NF1.0T1.0(2)UVA	50±1
	NF1.0T1.0(3)NAT	0±0
	NF1.0T1.0(3)UVA	62±3
	NF1.0T2.0NAT	0±0
	NF1.0T2.0UVA	50±2
	NF1.5T0.5NAT	0±0
	NF1.5T0.5UVA	42±0
	NF1.5T1.5NAT	0±0
	NF1.5T1.5UVA	45±4
	NF2.0T1.0NAT	0±0
	NF2.0T1.0UVA	44±5
Filmes de PBAT com negro de fumo e Vitamina E	**NF0.1V1.0NAT**	0±0
	NF0.1V1.0UVA	57±12
	NF0.5V0.5NAT	0±0
	NF0.5V0.5UVA	54±4
	NF0.5V1.5NAT	0±0
	NF0.5V1.5UVA	38±5
	NF1.0V0.1NAT	0±0
	NF1.0V0.1UVA	49±9
	NF1.0V1.0(1)NAT	0±0
	NF1.0V1.0(1)UVA	42±3
	NF1.0V1.0(2)NAT	0±0
	NF1.0V1.0(2)UVA	41±4
	NF1.0V1.0(3)NAT	0±0
	NF1.0V1.0(3)UVA	55±5
	NF1.0V2.0NAT	0±0
	NF1.0V2.0UVA	39±8
	NF1.5V0.5NAT	0±0
	NF1.5V0.5UVA	51±1
	NF1.5V1.5NAT	0±0
	NF1.5V1.5UVA	30±7
	NF2.0V1.0NAT	0±0
	NF2.0V1.0UVA	49±10

Fonte: O autor (2019)

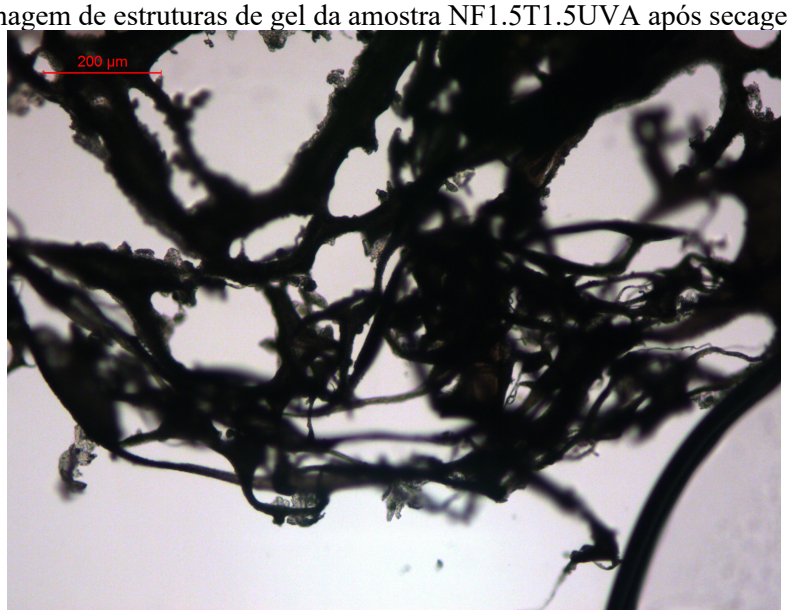
As Figuras 47 a 50 apresentam imagens de microscopia óptica que ilustram a formação de gel decorrente da reticulação do polímero PBAT, após o envelhecimento. Em solução com THF (Figuras 47 e 49) é possível observar estruturas alongadas e inchadas, associadas ao intumescimento do gel em presença do solvente. Após a secagem de THF e adição de água observou-se que o gel coalesceu (Figuras 48 e 50).

Figura 47 - Imagem de estruturas de gel da amostra NF1.5T1.5UVA em solução.



Fonte: O autor (2019)

Figura 48 - Imagem de estruturas de gel da amostra NF1.5T1.5UVA após secagem da solução.



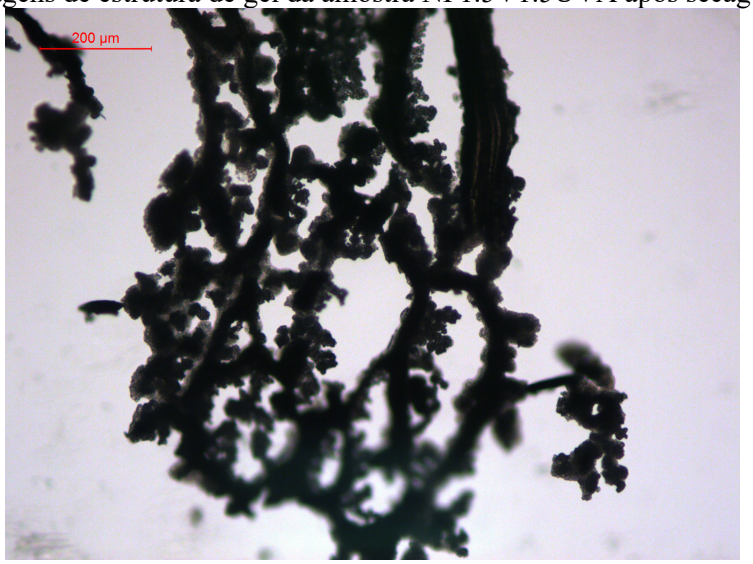
Fonte: O autor (2019)

Figura 49 - Imagem de estruturas de gel da amostra NF1.5V1.5UVA em solução.



Fonte: O autor (2019)

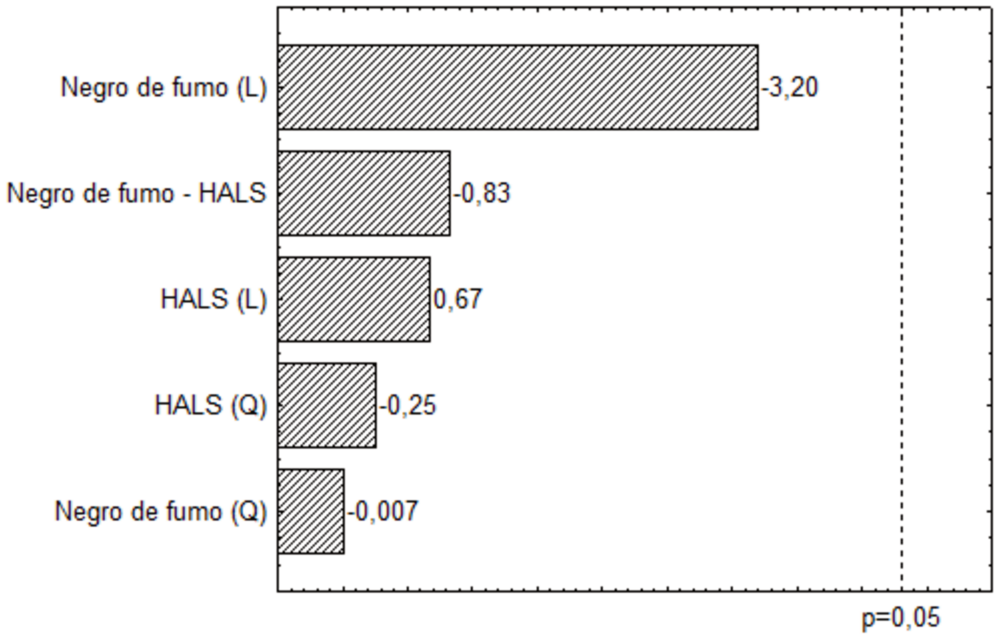
Figura 50 - Imagens de estrutura de gel da amostra NF1.5V1.5UVA após secagem da solução.



Fonte: O autor (2019)

Para os filmes de PBAT contendo negro de fumo e HALS, os resultados de teor de gel após o envelhecimento variaram entre 42 e 72%. Todavia, os fatores estudados não apresentaram influência estatisticamente significativa sobre esta resposta, conforme mostram o gráfico de Pareto (Figura 51) e a estimativa de efeitos da Tabela 18.

Figura 51 - Gráfico de Pareto do teor de gel de amostras envelhecidas de PBAT com os aditivos negro de fumo e HALS.



Fonte: O autor (2019)

Tabela 18 - Estimativa dos efeitos e valores de p (ANOVA) para teor de gel de amostras envelhecidas de PBAT com os aditivos negro de fumo e HALS.

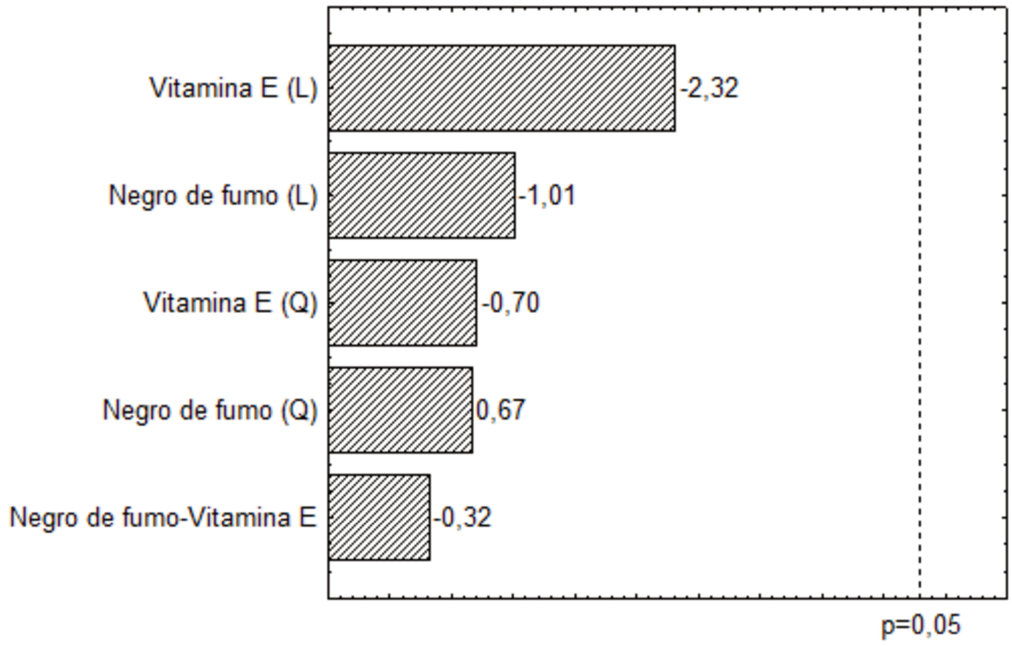
Fatores	Efeito	Erro	p
Negro de fumo (L)	-16,36	5,12	0,09
Negro de fumo (Q)	-0,04	6,09	0,99
HALS (L)	3,44	5,12	0,57
HALS (Q)	-1,54	6,09	0,82
Negro de fumo-HALS	-6,00	7,23	0,49

Fonte: O autor (2019)

Considerando as formulações com negro de fumo e HALS, as amostras NF1.5T0.5UVA, NF1.5T1.5UVA e NF2.0T1.0UVA apresentaram os menores valores de teor de gel (42, 45 e 43%, respectivamente).

Dentre as amostras com negro de fumo e vitamina E, a formulação que apresentou o menor valor médio de teor de gel (30%) foi a amostra NF1.5V1.5UVA. De acordo com o gráfico de Pareto (Figura 52) e a estimativa de efeitos (Tabela 19) também não houve influência estatisticamente significativa dos parâmetros avaliados sobre o teor de gel das amostras envelhecidas.

Figura 52 - Gráfico de Pareto do teor de gel de amostras envelhecidas de PBAT com os aditivos negro de fumo e vitamina E.



Fonte: O autor (2019)

Tabela 19 - Estimativa dos efeitos e valores de p (ANOVA) para teor de gel de amostras envelhecidas de PBAT com os aditivos negro de fumo e Vitamina E.

Fatores	Efeito	Erro	p
Negro de fumo (L)	-5,58	5,52	0,42
Negro de fumo (Q)	4,38	6,57	0,57
Vitamina E (L)	-12,79	5,52	0,15
Vitamina E (Q)	-4,63	6,57	0,55
Negro de fumo-Vitamina E	-2,50	7,81	0,78

Fonte: O autor (2019)

Rzepna, Przybytniak e Sadlo (2018) propuseram, a partir de análise de Espectroscopia de Reflectância Difusa (DRS), que o processo de reticulação do PBAT ocorre na região alifática pela combinação de radicais de carbono. Os radicais na região aromática tendem a formar produtos estáveis análogos de ortohidroxibenzoatos.

5.2.3. Análise de propriedades mecânicas

Os resultados das propriedades mecânicas para o PBAT puro, antes e após o ensaio de envelhecimento acelerado, estão apresentados na Tabela 20. Os gráficos de Tensão x Deformação estão apresentados no Apêndice F.

Tabela 20 - Propriedades mecânicas de filmes de PBAT puro antes e após envelhecimento acelerado.

Propriedade	Amostras	
	PBATNAT	**PBATUVA**
Módulo de Young (MPa)	70 ± 11	40 ± 7*
Alongamento (%)	330 ± 94	16 ± 5*
Resistência à tração (MPa)	16 ± 2	5 ± 1*

*estatisticamente significativo (teste t – $p<0,05$); Fonte: O autor (2019)

Tanto a cisão de cadeia como a reticulação, que ocorrem durante o processo de fotodegradação, podem levar à redução do alongamento. O módulo de Young e a resistência à tração podem aumentar devido à reticulação do material, que torna o polímero mais rígido, ou diminuir devido à cisão de cadeia (KIJCHAVENGKUL, 2010b; GUTIÉRREZ-VILLARREAL; ZAVALA-BETANCOURT, 2017). No caso da amostra PBATUVA, que sofreu redução estatisticamente significativa do módulo e resistência à tração, é possível inferir que embora o processo de reticulação tenha sido evidenciado pela formação de gel, a cisão de cadeia ocorreu em um grau suficiente para a perda dessas propriedades.

A curva CSDF da amostra PBATUVA corrobora este resultado, uma vez que apresentou apenas valores positivos, que remetem ao processo de cisão de cadeia do material polimérico. Além disso, conforme mencionado no item anterior, é possível que a hidrólise durante os ciclos de condensação tenha sido mais acentuada para a degradação do polímero puro devido à ausência de proteção contra a fotodegradação. Dessa forma, houve para esta amostra uma redução mais rápida da massa molar, o que pode acelerar a taxa de degradação hidrolítica (LYU et al., 2007; KALE et al., 2007).

A Tabela 21 indica os resultados obtidos para as propriedades mecânicas dos filmes de PBAT com as diferentes combinações de aditivos. Para a maioria das amostras não houve diferenças estatisticamente significativas do módulo de Young após o envelhecimento. A resistência à tração apresentou redução estatisticamente significativa para todas as amostras. O mesmo ocorreu para o alongamento com exceção da amostra NF1.5T1.5UVA.

Após o envelhecimento, os valores de alongamento e resistência à tração para as formulações com negro de fumo e Vitamina E variaram entre 17-90% e 4-8 MPa, respectivamente. Já para as formulações com negro de fumo e HALS, os valores de alongamento e resistência à tração após o envelhecimento variaram entre 37-391% e 8-15 MPa, respectivamente.

Considerando que ambos os planejamentos experimentais foram realizados com as mesmas concentrações do aditivo negro de fumo, pelos resultados de propriedades mecânicas é possível inferir que o aditivo vitamina E apresentou uma menor eficiência para complementar a ação absorvedora do negro de fumo do que o aditivo HALS.

Segundo Gensler et al. (2000) os estabilizadores fenólicos são consumidos durante sua ação fazendo com que após um período de indução ocorra uma repentina queda da resistência à tração e alongamento, enquanto que com os estabilizadores HALS há um decréscimo mais regular destas propriedades (Figura 53), possivelmente pelo mecanismo de ação envolver a regeneração da nitroxila.

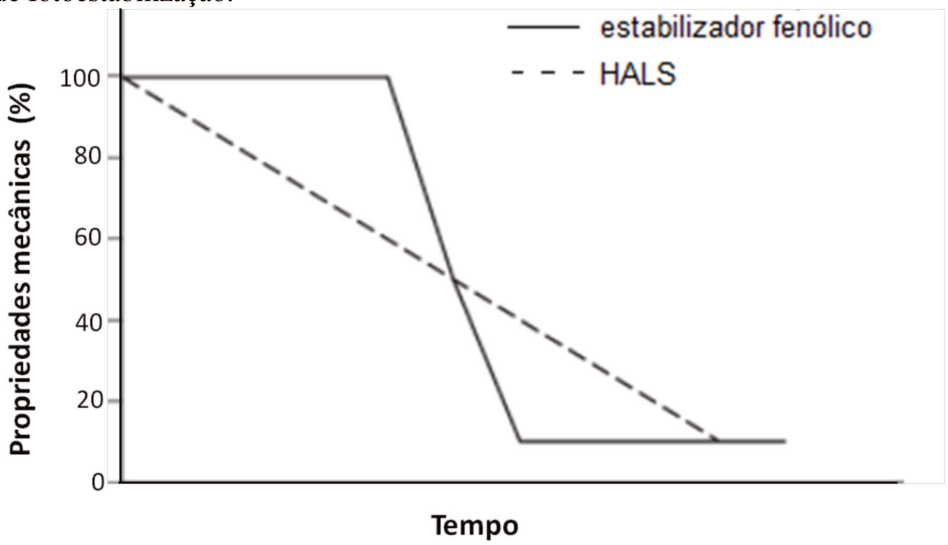
Dessa forma, é possível que, no presente estudo, o tempo ao qual as amostras ficaram expostas no simulador ambiental tenha sido superior ao tempo de indução, o que pode ter contribuído para a observação da maior perda de propriedades mecânicas para as amostras com estabilizador fenólico em relação àquelas com o estabilizador HALS.

Tabela 21 - Propriedades mecânicas das amostras naturais e envelhecidas de PBAT com aditivos.

Amostras		Módulo de Young (MPa)	Alongamento (%)	Resistência à tração (MPa)
Filmes de PBAT com negro de fumo e HALS	**NF0.1T1.0NAT**	59±9	427±27	21±3
	NF0.1T1.0UVA	62±8	37±7*	9±1*
	NF0.5T0.5NAT	44±8	375±25	19±2
	NF0.5T0.5UVA	52±8	77±16*	8±1*
	NF0.5T1.5NAT	55±4	448±59	23±3
	NF0.5T1.5UVA	59±10	82±40*	10±3*
	NF1.0T0.1NAT	56±7	360±22	20±2
	NF1.0T0.1UVA	53±5	195±24*	12±1*
	NF1.0T1.0(1)NAT	64±7	362±36	19±2
	NF1.0T1.0(1)UVA	49±6	260±64*	12±1*
	NF1.0T1.0(2)NAT	67±7	464±36	17±2
	NF1.0T1.0(2)UVA	65±16	179±113*	11±4*
	NF1.0T1.0(3)NAT	51±2	531±34	24±2
	NF1.0T1.0(3)UVA	65±6*	292±126*	10±1*
	NF1.0T2.0NAT	54±9	462±38	24±3
	NF1.0T2.0UVA	56±1	391±53*	15±2*
	NF1.5T0.5NAT	51±5	472±32	19±1
	NF1.5T0.5UVA	48±5	117±59*	11±1*
	NF1.5T1.5NAT	52±9	307±68	19±4
	NF1.5T1.5UVA	61±9	262±28	14±2*
	NF2.0T1.0NAT	44±3	428±10	21±2
	NF2.0T1.0UVA	63±12*	115±64*	10±1*
Filmes de PBAT com negro de fumo e Vitamina E	**NF0.1V1.0NAT**	51±8	485±45	12±1
	NF0.1V1.0UVA	64±13	17±9*	5±2*
	NF0.5V0.5NAT	55±11	491±35	17±1
	NF0.5V0.5UVA	37±8*	12±3*	4±1*
	NF0.5V1.5NAT	63±4	580±60	16±2
	NF0.5V1.5UVA	65±10	36±5*	7±1*
	NF1.0V0.1NAT	54±9	442±71	14±3
	NF1.0V0.1UVA	61±15	39±17*	7±2*
	NF1.0V1.0(1)NAT	60±9	555±45	16±2
	NF1.0V1.0(1)UVA	65±9	54±16*	8±1*
	NF1.0V1.0(2)NAT	57±9	469±11	13±1
	NF1.0V1.0(2)UVA	51±11	59±35*	8±0*
	NF1.0V1.0(3)NAT	56±4	460±84	14±2
	NF1.0V1.0(3)UVA	49±29	56±13*	7±3*
	NF1.0V2.0NAT	62±3	503±126	14±3
	NF1.0V2.0UVA	65±9	40±20*	8±1*
	NF1.5V0.5NAT	60±3	571±23	16±3
	NF1.5V0.5UVA	62±9	43±26*	8±2*
	NF1.5V1.5NAT	57±3	508±72	13±2
	NF1.5V1.5UVA	60±21	90±53*	8±2*
	NF2.0V1.0NAT	64±8	482±45	15±1
	NF2.0V1.0UVA	48±4*	23±12*	5±1*

*estatisticamente significativo (teste t – $p<0,05$); Fonte: O autor (2019)

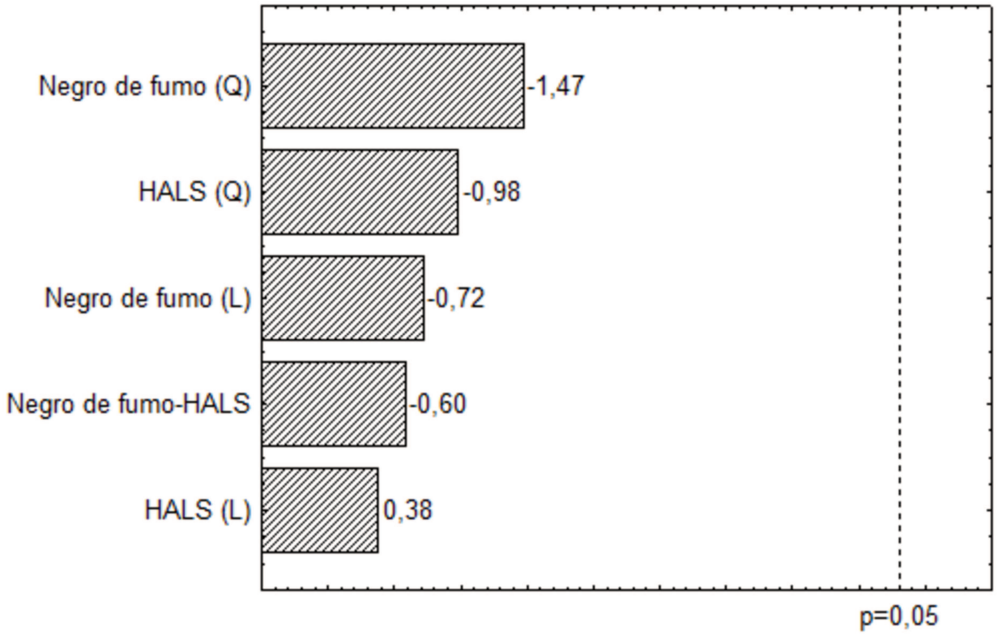
Figura 53 - Influência de estabilizadores fenólicos e HALS sobre propriedades mecânicas no processo de fotoestabilização.



Fonte: adaptado de Gensler et al. (2000) e Kutz (2012).

Pelo gráfico de Pareto apresentado na Figura 54 e a estimativa de efeitos na Tabela 22 não houve influência estatisticamente significativa do módulo de Young para as amostras naturais de PBAT com os aditivos negro de fumo e HALS.

Figura 54 - Gráfico de Pareto do Módulo de Young de amostras naturais de PBAT com os aditivos negro de fumo e HALS.



Fonte: O autor (2019)

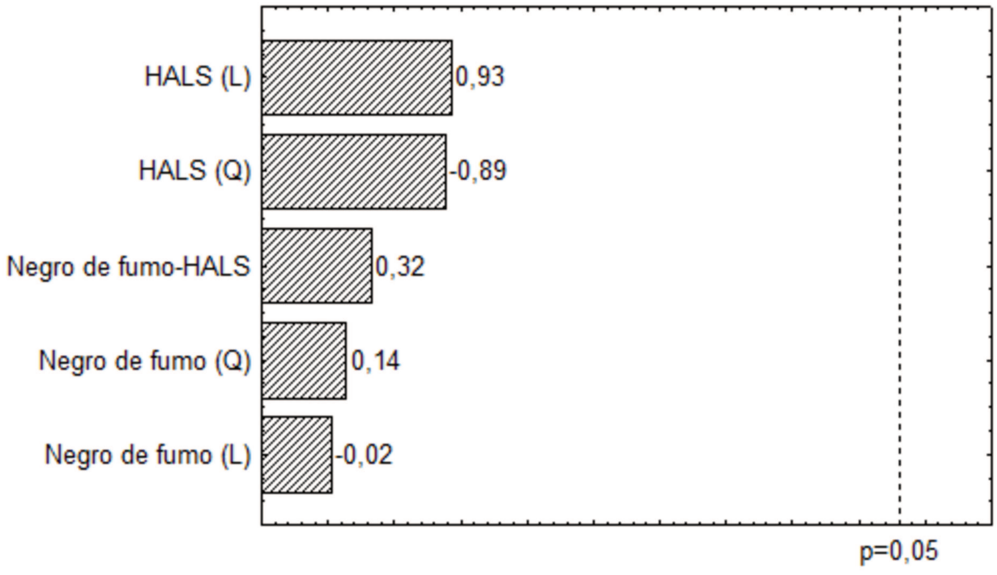
Tabela 22 - Estimativa dos efeitos e valores de p (ANOVA) para Módulo de Young de amostras naturais de PBAT com os aditivos negro de fumo e HALS.

Fatores	Efeito	Erro	p
Negro de fumo (L)	-4,30	6,01	0,55
Negro de fumo (Q)	-10,54	7,16	0,28
HALS (L)	2,29	6,01	0,43
HALS (Q)	-7,04	7,16	0,43
Negro de fumo-HALS	-5,00	8,50	0,62

Fonte: O autor (2019)

Após o envelhecimento, os teores de negro de fumo e HALS também não foram estatisticamente significativos para o módulo de Young. Embora a influência não tenha sido constatada pela análise estatística (Figura 55 e Tabela 23), ressalta-se que ao contrário do polímero puro, nenhuma amostra com estes aditivos sofreu redução significativa desta propriedade após o envelhecimento, indicando que a presença dos aditivos leva a uma proteção do PBAT contra o processo de fotodegradação, minimizando a cisão de cadeia do material polimérico.

Figura 55 - Gráfico de Pareto do módulo de Young de amostras envelhecidas de PBAT com os aditivos negro de fumo e HALS.



Fonte: O autor (2019)

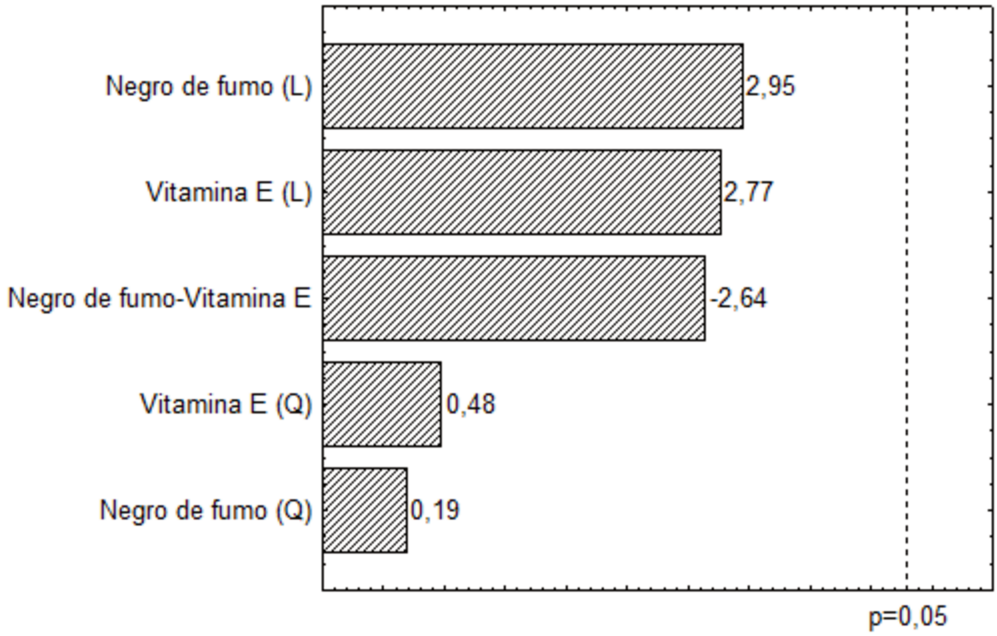
Tabela 23 - Estimativa dos efeitos e valores de p (ANOVA) para Módulo de Young de amostras envelhecidas de PBAT com os aditivos negro de fumo e HALS.

Fatores	Efeito	Erro	p
Negro de fumo (L)	-0,15	6,53	0,98
Negro de fumo (Q)	1,08	7,77	0,90
HALS (L)	6,06	6,53	0,45
HALS (Q)	-6,92	7,78	0,47
Negro de fumo-HALS	3,00	9,24	0,78

Fonte: O autor (2019)

Os teores de negro de fumo e Vitamina E não influenciaram de forma estatisticamente significativa o módulo de Young do polímero PBAT antes do envelhecimento. Os resultados do gráfico de Pareto e estimativa de efeitos estão apresentados na Figura 56 e Tabela 24, respectivamente.

Figura 56 - Gráfico de Pareto do Módulo de Young de amostras naturais de PBAT com os aditivos negro de fumo e Vitamina E.



Fonte: O autor (2019)

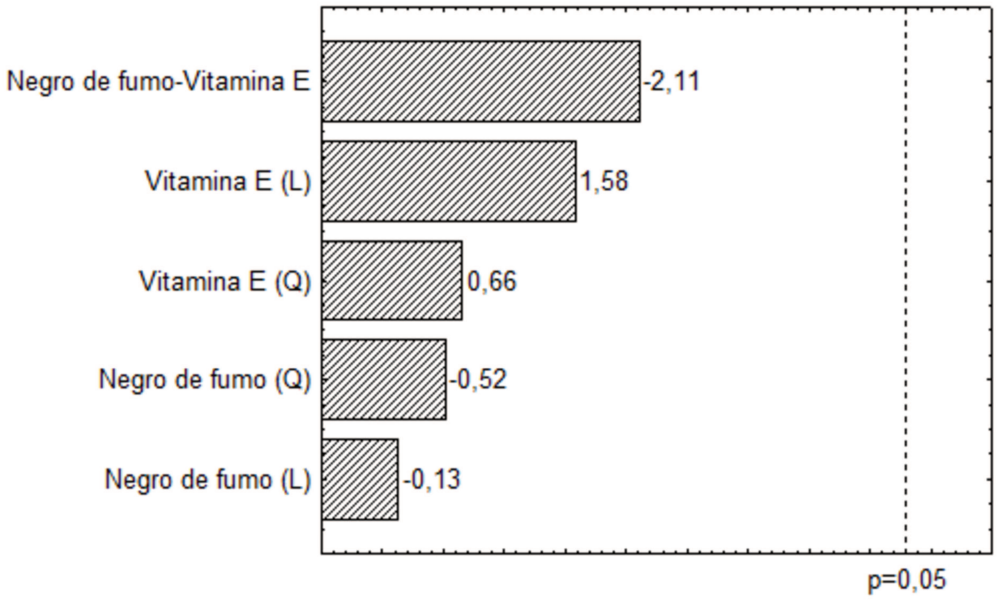
Tabela 24 - Estimativa dos efeitos e valores de p (ANOVA) para Módulo de Young de amostras naturais de PBAT com os aditivos negro de fumo e Vitamina E.

Fatores	Efeito	Erro	p
Negro de fumo (L)	4,35	1,47	0,10
Negro de fumo (Q)	0,33	1,75	0,87
Vitamina E (L)	4,35	1,47	0,10
Vitamina E (Q)	0,83	1,75	0,68
Negro de fumo-Vitamina E	-5,50	2,08	0,12

Fonte: O autor (2019)

Após o envelhecimento acelerado, os teores de negro de fumo e vitamina E também não apresentaram influência estatisticamente significativa sobre o Módulo de Young, conforme o gráfico de Pareto da Figura 57 e a estimativa de efeitos da Tabela 25. Ressalta-se que, com exceção da amostra NF0.5V0.5UVA, todas as amostras apresentaram resultados para esta propriedade superiores aos obtidos para o polímero puro envelhecido, indicando que foi possível a proteção do polímero PBAT com os aditivos empregados. A referida amostra apresentou resultado de 37 MPa para o módulo de Young, próximo ao obtido para a amostra PBATUVA (40 MPa). Ressalta-se que em relação à amostra natural, esta formulação apresentou redução de 33% para esta propriedade após 14 dias de exposição no simulador ambiental, enquanto que para o PBAT puro essa redução foi de 43% após apenas 4 dias do início do ensaio de envelhecimento acelerado. Dessa forma, a amostra NF0.5V0.5UVA também possibilitou proteção contra a fotodegradação quando comparada a polímero sem aditivos.

Figura 57 - Gráfico de Pareto do Módulo de Young de amostras envelhecidas de PBAT com os aditivos negro de fumo e Vitamina E.



Fonte: O autor (2019)

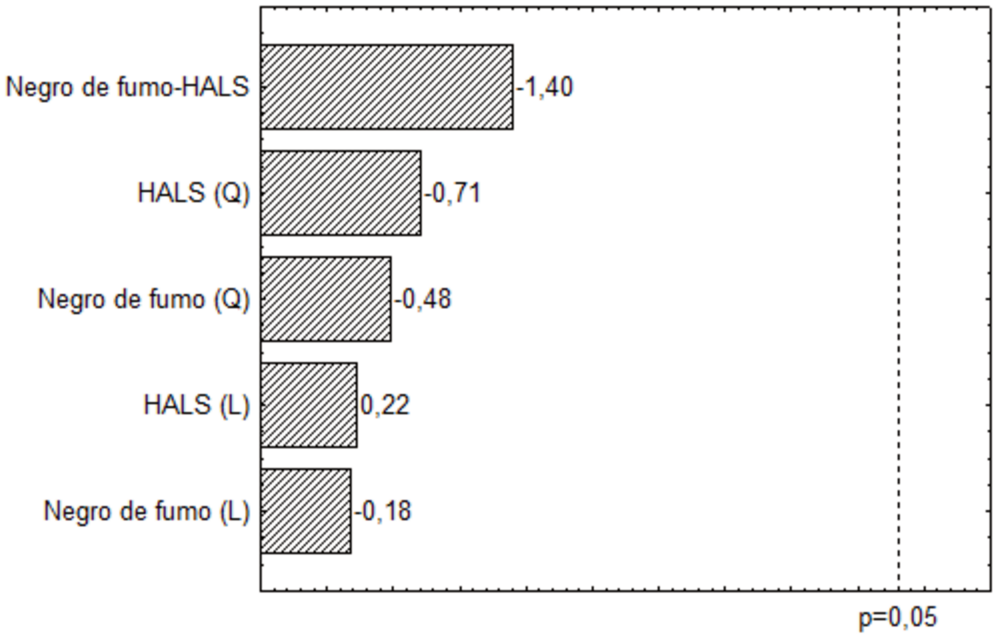
Tabela 25 - Estimativa dos efeitos e valores de p (ANOVA) para Módulo de Young de amostras envelhecidas de PBAT com os aditivos negro de fumo e Vitamina E.

Fatores	Efeito	Erro	p
Negro de fumo (L)	-0,66	5,02	0,91
Negro de fumo (Q)	-3,10	5,97	0,66
Vitamina E (L)	7,91	5,02	0,26
Vitamina E (Q)	3,92	5,97	0,58
Negro de fumo-Vitamina E	-15,00	7,09	0,17

Fonte: O autor (2019)

No planejamento com formulações aditivadas com negro de fumo e HALS, não foi observada influência significativa dos fatores variados sobre o alongamento, conforme observa-se pelo gráfico de Pareto e estimativa de efeitos da Figura 58 e Tabela 26, respectivamente.

Figura 58 - Gráfico de Pareto do alongamento de amostras naturais de PBAT com os aditivos negro de fumo e HALS.



Fonte: O autor (2019)

Tabela 26 - Estimativa dos efeitos e valores de p (ANOVA) para alongamento de amostras naturais de PBAT com os aditivos negro de fumo e HALS.

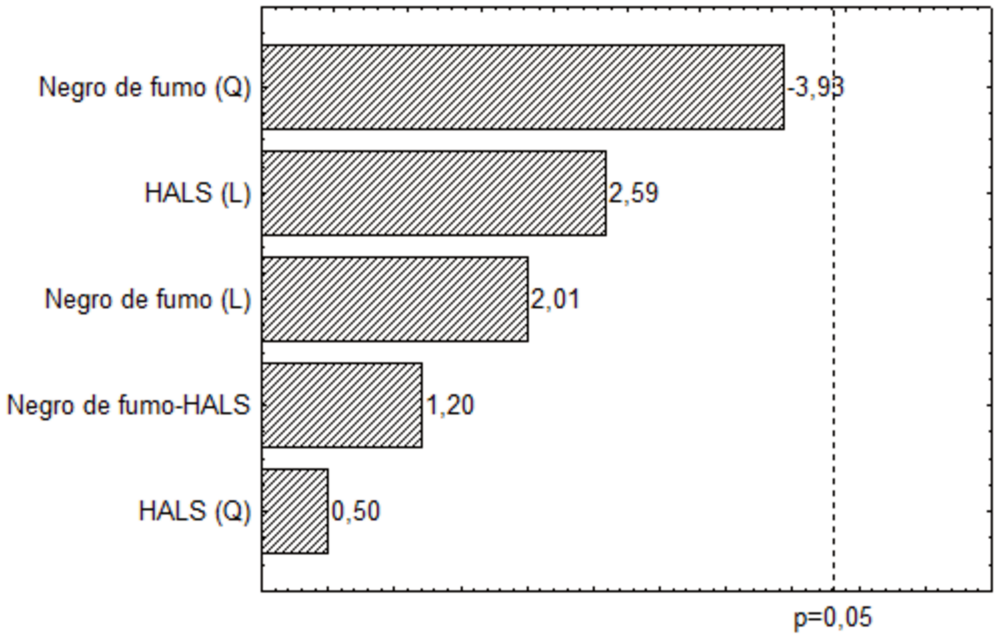
Fatores	Efeito	Erro	p
Negro de fumo (L)	-10,65	60,18	0,88
Negro de fumo (Q)	-34,21	71,62	0,68
HALS (L)	13,06	60,18	0,85
HALS (Q)	-50,71	71,62	0,55
Negro de fumo-HALS	-119,00	85,10	0,30

Fonte: O autor (2019)

De acordo com os resultados do gráfico de Pareto (Figura 59) e a estimativa de efeitos (Tabela 27), após o envelhecimento acelerado também não foi constatada influência estatisticamente significativa dos fatores variados sobre a propriedade alongamento.

O menor resultado de alongamento obtido para amostras de PBAT com negro de fumo e HALS envelhecidas foi o da amostra NF0.1T1.0UVA, igual a 37%. Ainda assim, este resultado é cerca de duas vezes superior ao obtido para a amostra PBATUVA, indicando que a combinação de aditivos proposta é adequada para a proteção do polímero PBAT contra o processo de fotodegradação.

Figura 59 - Gráfico de Pareto do alongamento de amostras envelhecidas de PBAT com os aditivos negro de fumo e HALS.



Fonte: O autor (2019)

Tabela 27 - Estimativa dos efeitos e valores de p (ANOVA) para alongamento de amostras envelhecidas de PBAT com aditivos negro de fumo e HALS.

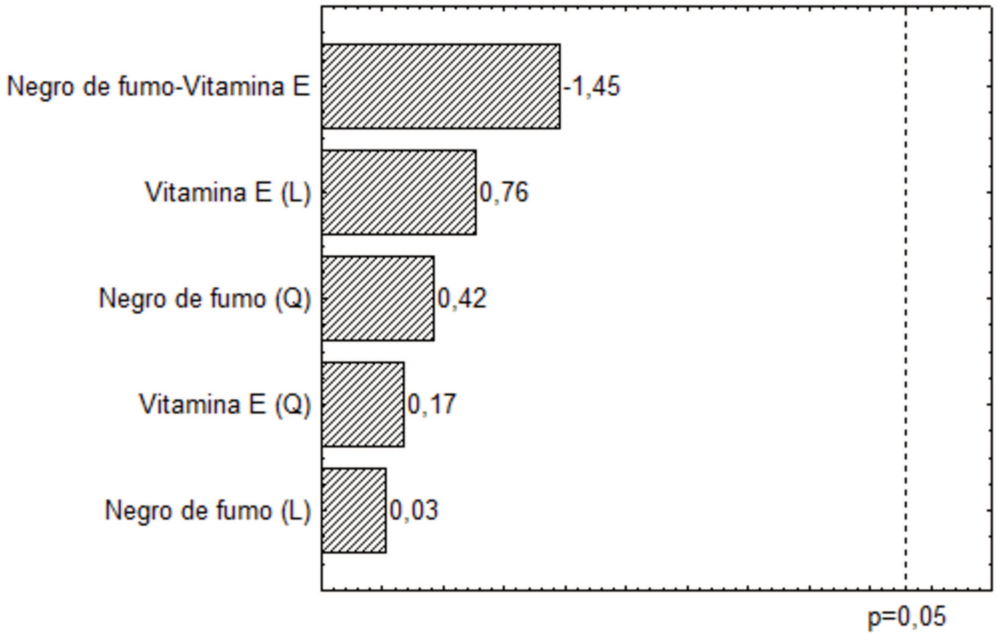
Fatores	Efeito	Erro	p
Negro de fumo (L)	82,58	41,18	0,18
Negro de fumo (Q)	-192,67	49,02	0,06
HALS (L)	106,80	41,18	0,12
HALS (Q)	24,33	49,02	0,67
Negro de fumo-Vitamina E	70,00	58,24	0,35

Fonte: O autor (2019)

Quatro amostras deste planejamento, mesmo após o envelhecimento, mantiveram o valor de alongamento acima de 200%, recomendado pela norma EN 13655 (2002) para filmes poliméricos empregados em *mulching*: NF1.0T1.0(2)UVA, NF1.0T1.0(3)UVA, NF1.0T2.0UVA e NF1.5T1.5UVA. Dentre essas formulações destacam-se as amostras NF1.0T2.0UVA e NF1.5T1.5UVA, pois apresentaram menor porcentagem de redução dessa propriedade em relação às amostras naturais, de apenas 15%. No entanto, a amostra NF1.5T1.5UVA foi a única deste planejamento que não apresentou redução estatisticamente significativa pelo teste-t desta propriedade, o que permite indicar essa formulação como promissora para aplicação como filme *mulch*.

Para as amostras naturais de PBAT com os aditivos negro de fumo e vitamina E não houve influência estatisticamente significativa dos fatores avaliados sobre a propriedade alongamento, conforme indicam o gráfico de Pareto na Figura 60 e a estimativa de efeitos na Tabela 28.

Figura 60 - Gráfico de Pareto do alongamento de amostras naturais de PBAT com os aditivos negro de fumo e Vitamina E.



Fonte: O autor (2019)

Tabela 28 - Estimativa dos efeitos e valores de p (ANOVA) para alongamento de amostras naturais de PBAT com os aditivos negro de fumo e vitamina E.

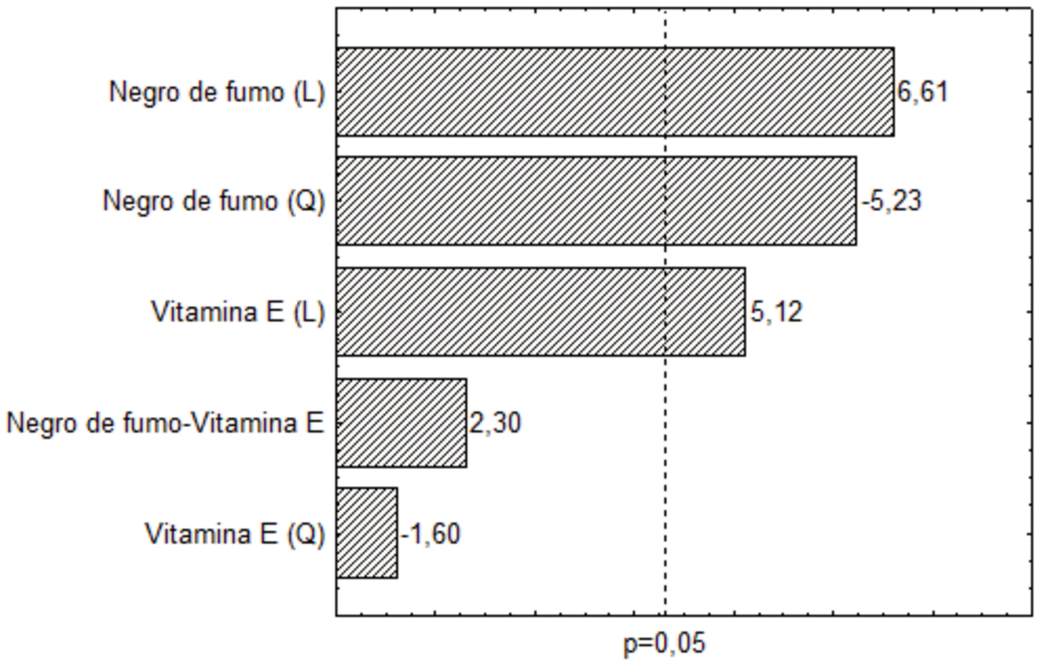
Fatores	Efeito	Erro	p
Negro de fumo (L)	0,94	37,08	0,98
Negro de fumo (Q)	18,58	44,14	0,71
Vitamina E (L)	28,07	37,08	0,53
Vitamina E (Q)	7,58	44,14	0,88
Negro de fumo-Vitamina E	-76,00	52,44	0,28

Fonte: O autor (2019)

Após o envelhecimento, os resultados do planejamento experimental, o gráfico de Pareto (Figura 61) e estimativa de efeitos (Tabela 29) revelaram que os fatores negro de fumo (linear) e vitamina E (linear) apresentam influência estatisticamente significativa sobre a propriedade alongamento, sendo os valores dos efeitos positivos. Dessa forma, com o aumento da concentração ocorre aumento do alongamento.

O fator negro de fumo (quadrático) apresentou valor de efeito negativo e também foi estatisticamente significativo. Este comportamento pode estar associado ao fato de que os resultados de alongamento apresentaram tendência de aumento até o nível +1 deste fator, quando o resultado foi o mais alto entre as amostras (90%), mas para o ponto axial, cujo nível é +1,414, houve redução da propriedade para 23%. Dessa forma, esta tendência de aumento dos valores de alongamento seguido de um ponto ótimo (para a formulação NF1.5V1.5UVA) e logo após queda do resultado, torna coerente a significância estatística da componente quadrática.

Figura 61 - Gráfico de Pareto do alongamento de amostras envelhecidas de PBAT com os aditivos negro de fumo e vitamina E.



Fonte: O autor (2019)

Tabela 29 - Estimativa dos efeitos e valores de p (ANOVA) para alongamento de amostras envelhecidas de PBAT com os aditivos negro de fumo e Vitamina E.

Fatores	Efeito	Erro	p
Negro de fumo (L)	23,37	3,54	0,02*
Negro de fumo (Q)	-26,25	4,21	0,02*
Vitamina E (L)	18,10	3,54	0,04*
Vitamina E (Q)	-6,75	4,21	0,25
Negro de fumo-Vitamina E	11,50	5,00	0,15

*estatisticamente significativo (ANOVA – $p<0,05$); Fonte: O autor (2019)

É possível que, para a maior concentração de negro de fumo, a dispersão tenha sido inferior em relação à concentração de 1,5%. Este fator pode diminuir a eficiência do negro de fumo em absorver a radiação ultravioleta e minimizar sua interação com o polímero, pois a eventual presença de aglomerados pode aumentar o espalhamento e minimizar a absorção da radiação (BREWER, 2004).

A avaliação das propriedades de alongamento permite propor que, em ambos os planejamentos, as formulações de nível +1 para o negro de fumo e +1 para o estabilizador HALS ou vitamina E foram aquelas que minimizaram com maior eficiência a perda de alongamento decorrente do processo de fotodegradação.

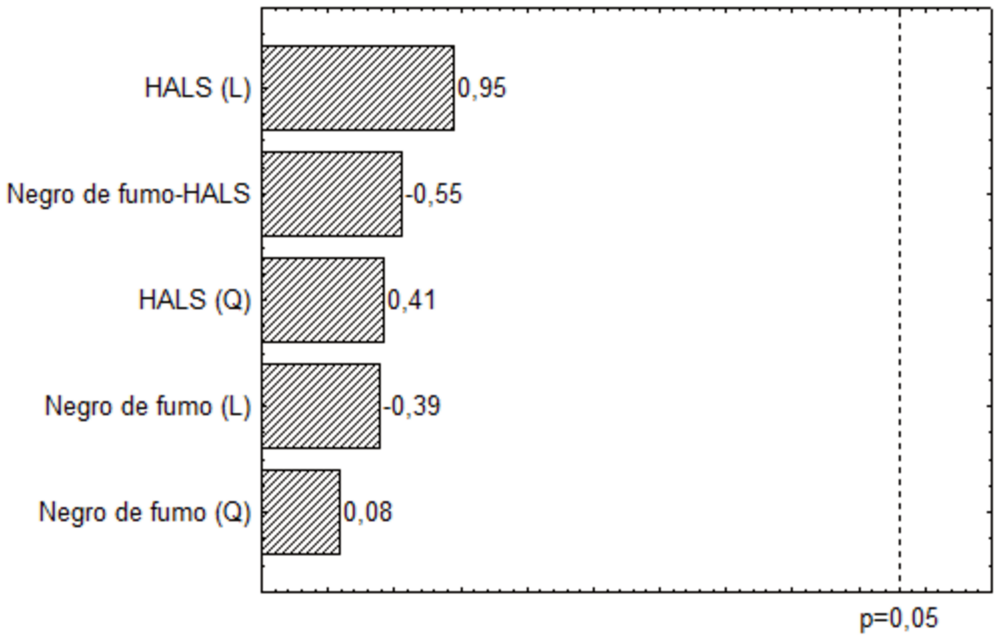
Este resultado corrobora a avaliação de teor gel já que a formulação NF1.5V1.5UVA apresentou o menor resultado deste parâmetro quando comparada às outras

amostras com negro de fumo e vitamina E. Já a amostra NF1.5T1.5UVA apresentou valor de 45%, entre os mais baixos para este planejamento experimental juntamente com as amostras NF1.5T0.5UVA e NF2.0T1.0UVA. Comparando as curvas CSDF destas três amostras, a formulação com concentração de 1,5% em massa dos aditivos negro de fumo e estabilizador HALS apresentou o menor grau de reticulação, revelada por uma menor região da curva com valores negativos.

Ressalta-se que a formulação NF1.5V1.5UVA apresentou valor de alongamento após o envelhecimento acelerado (90%) inferior ao preconizado pela norma EN 13655 (2002) para aplicação de materiais poliméricos em filmes *mulch*, de 200%.

O gráfico de Pareto da Figura 62 e a estimativa de efeitos apresentada na Tabela 30 mostram que nenhum dos fatores avaliados foi estatisticamente significativo para a resistência à tração de amostras naturais de PBAT com negro de fumo e HALS.

Figura 62 - Gráfico de Pareto da resistência à tração de amostras naturais de PBAT com os aditivos negro de fumo e HALS.



Fonte: O autor (2019)

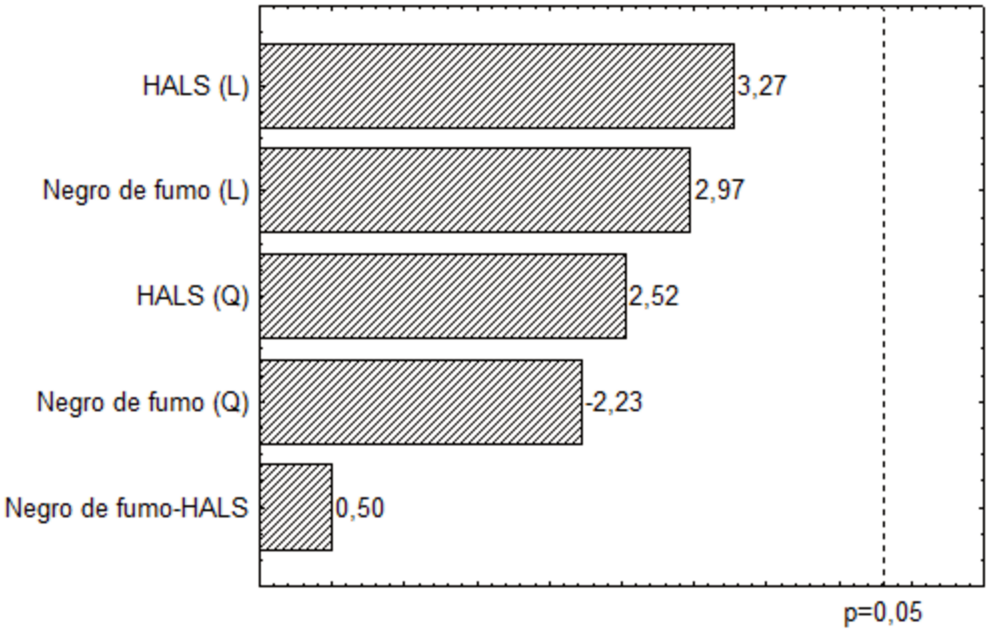
Tabela 30 - Estimativa dos efeitos e valores de p (ANOVA) para resistência à tração de amostras naturais de PBAT com os aditivos negro de fumo e HALS.

Fatores	**Efeito**	**Erro**	**p**
Negro de fumo (L)	-1,00	2,55	0,73
Negro de fumo (Q)	2,41	2,55	0,44
HALS (L)	-1,00	2,55	0,73
HALS (Q)	1,25	3,03	0,72
Negro de fumo-HALS	-2,00	2,55	0,44

Fonte: O autor (2019)

Após o envelhecimento também não foi constatada influência estatisticamente significativa dos teores de negro de fumo e HALS sobre a resistência à tração, conforme o gráfico de Pareto e a estimativa de efeitos apresentados na Figura 63 e Tabela 31.

Figura 63 - Gráfico de Pareto da resistência à tração de amostras envelhecidas de PBAT com os aditivos negro de fumo e HALS.



Fonte: O autor (2019)

Tabela 31 - Estimativa dos efeitos e valores de p (ANOVA) para resistência à tração de amostras envelhecidas de PBAT com os aditivos negro de fumo e HALS.

Fatores	**Efeito**	**Erro**	**p**
Negro de fumo (L)	2,10	0,71	0,10
Negro de fumo (Q)	-1,88	0,84	0,16
HALS (L)	2,31	0,71	0,08
HALS (Q)	2,13	0,84	0,13
Negro de fumo-HALS	0,50	1,00	0,67

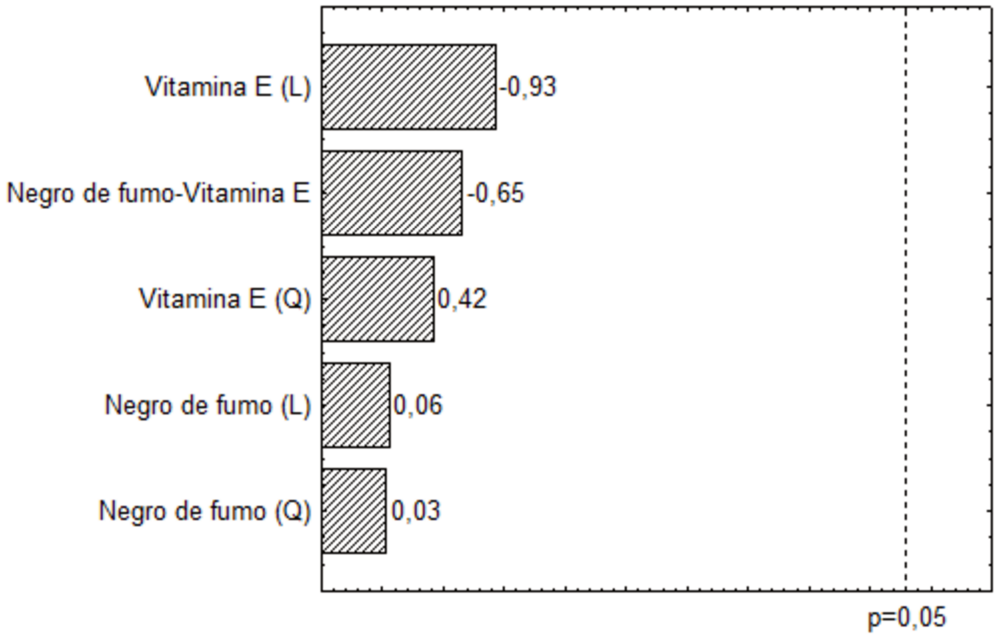
Fonte: O autor (2019)

Ressalta-se que a amostra NF1.5T1.5UVA, selecionada quanto ao critério de alongamento, apresentou valor de resistência à tração de 14 MPa. Este resultado é inferior, porém próximo, do critério estabelecido pela norma EN13655 (2002), que recomenda o resultado de 16 MPa. Todavia, o valor é superior ao critério sugerido por Kijchavengkul et al.(2008a, 2011), de 6 MPa.

Para as amostras naturais de PBAT com negro de fumo e vitamina E não houve influência estatisticamente significativa sobre a resistência à tração. Os resultados da análise

estatística estão apresentados na Figura 64 com o gráfico de Pareto e Tabela 32, com a análise de efeitos.

Figura 64 - Gráfico de Pareto da resistência à tração de amostras naturais de PBAT com os aditivos negro de fumo e vitamina E.



Fonte: O autor (2019)

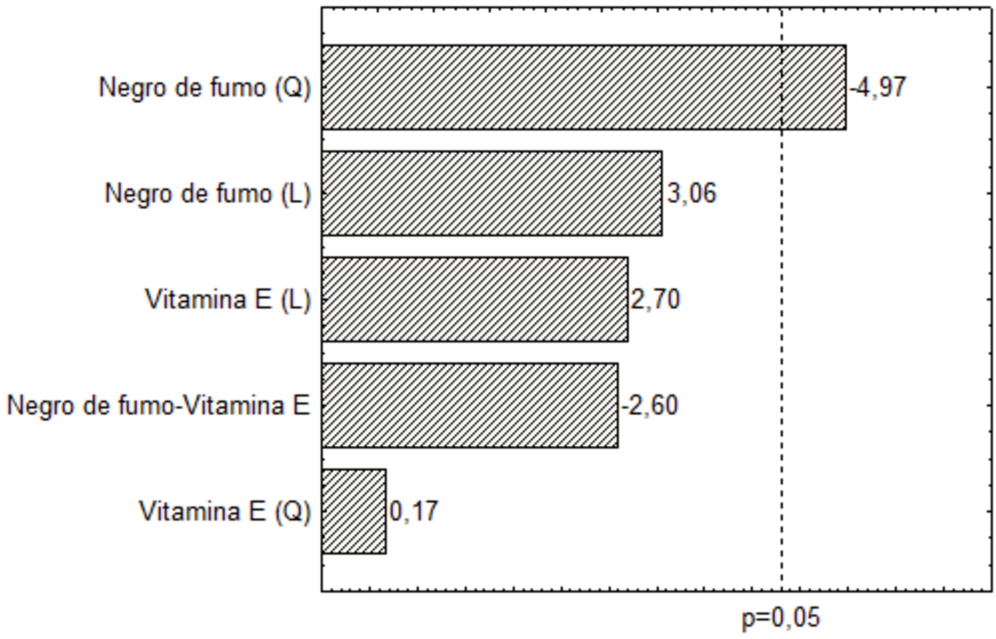
Tabela 32 - Estimativa dos efeitos e valores de p (ANOVA) para resistência à tração de amostras naturais de PBAT com os aditivos negro de fumo e Vitamina E.

Fatores	**Efeito**	**Erro**	**p**
Negro de fumo (L)	0,06	1,08	0,96
Negro de fumo (Q)	0,04	1,29	0,98
Vitamina E (L)	-1,00	1,08	0,45
Vitamina E (Q)	0,54	1,29	0,71
Negro de fumo-Vitamina E	-1,00	1,53	0,58

Fonte: O autor (2019)

Após o ensaio de envelhecimento acelerado, conforme indicam o gráfico de Pareto (Figura 65) e a estimativa de efeitos (Tabela 33), o fator negro de fumo (quadrático) influenciou de forma estatisticamente significativa a resistência à tração. Neste caso, ressalta-se que a maioria das formulações nos níveis 0 e +1 para negro de fumo do planejamento apresentaram resultado de 8 MPa para esta propriedade, superiores aos obtidos para os níveis -1,414, 0 e -1. Todavia, o ponto axial para o absorvedor (nível +1,414) apresentou queda para 5 MPa, o que justifica efeito quadrático mencionado.

Figura 65 - Gráfico de Pareto da resistência à tração de amostras envelhecidas de PBAT com os aditivos negro de fumo e Vitamina E.



Fonte: O autor (2019)

Tabela 33 - Estimativa dos efeitos e valores de p (ANOVA) para resistência à tração de amostras envelhecidas de PBAT com os aditivos negro de fumo e HALS.

Fatores	Efeito	Erro	p
Negro de fumo (L)	1,25	0,41	0,09
Negro de fumo (Q)	-2,42	0,49	0,04*
Vitamina E (L)	1,10	0,41	0,11
Vitamina E (Q)	0,08	0,49	0,88
Negro de fumo-vitamina E	-1,50	0,58	0,12

*estatisticamente significativo (ANOVA – $p<0,05$); Fonte: O autor (2019)

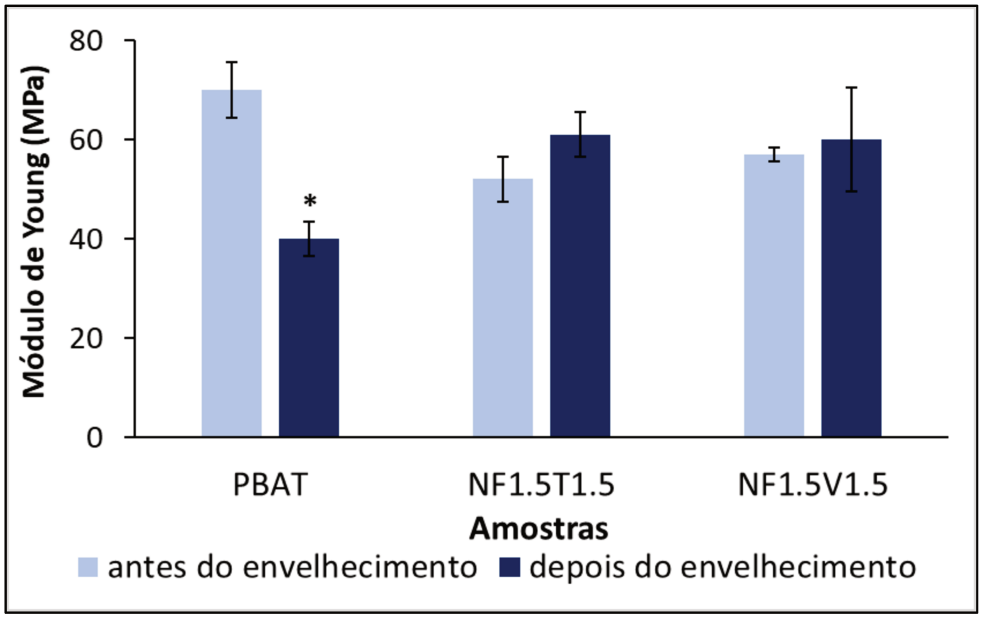
O resultado de resistência à tração para a formulação selecionada pelo critério de alongamento (NF1.5V1.5UVA) foi 8 MPa o qual é inferior ao critério estabelecido pela norma EN 13655 (2002) de 16 MPa. O resultado, embora próximo, é superior ao recomendado por Kijchavengkul et al. (2011), de 6 MPa.

Reitera-se que o estabilizador fenólico, embora tenha minimizado os efeitos da fotodegradação durante o ensaio de envelhecimento acelerado, apresentou eficiência inferior ao estabilizador HALS quando empregado em combinação com o negro de fumo.

Pelos resultados apresentados sugere-se que, com relação às propriedades mecânicas de alongamento e resistência à tração, as formulações NF1.5T1.5UVA e NF1.5V1.5UVA foram as mais interessantes para minimizar os efeitos de fotodegradação do polímero PBAT.

Para ilustrar a comparação entre estas amostras e o PBAT puro quanto às propriedades mecânicas, foram elaborados os gráficos das Figuras 66 a 68, contemplando os resultados de módulo de Young, alongamento e resistência à tração, respectivamente. O módulo de Young (Figura 66) apenas apresentou redução estatisticamente significativa na ausência de aditivos, o que ilustra a importância da aditivação para a fotoestabilização deste polímero.

Figura 66 - Módulo de Young, antes e após envelhecimento, para amostras selecionadas e PBAT puro.

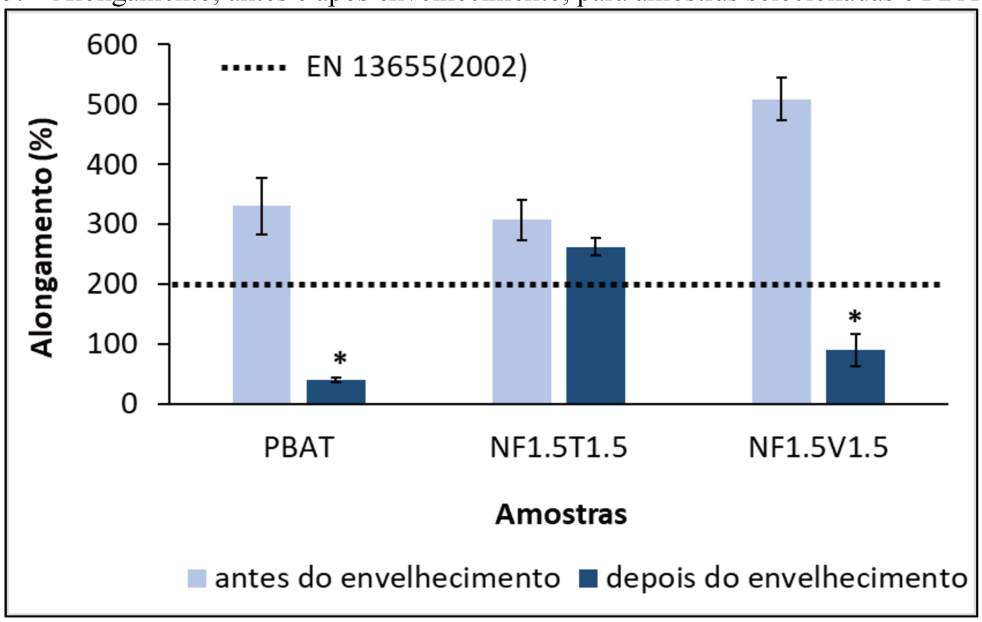


Fonte: O autor (2019)

Pela análise dos resultados de alongamento (Figura 67), apenas a amostra NF1.5T1.5 não apresentou redução estatisticamente significativa após o envelhecimento, sendo a única a manter este parâmetro de acordo com o recomendado pela norma EN 13655(2002), acima de 200%. Embora a amostra NF1.5V1.5 envelhecida não tenha atendido este valor, o alongamento dessa amostra após o envelhecimento foi cerca de duas vezes superior ao PBAT puro, indicando sua capacidade de minimizar efeitos da fotodegradação.

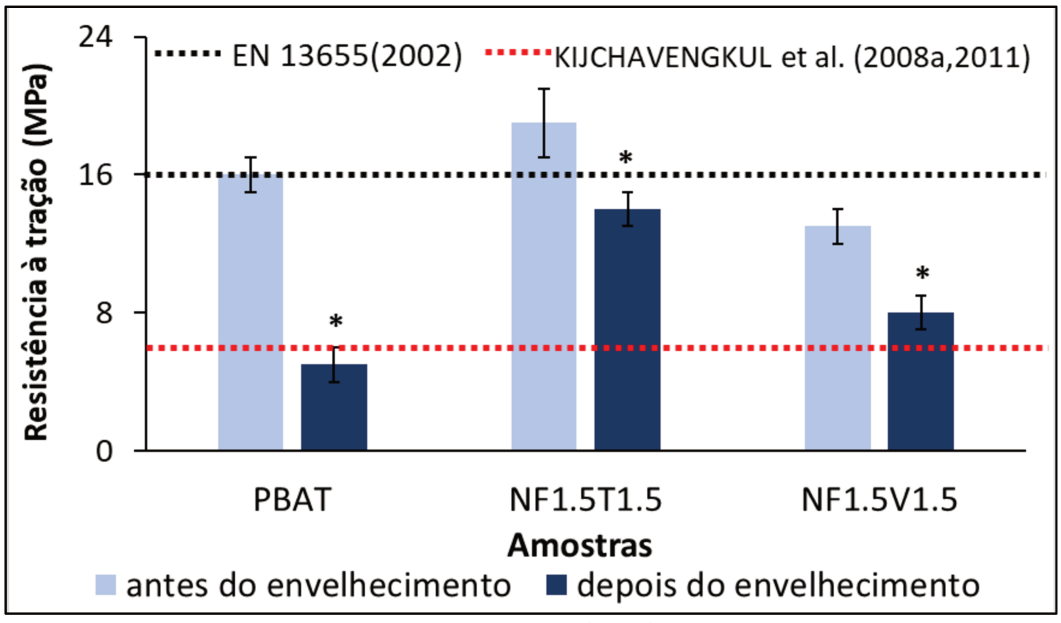
A Figura 68 mostra que a resistência à tração da formulação envelhecida NF1.5V1.5 atendeu ao critério preconizado por Kijchavengkul et al. (2008a, 2011), de 6 MPa. A formulação NF1.5T1.5 envelhecida não atendeu, porém apresentou valor próximo ao critério mais rigoroso, da norma EN 13655 (2002), de 16 MPa. Por outro lado, o polímero puro não atingiu nenhuma das recomendações.

Figura 67 - Alongamento, antes e após envelhecimento, para amostras selecionadas e PBAT puro.



Fonte: O autor (2019)

Figura 68 - Resistência à tração, antes e após envelhecimento, para amostras selecionadas e PBAT puro.



Fonte: O autor (2019)

Apesar da formulação com negro de fumo e HALS apresentar valores de alongamento e resistência à tração mais condizentes com aqueles recomendados pela norma EN 13655 (2002), não descarta-se o potencial da formulação com negro de fumo e vitamina E para aplicação como *mulch*.

Futuras avaliações em campo são importantes, para avaliar a real durabilidade e eficiência de cada formulação para diferentes culturas. Estudo conduzido por Touchaleaume et al. (2016) ilustra bem a importância de testes em campo para filmes *mulch* biodegradáveis. Os autores verificaram, em cultura de videira, o aumento significativo da produtividade após 2 anos, mesmo o filme *mulch* tendo iniciado sua ruptura com apenas 5 meses. O resultado foi atribuído ao fato do filme ter protegido a planta em estágios iniciais do desenvolvimento do sistema radicular, questão essencial para o desenvolvimento da videira.

5.2.4. Análise de transmissão de luz

Os resultados de transmissão de luz estão apresentados na Tabela 34. As curvas de transmissão de luz de todas as amostras estão apresentadas no Apêndice G.

Os valores de transmissão de luz mais altos foram obtidos para as amostras de PBAT puro, coerente pela ausência negro de fumo. Observou-se, também para essa amostra, o aumento da transmissão de luz de 39,8% para 47,8%, que pode estar associado à presença de defeitos na estrutura do material como microfissuras ou microfuros. Estes defeitos podem ocorrer na matriz polimérica após a ação da radiação ultravioleta e hidrólise (SIKORSKA et al., 2017; FALCÃO et al., 2019).

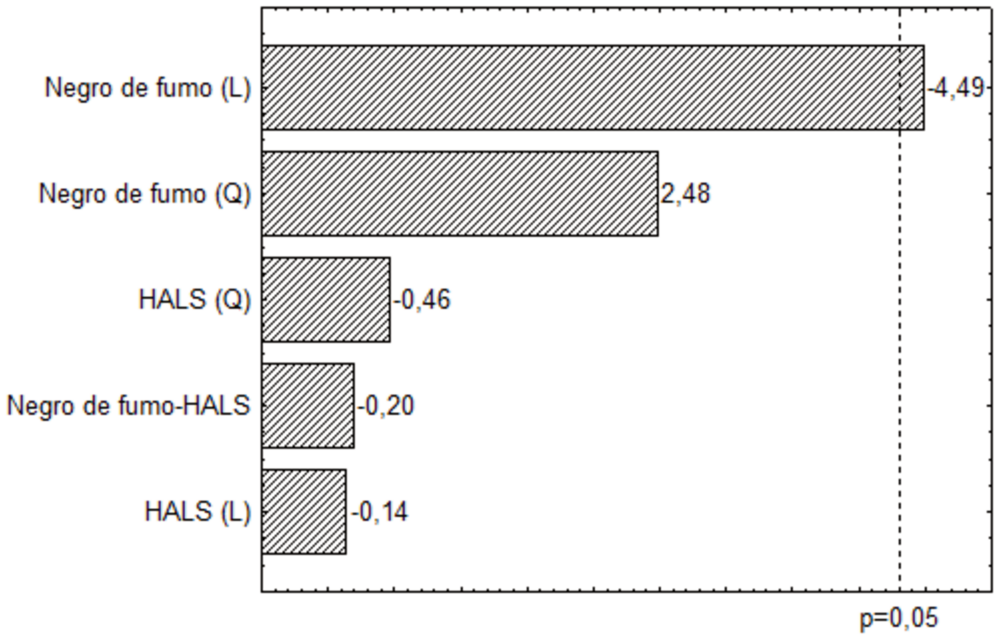
Tabela 34 - Resultados de transmissão de luz para filmes de PBAT puro e com aditivos

Amostras		Transmissão de luz (%)
PBAT NAT		38,9 ± 6,2
PBATUVA		47,8 ± 2,5
Filmes de PBAT com negro de fumo e HALS	**NF0.1T1.0NAT**	30,9±2,0
	NF0.1T1.0UVA	29,3±1,6
	NF0.5T0.5NAT	14,2±2,2
	NF0.5T0.5UVA	9,8±0,3
	NF0.5T1.5NAT	16,6±1,3
	NF0.5T1.5UVA	2,7±0,1
	NF1.0T0.1NAT	3,9±0,7
	NF1.0T0.1UVA	2,5±0,6
	NF1.0T1.0(1)NAT	10,3±0,3
	NF1.0T1.0(1)UVA	7,0±0,9
	NF1.0T1.0(2)NAT	0,9±0,1
	NF1.0T1.0(2)UVA	1,2±0,2
	NF1.0T1.0(3)NAT	0,3±0,0
	NF1.0T1.0(3)UVA	1,2±0,1
	NF1.0T2.0NAT	0,5±0,3
	NF1.0T2.0UVA	0,3±0,0
	NF1.5T0.5NAT	0,6±0,0
	NF1.5T0.5UVA	3,8±0,2
	NF1.5T1.5NAT	0,8±0,2
	NF1.5T1.5UVA	0,8±0,2
	NF2.0T1.0NAT	1,3±0,2
	NF2.0T1.0UVA	0,3±0,2
Filmes de PBAT com negro de fumo e Vitamina E	**NF0.1V1.0NAT**	28,2±1,9
	NF0.1V1.0UVA	19,6±0,5
	NF0.5V0.5NAT	8,6±0,1
	NF0.5V0.5UVA	14,6±0,0
	NF0.5V1.5NAT	1,8±0,2
	NF0.5V1.5UVA	0,1±0,0
	NF1.0V0.1NAT	1,1±0,2
	NF1.0V0.1UVA	3,7±0,1
	NF1.0V1.0(1)NAT	1,2±0,4
	NF1.0V1.0(1)UVA	0,6±0,1
	NF1.0V1.0(2)NAT	6,2±0,1
	NF1.0V1.0(2)UVA	0,4±0,0
	NF1.0V1.0(3)NAT	5,5±0,6
	NF1.0V1.0(3)UVA	3,6±0,7
	NF1.0V2.0NAT	0,1±0,0
	NF1.0V2.0UVA	0,7±0,1
	NF1.5V0.5NAT	0,1±0,0
	NF1.5V0.5UVA	0,9±0,1
	NF1.5V1.5NAT	0,1±0,0
	NF1.5V1.5UVA	0,1±0,0
	NF2.0V1.0NAT	0,5±0,2
	NF2.0V1.0UVA	0,1±0,0

Fonte: O autor (2019)

Para as amostras naturais de PBAT com os aditivos negro de fumo e HALS, o efeito do negro de fumo (linear) foi estatisticamente significativo. O efeito foi negativo, ou seja, o aumento das concentrações desse fator favoreceu a diminuição dos resultados de transmissão de luz. O gráfico de Pareto e a estimativa de efeitos encontram-se apresentados na Figura 69 e Tabela 35, respectivamente.

Figura 69 - Gráfico de Pareto da transmissão de luz de amostras naturais de PBAT com os aditivos negro de fumo e HALS.



Fonte: O autor (2019)

Tabela 35 - Estimativa dos efeitos e valores de p (ANOVA) para transmissão de luz de amostras naturais de PBAT com os aditivos negro de fumo e HALS.

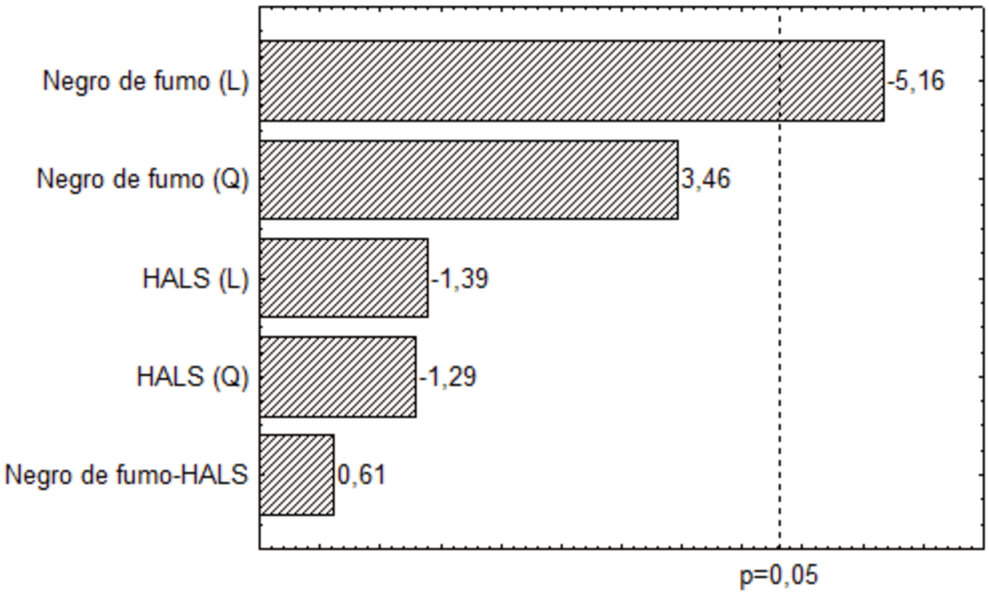
Fatores	**Efeito**	**Erro**	**p**
Negro de fumo (L)	-17,82	3,97	0,04*
Negro de fumo (Q)	11,72	4,72	0,13
HALS (L)	-0,55	3,97	0,90
HALS (Q)	-2,18	4,72	0,69
Negro de fumo-HALS	-1,10	5,61	0,86

*estatisticamente significativo (ANOVA – p<0,05); Fonte: O autor (2019)

Após o envelhecimento acelerado a concentração de negro de fumo se manteve como único fator estatisticamente significativo com efeito negativo, conforme o gráfico de Pareto (Figura 70) e estimativa de efeitos (Tabela 36). Os resultados são coerentes, uma vez que além de absorvedor de radiação ultravioleta, o negro de fumo possui a função bloquear

a transmissão de luz no comprimento de onda de radiação fotossinteticamente ativa (400-700 nm) em filmes *mulch* (LAMONT, 2004).

Figura 70 - Gráfico de Pareto da transmissão de luz de amostras envelhecidas de PBAT com os aditivos negro de fumo e HALS.



Fonte: O autor (2019)

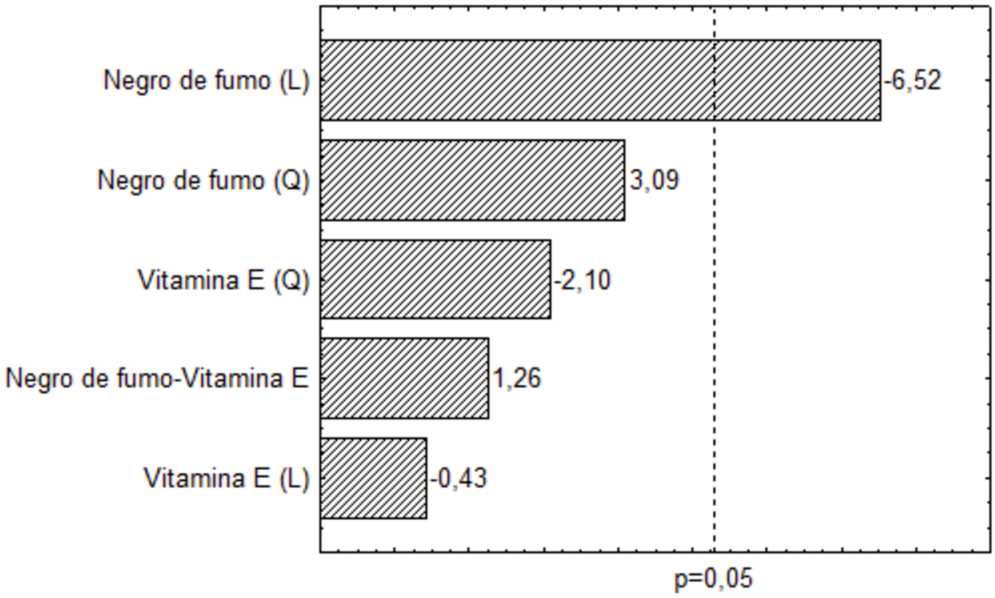
Tabela 36 - Estimativa dos efeitos e valores de p (ANOVA) para transmissão de luz de amostras envelhecidas de PBAT com aditivos negro de fumo e HALS.

Fatores	**Efeito**	**Erro**	**p**
Negro de fumo (L)	-12,23	2,37	0,04*
Negro de fumo (Q)	9,75	2,82	0,07
HALS (L)	-3,65	2,82	0,33
HALS (Q)	-3,30	2,37	0,30
Negro de fumo-HALS	2,05	3,35	0,60

*estatisticamente significativo (ANOVA – $p<0,05$); Fonte: O autor (2019)

Para as amostras naturais de PBAT com negro de fumo e Vitamina E, constatou-se influência estatisticamente significativa apenas para o fator negro de fumo, conforme gráfico de Pareto (Figura 71) e estimativa de efeitos (Tabela 37).

Figura 71 - Gráfico de Pareto da transmissão de luz de amostras naturais de PBAT com os aditivos negro de fumo e Vitamina E.



Fonte: O autor (2019)

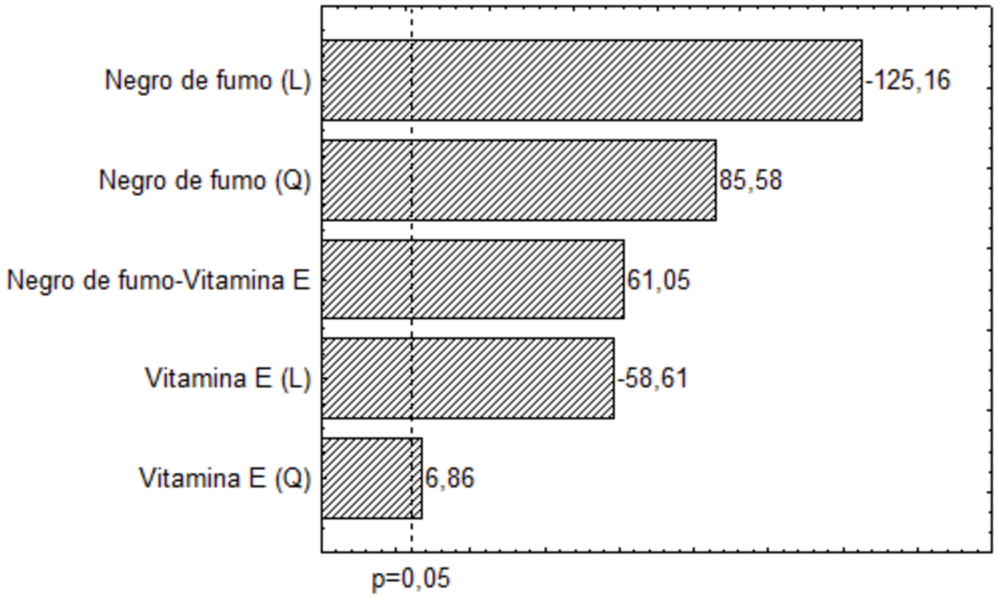
Tabela 37 - Estimativa dos efeitos e valores de p (ANOVA) para transmissão de luz de amostras naturais de PBAT com os aditivos negro de fumo e Vitamina E.

Fatores	Efeito	Erro	p
Negro de fumo (L)	-12,48	1,91	0,02*
Negro de fumo (Q)	-7,05	2,28	0,09
Vitamina E (L)	-0,82	1,91	0,71
Vitamina E (Q)	-4,75	2,28	0,17
Negro de fumo-Vitamina E	3,40	2,71	0,34

*estatisticamente significativo (ANOVA – p<0,05); Fonte: O autor (2019)

O único fator significativo no planejamento com amostras naturais de PBAT com negro de fumo e Vitamina E foi o absorvedor, mas após o envelhecimento, conforme indicado no gráfico de Pareto (Figura 72) e estimativa de efeitos (Tabela 38), todos os fatores foram estatisticamente significativos.

Figura 72 - Gráfico de Pareto da transmissão de luz amostras envelhecidas de PBAT com os aditivos negro de fumo e Vitamina E.



Fonte: O autor (2019)

Tabela 38 - Estimativa dos efeitos e valores de p (ANOVA) para transmissão de luz de amostras envelhecidas de PBAT com os aditivos negro de fumo e Vitamina E.

Fatores	Efeito	Erro	p
Negro de fumo (L)	-11,14	0,04	0,00*
Negro de fumo (Q)	9,17	0,05	0,00*
Vitamina E (L)	-2,63	0,04	0,00*
Vitamina E (Q)	-0,28	0,05	0,03*
Negro de fumo-Vitamina E	5,20	0,06	0,00*

*estatisticamente significativo (ANOVA – p<0,05); Fonte: O autor (2019)

Ressalta-se que o negro de fumo (linear) foi o efeito principal para esta propriedade, como mostra o gráfico de Pareto (Figura 72), o que é esperado devido à sua função absorvedora que bloqueia a radiação no comprimento de onda da RFA. O fato dos outros fatores também terem sido significativos pode estar associado às eventuais variações no tamanho dos cristalitos do polímero nas diferentes amostras, o que também pode afetar os valores de transmissão de luz (ROBERTSON, 1993).

Considerando o critério estabelecido por Kijchavengkul et al. (2011) menor que 20%, apenas as formulações com a menor concentração de negro de fumo (0,1% em massa), em ambos os planejamentos experimentais, superaram este valor. As amostras que atenderam à transmissão de luz inferior a 1%, sugerida pela norma EN 13655 (2002), antes e após o envelhecimento, foram as seguintes: NF1.0T2.0, NF1.5T1.5, NF1.0V2.0, NF1.5V0.5, NF1.5V1.5 e NF2.0V1.0.

5.2.5. Seleção de amostras

Para o planejamento com os aditivos negro de fumo e HALS, a única amostra envelhecida que não apresentou redução estatisticamente significativa de alongamento em relação à amostra natural foi a formulação NF1.5T1.5UVA. Esta formulação atendeu o padrão da norma EN 13655 (2002) para alongamento. O resultado obtido para resistência à tração foi próximo, porém inferior ao estabelecido por essa mesma norma. Ainda assim, o resultado foi superior ao valor preconizado no estudo de Kijchavengkul et al. (2008a, 2011).

Já para o planejamento com negro de fumo e vitamina E todas as formulações envelhecidas apresentaram redução significativa do alongamento. A amostra NF1.5V1.5UVA, embora não tenha atendido o padrão da norma EN 13655 (2002), apresentou o maior valor médio para esta propriedade após o envelhecimento. O valor obtido de resistência à tração para esta amostra foi próximo e superior àquele preconizado por Kijchavengkul et al. (2008a, 2011).

Ambas as formulações consideradas apresentaram valores de transmissão de luz inferiores a 1%, o que atende satisfatoriamente o critério proposto pela norma EN 13655 (2002).

Para este trabalho, considerando o exposto, as formulações NF1.5T1.5UVA e NF1.5V1.5UVA foram escolhidas para seguir para a segunda etapa da pesquisa, que consistiu na avaliação da desintegração e biodegradação em solo, bem como seus efeitos ecotoxicológicos, em comparação com o polímero puro.

5.3. Análise de biodegradação em solo

Os resultados da análise elementar das formulações envelhecidas de PBAT, que foram utilizadas no ensaio de mineralização, estão apresentados na Tabela 39.

Tabela 39 - Resultados de análise elementar.

Amostra	Teor de Carbono (%)
Celulose	42 ± 0
PBATUVA	60 ± 0
NF1.5T1.5UVA	60 ± 0
NF1.5V1.5UVA	60 ± 1

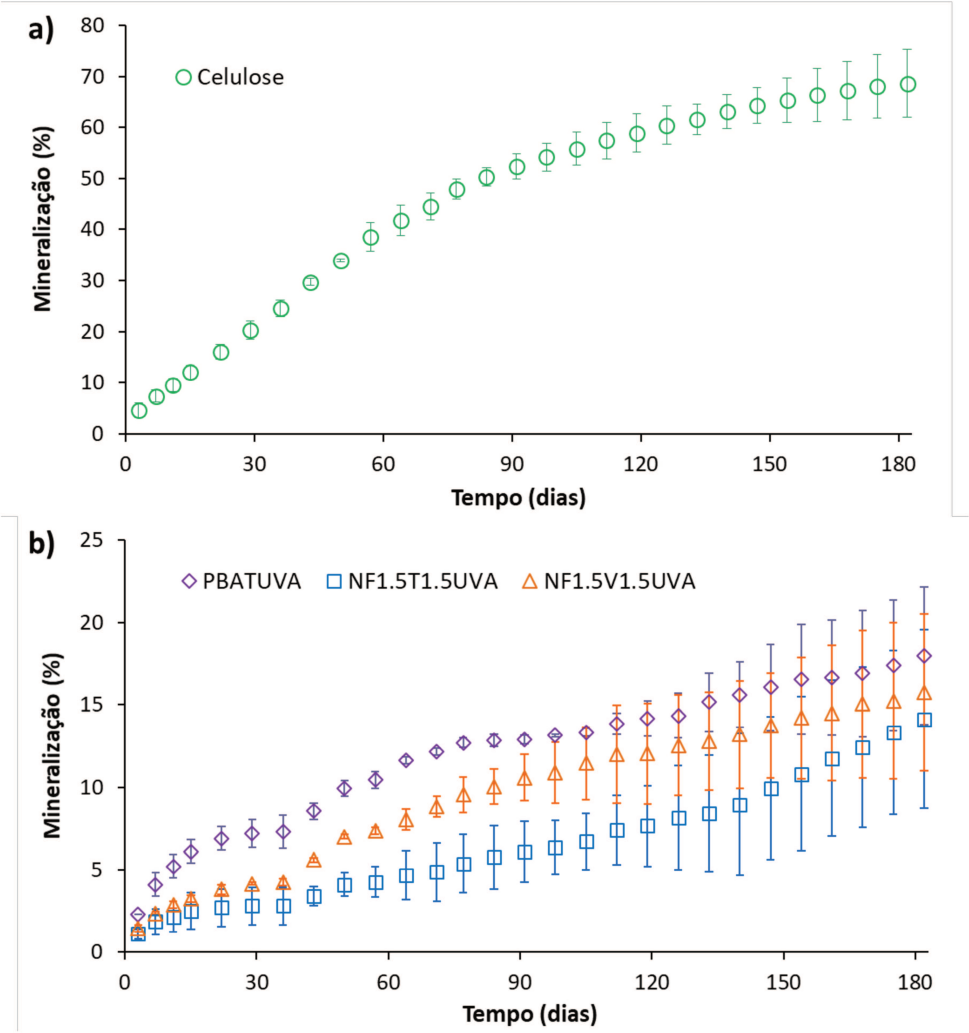
Fonte: O autor (2019)

Na Figuras 73a e 73b apresentam-se as curvas de mineralização para a celulose e as formulações de PBAT, respectivamente. Os valores das médias e desvios da porcentagem

de mineralização estão apresentados no Apêndice H. A celulose apresentou a maior taxa de mineralização, o que é coerente com sua utilização como amostra de referência para indicar condições adequadas do ensaio, atingindo ao final do ensaio o resultado de 69 ± 7%.

Entre os filmes avaliados, a amostra PBATUVA apresentou a maior taxa de biodegradação que atingiu, ao final do ensaio, o grau de mineralização de 18%, seguida das amostras NF1.5V1.5UVA e NF1.5T1.5UVA, cujos valores finais foram 16% e 14%, respectivamente. Estes valores estão dentro da faixa obtida por outros autores. Em estudos conduzidos por Saadi, Cesar e Bewa (2013) e Palsikowski et al. (2018a) os valores de mineralização encontrados para o PBAT em solo foram 11% e 21%, respectivamente.

Figura 73 - Curvas de mineralização: a) da celulose; b) amostras envelhecidas de PBAT puro e com aditivos.



Fonte: O autor (2019)

Conforme apresentado previamente (Tabelas 6 e 7), os valores de $\overline{Mw}$ das amostras PBATUVA, NF1.5V1.5UVA e NF1.5T1.5UVA foram 31.000 g/mol, 122.000 g/mol e 62.000 g/mol, e os valores de teor de gel foram 13%, 30% e 45%, respectivamente. Considerando a condição inicial das amostras, observa-se uma tendência de que quanto menor o teor de gel e menor a massa molar, maior foi taxa de biodegradação.

Menores massas molares podem favorecer a flexibilidade dos materiais, assim facilitando a difusão de moléculas de água e o processo de degradação hidrolítica (KALE et al., 2007). A formação de gel decorrente da reticulação do material, por sua vez, pode limitar a acessibilidade dos microrganismos às cadeias poliméricas que seriam mineralizadas (KIJCHAVENGKUL et al., 2008b). Dessa forma os resultados obtidos pelo ensaio de biodegradação em solo corroboram as informações reportadas na literatura.

Embora as diferenças nas taxas de biodegradação tenham coerência com a condição das amostras no início do teste, observa-se que após 105 dias as diferenças se tornam mais sutis e, inclusive, ocorre a sobreposição das barras de desvio padrão apresentadas no gráfico da Figura 73b.

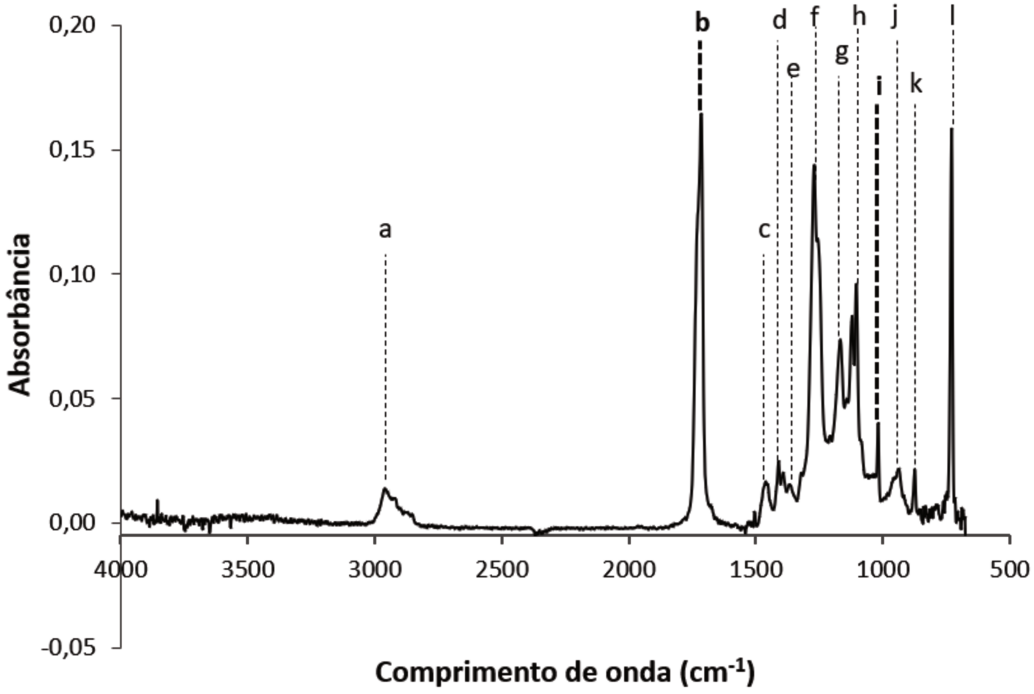
Uma hipótese para este comportamento é que nas amostras com menor massa molar as unidades alifáticas BA podem ter sofrido migração mais rápida por serem mais solúveis e suscetíveis à degradação hidrolítica, favorecendo o maior aumento da fração de unidades aromáticas BT. O aumento da fração de unidades aromáticas na estrutura do material pode levar a uma maior rigidez e, consequentemente, reduzir a taxa de degradação hidrolítica e mineralização (KIJCHAVENGKUL et al., 2010a; SIKORSKA et al. 2017).

5.4. Análise de desintegração em solo

5.4.1. Caracterização estrutural e análise do índice de carbonila (IC) Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)

As bandas características do PBAT estão apresentadas na Figura 74. Os espectros obtidos para todas as amostras encontram-se apresentados no Apêndice I. A descrição das bandas e as faixas de posição em que foram identificadas nas amostras deste estudo estão indicadas na Tabela 40.

Figura 74 - Identificação das principais bandas em espectro do PBAT puro natural. Em destaque bandas utilizadas para o cálculo de índice de carbonila: b - estiramento do C=O em ligação éster (AL-ITRY; LAMNAWAR; MAAZOUZA, 2012); i - deformação angular dentro do plano do =C-H no anel de benzeno (CAI; JUNGANG; FENG., 2013).



Fonte: O autor (2019)

Tabela 40 - Relação entre a faixa de banda no espectro de FTIR com a ligação química associada.

Faixa da banda no espectro de FTIR (cm^{-1})	**Atribuição** (CAI; JUNGANG; FENG, 2013)
a) 2953 – 2960	Estiramento assimétrico de CH_2
b) 1713 – 1716	Estiramento do C=O em ligação éster (AL-ITRY; LAMNAWAR; MAAZOUZA, 2012)
c) 1452 – 1466	Deformação angular dentro do plano de CH_2
d) 1410	Deformação angular de O-CH_2
e) 1363 – 1371	Deformação angular fora do plano de CH_2
f) 1269 – 1273	Estiramento de C-O em ligação éster
g) 1165 – 1169	Estiramento de C-O em ligação éster
h) 1103 – 1105	Estiramento de C-O em ligação éster
i) 1018	Deformação angular dentro do plano de =C-H no anel aromático
j) 933 – 937	Deformação angular fora do plano de C-OH
k) 874	Deformação angular fora do plano de =C-H no anel aromático
l) 727-729	Quatro ou mais grupos metila (-CH_2-) adjacentes na cadeia

Fonte: O autor (2019)

Os valores utilizados para o cálculo do índice de carbonila e os respectivos resultados estão apresentados na Tabela 41.

Tabela 41 - Índice de carbonila (IC) para as amostras de PBAT com e sem aditivos.

Amostras	PBAT			NF1.5T1.5			NF1.5V1.5		
	A (C=O)	A (=C-H)	IC	A (C=O)	A (=C-H)	IC	A (C=O)	A (=C-H)	IC
NAT	0,164[b]	0,040[c]	4,1	0,146[c]	0,039[d]	3,7	0,161[a]	0,046[d]	3,5
UVA	0,154[a]	0,043[c]	3,6	0,150[a]	0,041[d]	3,7	0,174[a]	0,046[d]	3,8
UVA_Solo15d	0,116[a]	0,075[c]	1,6	0,142[b]	0,050[d]	2,8	0,174[b]	0,054[d]	3,2
UVA_Solo4m	0,082[a]	0,068[c]	1,2	0,088[a]	0,062[d]	1,4	0,127[a]	0,064[d]	2,0
UVA_Solo8m	NM	NM	NM	0,076[a]	0,054[d]	1,4	0,081[b]	0,070[d]	1,2
UVA_Solo12m	NM	NM	NM	0,081[b]	0,070[d]	1,2	NM	NM	NM

A: absorbância; NAT: amostras naturais; UVA: amostras envelhecidas; UVA_solo15d: amostras envelhecidas e degradadas em solo por 15 dias; UVA_solo4m: amostras envelhecidas e degradadas em solo por 4 meses; UVA_solo8m: amostras envelhecidas e degradadas em solo por 8 meses; UVA_solo12m: amostras envelhecidas e degradadas em solo por 12 meses; a: 1713 cm^{-1}; b: 1714 cm^{-1}; c: 1716 cm^{-1}; d: 1018 cm^{-1}. NM: não monitorado (amostra não recuperada). Fonte: O autor (2019)

Considerando que o IC indica a absorbância de carbonila relativa à banda de referência da região aromática, sua redução sugere a formação de espécies de baixa massa molar seguida pela sua migração, a qual tende a ocorrer de forma mais rápida para a região alifática do material (KIJCHAVENGKUL et al., 2010a). A redução também pode estar associada a assimilação de moléculas por microrganismos (SADI; FECHINE; DEMARQUETE, 2013) ou ainda pelo aumento da fração aromática durante o processo de desintegração.

Na comparação entre amostras envelhecidas e naturais, a única formulação que apresentou redução do índice de carbonila foi o PBAT puro, coerente com a maior cisão de cadeia sofrida por essa amostra durante o envelhecimento. Após a degradação em solo por 15 dias e 4 meses, todas as amostras apresentaram duas reduções sucessivas no índice de carbonila. No monitoramento conduzido após 8 meses, a amostra PBAT com negro de fumo e HALS não apresentou redução do IC em relação ao período anterior. Para o PBAT puro este parâmetro não foi monitorado após 8 meses, pois não foi possível recuperação do material, pelo seu alto nível de desintegração. Já a amostra com negro de fumo e vitamina E apresentou nova redução do IC em relação ao período de monitoramento de 4 meses.

No último monitoramento (12 meses), apenas foi possível recuperar a formulação com negro de fumo e HALS. O índice de carbonila para esta amostra apresentou redução em relação ao período anterior.

Considerando a evolução dos resultados de IC ao longo dos períodos de monitoramento, constata-se que o material com degradação mais rápida foi o PBATUVA, seguido da amostra NF1.5V1.5UVA e NF1.5T1.5UVA, respectivamente, sendo coerente com os resultados de mineralização.

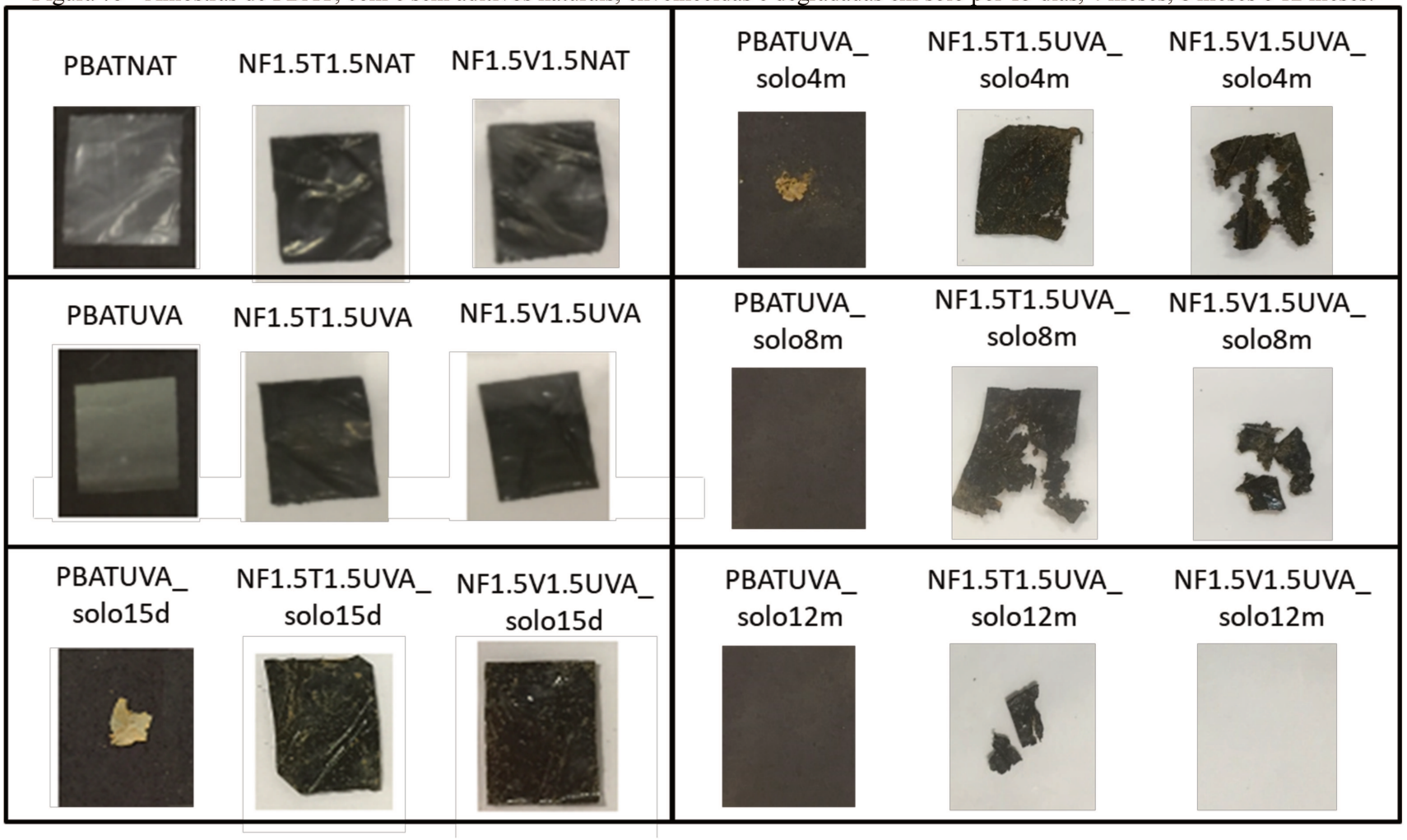
5.4.2. Análise visual

A Figura 75 mostra os registros fotográficos das amostras naturais, envelhecidas e degradadas em solo. Ao comparar o aspecto visual das amostras envelhecidas com as amostras naturais, houve mudança visualmente perceptível apenas para o PBAT puro, que apresentou amarelecimento. Este é um efeito comum da fotodegradação em materiais poliméricos (SANCHEZ et al., 2003; PING et al., 2016).

Após 15 dias de degradação do solo, a amostra de PBAT puro foi a única que apresentou desintegração visualmente perceptível, o que pode ser atribuído à maior fragilidade dessa amostra após envelhecimento em relação aos filmes aditivados, constatada pelas análises de massa molar e propriedades mecânicas. A seguir, após 4 meses, a amostra de PBAT continuou apresentando desintegração mais rápida entre os materiais avaliados, sendo que após 8 meses sequer foi possível recuperação dessa amostra para realização da análise. Com relação aos filmes com aditivos foram observados nestes monitoramentos uma maior desintegração para a amostra com vitamina E, coerente com as avaliações de índice de carbonila e mineralização.

No último monitoramento, após 12 meses, foi possível observar um estágio mais avançado de desintegração para a amostra com negro de fumo e HALS. Para o filme com negro de fumo e vitamina E, por sua vez, não foi possível a recuperação de amostra neste monitoramento devido à total desintegração do material.

Figura 75 - Amostras de PBAT, com e sem aditivos naturais, envelhecidas e degradadas em solo por 15 dias, 4 meses, 8 meses e 12 meses.

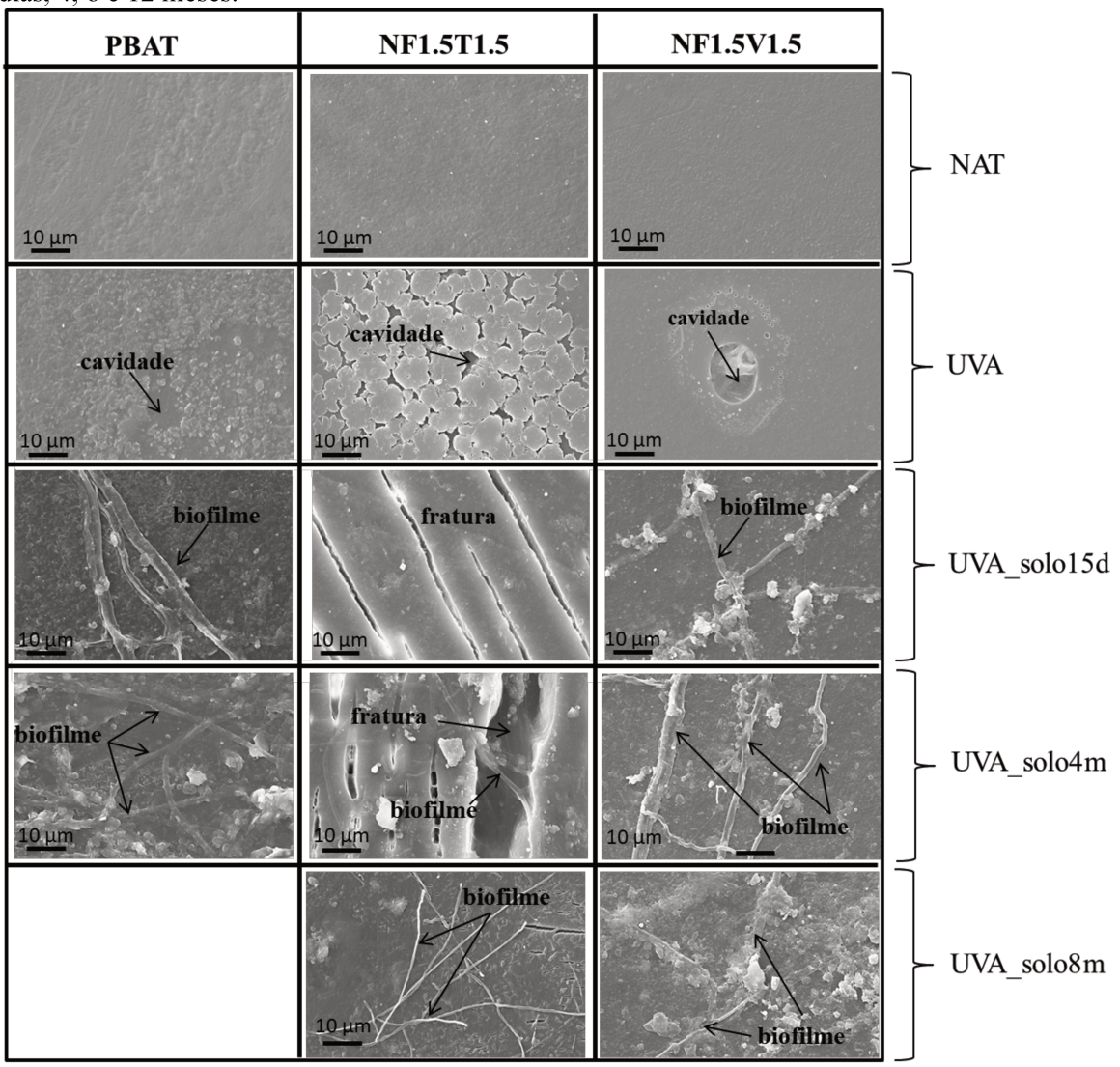


Fonte: O autor (2019)

5.4.3. Análise de morfologia por Microscopia Eletrônica de Varredura (SEM)

As micrografias das amostras de PBAT (com e sem aditivos) naturais, envelhecidas e degradadas em solo por 15 dias, 4 meses, 8 meses e 12 meses estão apresentadas na Figura 76.

Figura 76 - Micrografias de SEM das amostras naturais, envelhecidas e degradadas em solo por 15 dias, 4, 8 e 12 meses.

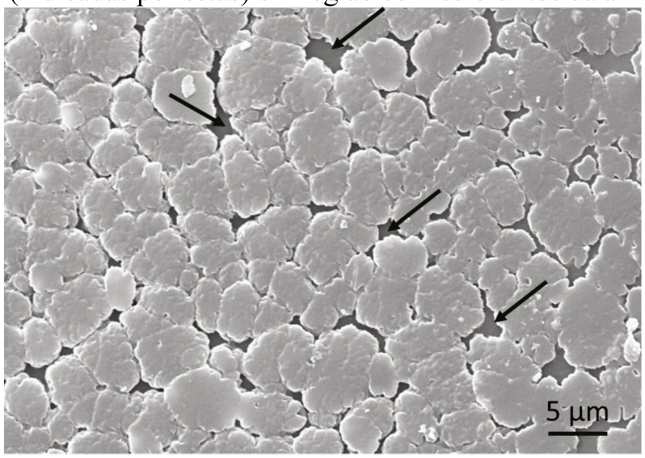


Fonte: O autor (2019)

De forma coerente à análise visual, a superfície do PBAT puro após o envelhecimento indicou um nível mais acentuado de degradação, constatado pela superfície mais rugosa e a presença de cavidades maiores em relação às outras amostras. No caso da amostra NF1.5T1.5UVA foi possível observar pela micrografia (ampliação na Figura 77) regiões com presença de esferulitos com cavidades em seu entorno, indicando a degradação

preferencial na interface dos esferulitos, onde há a predominância da fase amorfa, que podem ter ocorrido por efeito de hidrólise durante o ensaio de envelhecimento acelerado.

Figura 77 - Cavidades (indicadas por setas) em região com esferulitos da amostra NF1.5T1.5UVA.



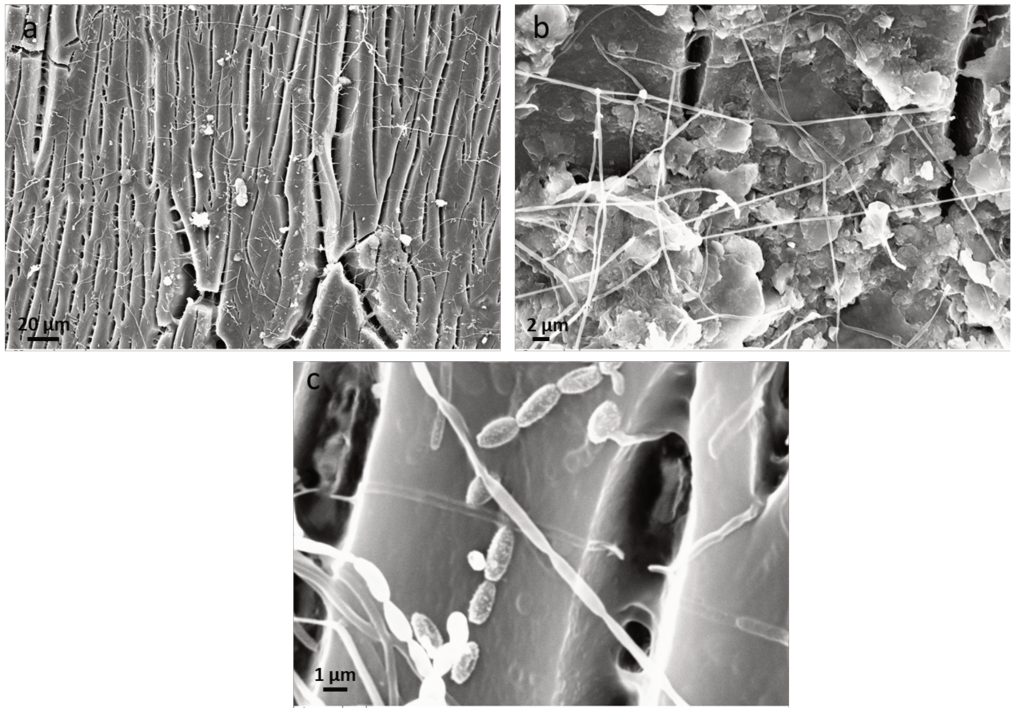
Fonte: O autor (2019)

Com relação às amostras degradadas em solo por 15 dias, o PBAT puro e a formulação com aditivos negro de fumo e vitamina E apresentaram estruturas filamentosas, também observadas em outros estudos (KIJCHAVENGKUL et al., 2008b; WANG et al., 2015), associadas à presença de biofilme.

Vale ressaltar que essas estruturas foram identificadas no presente estudo apenas nas amostras com menores teores de gel (até 30%), o que também foi observado em trabalho conduzido por Kijchavengkul et al. (2008b), no qual os autores indicaram que uma quantidade maior de gel poderia limitar a ação dos microrganismos. Nos monitoramentos seguintes, também foi possível observar a presença de biofilme para as amostras de PBAT puro e com os aditivos negro de fumo e vitamina E.

Apesar da estrutura de biofilme não ter sido identificada para a amostra com negro de fumo e HALS após 15 dias em solo, esta foi identificada nos monitoramentos de 4 e 8 meses, indicando um grau mais avançado de degradação, que pode ser atribuído à degradação hidrolítica ao longo do período de contato com o solo. Para essa amostra, após 12 meses (Figura 78), foram observadas fraturas e presença de biofilmes distribuídos por toda a amostra. Em algumas regiões também foi possível identificar bactérias isoladas (Figura 78c).

Figura 78 - Micrografias da amostra NF1.5T1.5UVA_solo12m: a) 1000 x; b) 5000 x; c) 15000 x.



Fonte: O autor (2019)

Observou-se, ainda, que neste período (12 meses), os microrganismos encontravam-se mais amplamente distribuídos pela superfície da amostra NF1.5T1.5UVA do que nos monitoramentos anteriores, possivelmente devido ao estágio mais avançado da desintegração da amostra, que favorece a formação de produtos de degradação passíveis de serem metabolizados.

5.4.4. Análise de massa molar por Cromatografia de Permeação em Gel (GPC)

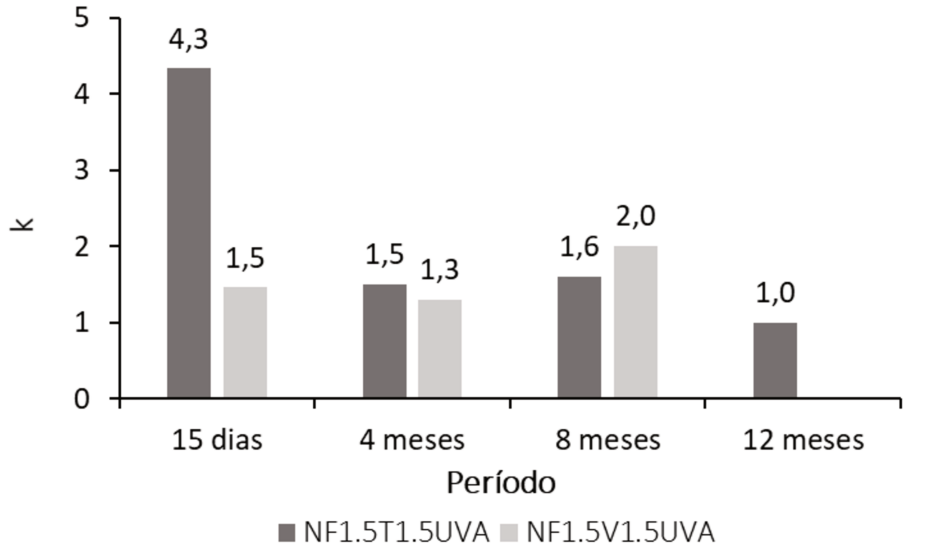
A Tabela 42 apresenta os resultados de massa molar numérica média ($\overline{\mathrm{M}}n$), massa molar ponderal média ($\overline{\mathrm{M}}w$) e índice de polidispersidade (PDI), avaliadas durante o ensaio de desintegração. As curvas de distribuição de massa molar encontram-se apresentadas no Apêndice E. Para o PBAT puro essa análise não foi conduzida devido à pouca quantidade recuperada de corpo de prova provocada pelo seu alto grau de desintegração. Para ambas as amostras de PBAT com aditivos, observou-se uma redução contínua dos valores de $\overline{\mathrm{M}}n$ e $\overline{\mathrm{M}}w$. A Figura 79 mostra os resultados do fator de degradação (k).

Tabela 42 - Resultados da análise de GPC para as formulações de PBAT com aditivos.

Amostra	$\bar{M}n$ (g/mol)	$\bar{M}w$ (g/mol)	PDI
NF1.5T1.5UVA	52.000	122.000	2,35
NF1.5T1.5UVA_solo15d	12.000	55.000	4,58
NF1.5T1.5UVA_solo4m	8.000	49.000	6,13
NF1.5T1.5UVA_solo8m	5.000	44.000	8,80
NF1.5T1.5_solo12m	5.000	34.000	6,80
NF1.5V1.5UVA	19.000	62.000	3,26
NF1.5V1.5UVA_solo15d	13.000	43.000	3,31
NF1.5V1.5UVA_solo4m	10.000	30.000	3,00
NF1.5V1.5UVA_solo8m	5.000	29.000	5,80

Fonte: O autor (2019)

Figura 79 - Fator de degradação (k) para amostras de PBAT com aditivos.



Fonte: O autor (2019)

Após o período de 15 dias de degradação em solo observou-se valor superior de k para a amostra com negro de fumo e HALS. Nos monitoramentos de 4 e 8 meses, os resultados deste parâmetro mantiveram-se mais próximos. No monitoramento após 12 meses apenas a formulação NF1.5T1.5UVA foi avaliada, pois não houve recuperação da amostra com negro de fumo e vitamina E.

Essa maior diferença entre os valores de k no início do monitoramento pode estar associada ao fato da amostra NF1.5V1.5UVA já se encontrar em um nível mais avançado de degradação após o envelhecimento. Com isso é possível que essa amostra, ao longo da degradação em solo, tenha sofrido maior redução da fração de unidades alifáticas e, consequentemente, menor flexibilidade. Esta característica pode ter levado ao fator de

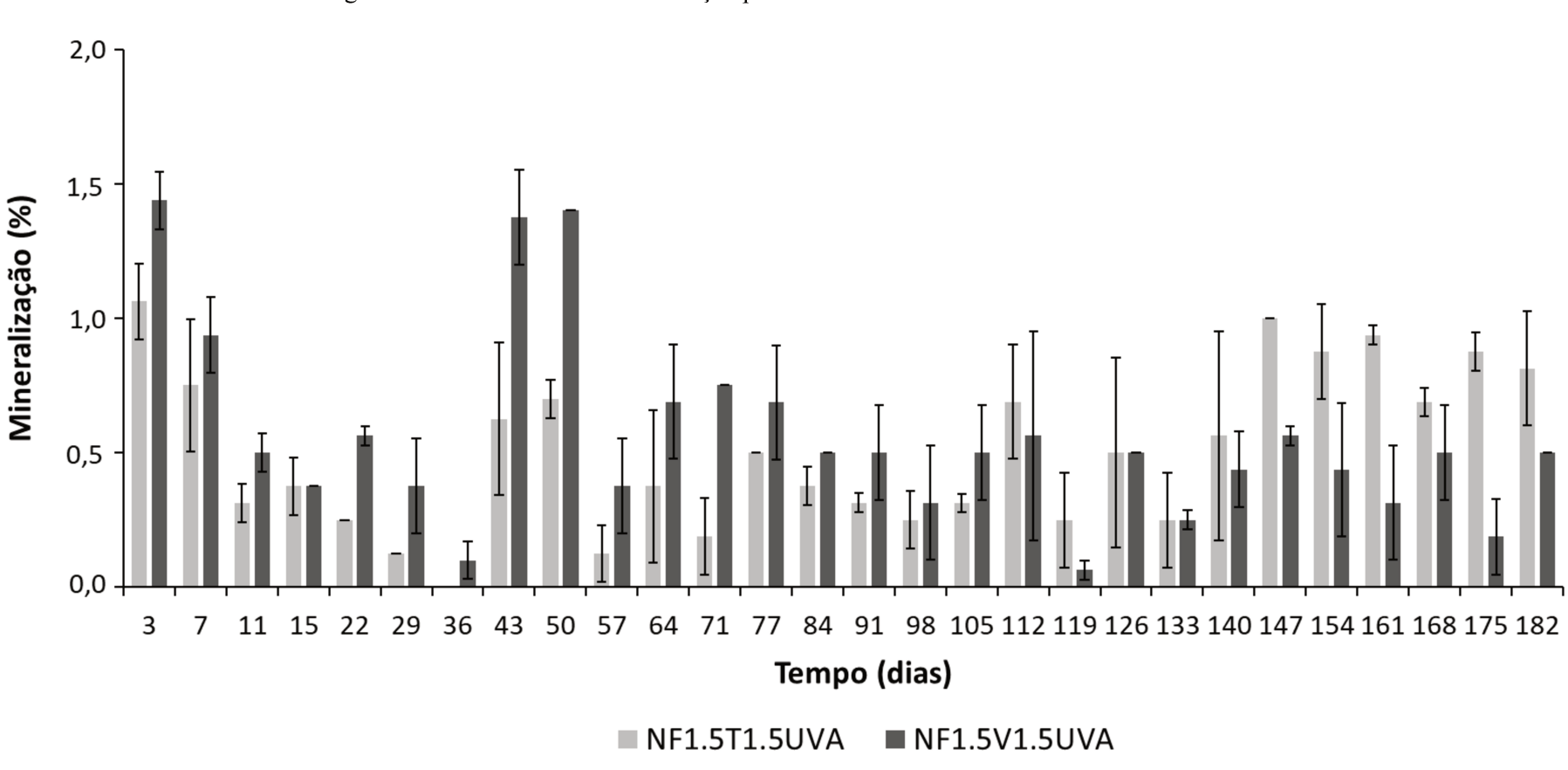
degradação inferior em relação à amostra NF1.5T1.5UVA, uma vez que a flexibilidade reduzida pode limitar a difusão de água na matriz polimérica (KALE et al., 2007).

Uma vez que a formação de espécies de baixa massa molar é uma etapa fundamental para a mineralização dos polímeros, foi feita uma análise sobre os resultados do ensaio de biodegradação para as amostras NF1.5T1.5UVA e NF1.5V1.5UVA. A Figura 80 apresenta os resultados de mineralização para cada período de monitoramento. Pela imagem observa-se que em todos os monitoramentos realizados até 105 dias, houve predominância de valores superiores para a amostra com negro de fumo e vitamina E. A partir da medida realizada após 112 dias de ensaio este comportamento se inverte, sendo que a amostra com negro de fumo e HALS passa a apresentar os resultados superiores.

Nos primeiros 105 dias é possível que a menor massa molar da amostra NF1.5V1.5UVA seja o principal fator que justifique os maiores resultados de porcentagem de mineralização para esta amostra. Já no período seguinte, a reduzida degradação, devido ao aumento de unidades aromáticas, pode estar sendo o principal fator que possibilitou a observação de valores superiores deste parâmetro para a amostra NF1.5T1.5UVA.

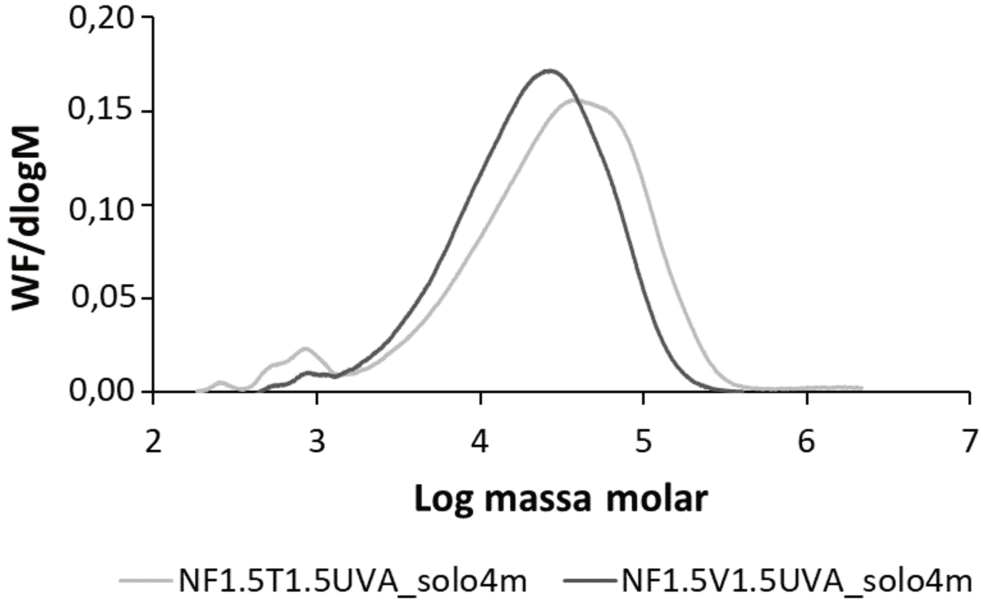
As curvas de GPC para essas amostras após 4 meses de degradação em solo (Figura 81) suportam essa hipótese, pois é possível notar que na região de menor massa molar, entre 100 e 1.000 g/mol, há mais espécies formadas para a amostra NF1.5T1.5UVA.

Figura 80 - Resultados de mineralização para amostras de NF1.5T1.5UVA e NF1.5V1.5UVA.



Fonte: O autor (2019)

Figura 81 - Distribuição de massa molar para amostras de PBAT com aditivos envelhecidas, após 4 meses de degradação em solo.



Fonte: O autor (2019)

5.4.5. Análise de transições térmicas e grau de cristalinidade por Calorimetria Diferencial Exploratória (DSC)

As curvas de DSC para todas as amostras estão apresentadas no Apêndice J. As Figuras 82 e 83 mostram a curva de DSC da amostra PBATNAT no primeiro aquecimento e resfriamento, respectivamente. A Figura 84 apresenta as regiões da temperatura de transição vítrea e fusão no segundo aquecimento, para esta mesma amostra. Assim como o polímero puro, todas as amostras apresentaram amplas faixas de fusão para todos os períodos monitorados. Esta característica sugere a variedade no tamanho e morfologia dos cristais do PBAT (KUWABARA et al., 2002; GAN et al., 2004).

A Tabela 43 mostra os resultados de DSC nos diferentes ciclos de aquecimento/resfriamento. Para as amostras que apresentaram picos duplos ou triplos de fusão, foi reportado na referida tabela apenas o valor de Tm mais alto, referente à fusão de cristais mais perfeitos (GAN et al., 2004).

Figura 82 - Curva de DSC: primeiro aquecimento da amostra PBATNAT.

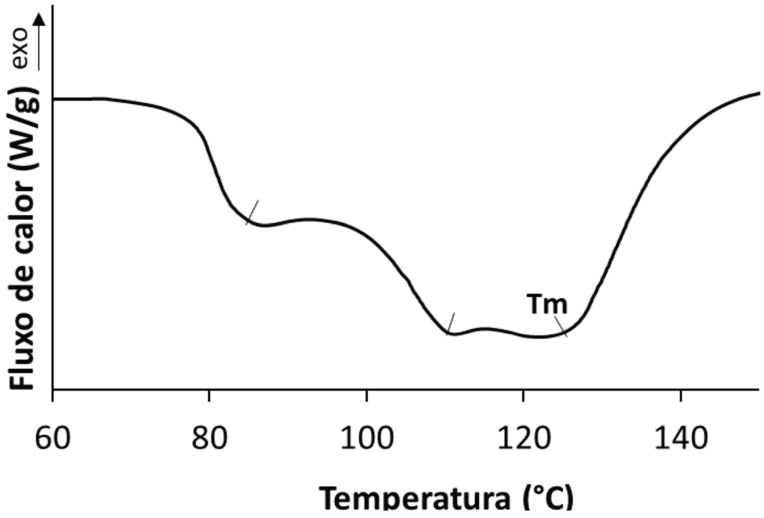
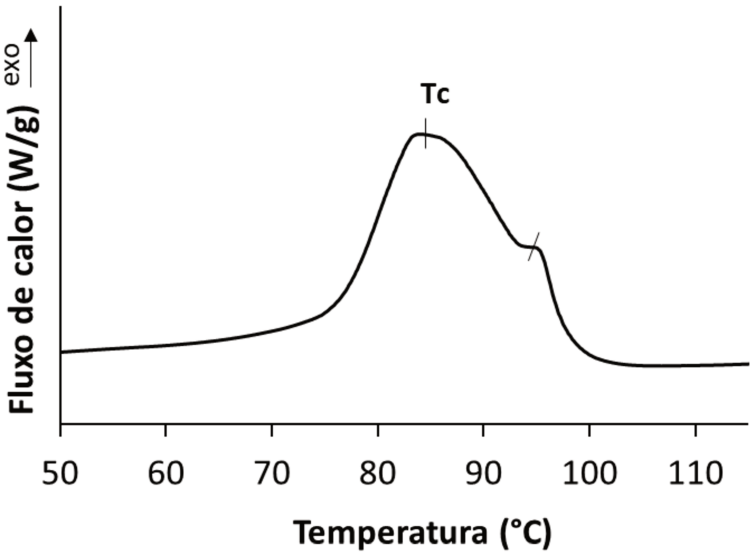
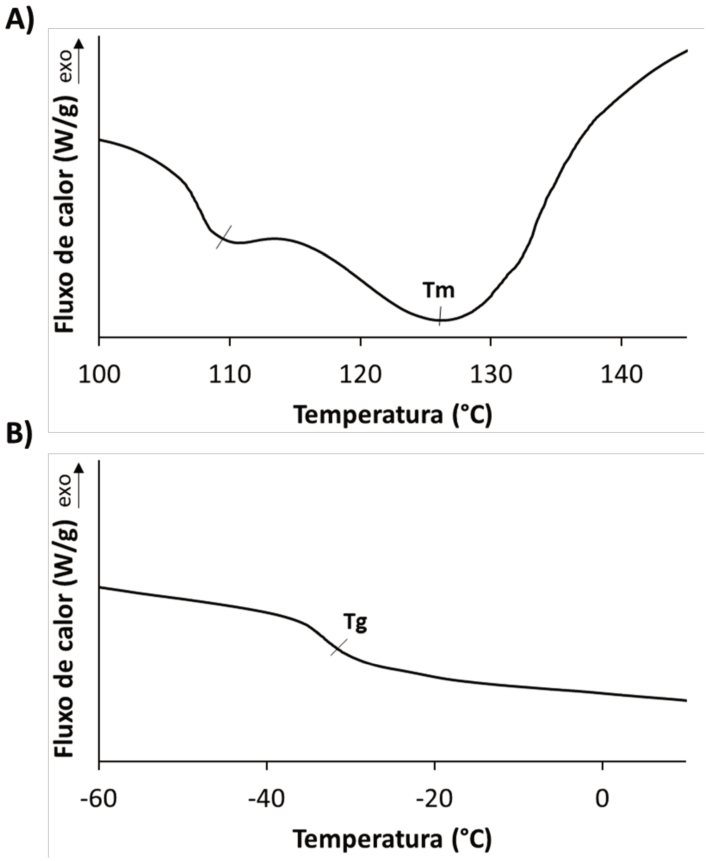


Figura 83 - Curva de DSC: resfriamento da amostra PBATNAT.



Fonte: O autor (2019)

Figura 84 - Regiões da curva de DSC para a amostra PBATNAT no segundo aquecimento: A) região da Tg; B) região da Tm.



Fonte: O autor (2019)

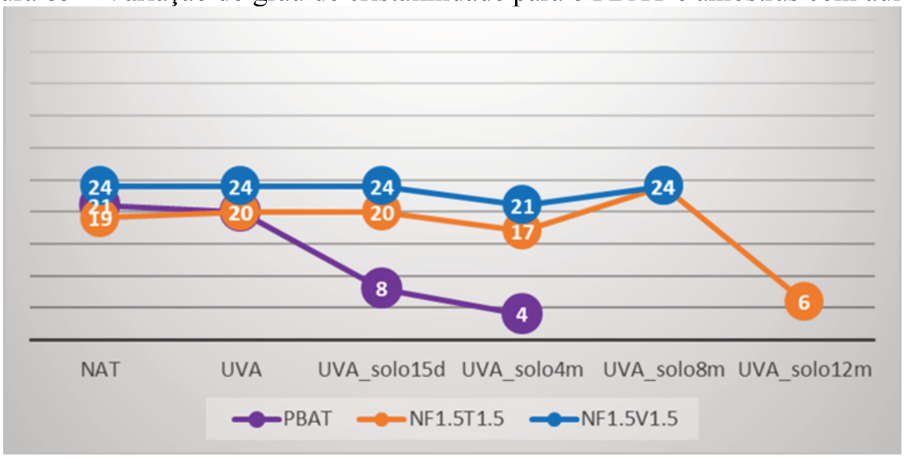
Tabela 43 – Resultados de DSC para amostras de PBAT, com e sem aditivos.

Amostras	Primeiro aquecimento			Resfriamento		Segundo aquecimento			
	Tm (°C)	ΔHm (J/g)	Xc (%)	Tc (°C)	ΔHc (J/g)	Tg (°C)	Tm (°C)	ΔHm (J/g)	Xc (%)
PBATNAT	122	24	21	84	18	-33	126	18	16
PBATUVA	124	23	20	110	17	-35	131	17	15
PBATUVA_solo15d	129	9	8	112	17	-30	134	14	12
PBATUVA_solo4m	137	4	4	118	10	-30	138	10	9
NF1.5T1.5NAT	119	22	19	89	15	-31	126	11	10
NF1.5T1.5UVA	119	23	20	100	15	-33	128	9	8
NF1.5T1.5UVA_solo15d	121	23	20	101	15	-33	129	10	9
NF1.5T1.5UVA_solo4m	122	19	17	97	14	-32	129	9	8
NF1.5T1.5UVA_solo8m	125	27	24	103	16	-33	132	10	9
NF1.5T1.5UVA_solo12m	130	7	6	105	10	-31	133	10	9
NF1.5V1.5NAT	121	26	24	98	15	-35	127	11	10
NF1.5V1.5UVA	120	27	24	106	17	-36	130	11	10
NF1.5V1.5UVA_solo15d	123	27	24	103	16	-34	130	11	10
NF1.5V1.5UVA_solo4m	124	24	21	106	15	-32	133	11	10
NF1.5V1.5UVA_solo8m	125	27	24	111	18	-33	134	14	12

Fonte: O autor (2019)

No primeiro aquecimento, o polímero puro foi o que mais apresentou alteração no valor de cristalinidade, conforme indicado na Figura 85.

Figura 85 – Variação do grau de cristalinidade para o PBAT e amostras com aditivos.



Fonte: O autor (2019)

A amostra envelhecida (PBATUVA) apresentava um grau de cristalinidade de 20%. Este reduziu para 8% e 4% após 15 dias e 4 meses de degradação em solo, respectivamente. Os filmes com aditivos apresentaram menor variação ao longo dos monitoramentos. Ainda assim, foi possível observar este comportamento para a amostra NF1.5T1.5UVA, cujo valor de cristalinidade iniciou em 20% e, após 12 meses de degradação em solo, foi de apenas 6%. Para a amostra NF1.5V1.5UVA, não foi constatado este comportamento. Todavia, é possível que a redução da cristalinidade também tenha ocorrido para esta amostra entre 8 e 12 meses. Estes resultados indicam a ocorrência de degradação da região cristalina (KIJCHAVENGKUL et al., 2010c; SAADI; CESAR; BEWA, 2013).

Em geral, poliésteres biodegradáveis tendem a apresentar um incremento da cristalinidade durante o processo de degradação hidrolítica, devido à reorganização de cadeias na região amorfa (GLEADALL; PAN; ATKINSON, 2012), o que não foi observado para o PBAT no presente estudo. Ressalta-se que as resinas comercialmente disponíveis de PBAT podem apresentar variações de 45% a 65% de unidades aromáticas (FENG et al., 2014). Quando este teor é superior a 40%, a fase cristalina é formada apenas por unidades BT, enquanto ambas unidades (BA e BT) podem ser encontradas na região amorfa (GAN et al., 2004). O comportamento observado neste estudo, de valores similares de Xc na maioria dos monitoramentos e sua posterior redução em estágios mais

avançados de degradação, reforça que os segmentos de unidades BA ou segmentos mistos de BA e BT não sofrem cristalização.

Também foi possível observar que para todas as amostras houve uma tendência de aumento da temperatura de cristalização (Tc) e da temperatura de fusão (Tm) ao longo do processo de degradação, o que sugere o aumento da fração de unidades aromáticas nas amostras. Gan et al. (2004) reportaram o aumento dos valores de Tc e Tm com o aumento da fração de unidades BT. O aumento da Tm pode estar associado ao aumento da rigidez da cadeia polimérica, enquanto o aumento da Tc pode ocorrer em decorrência do aumento da concentração de unidades aromáticas, as quais são consideradas cristalizáveis. Saadi et al. (2013) relataram aumento da Tm após degradação do PBAT em ambiente de compostagem. Os autores não apresentaram os resultados de Tc. Svoboda, Dvorackova e Svobodova (2019) avaliaram amostras de PBAT antes e após biodegradação anaeróbia em lodo de esgoto em condições mesofílicas (37 °C) e termofílicas (55 °C). Após ambos os processos de biodegradação os autores identificaram aumento de Tc e Tm.

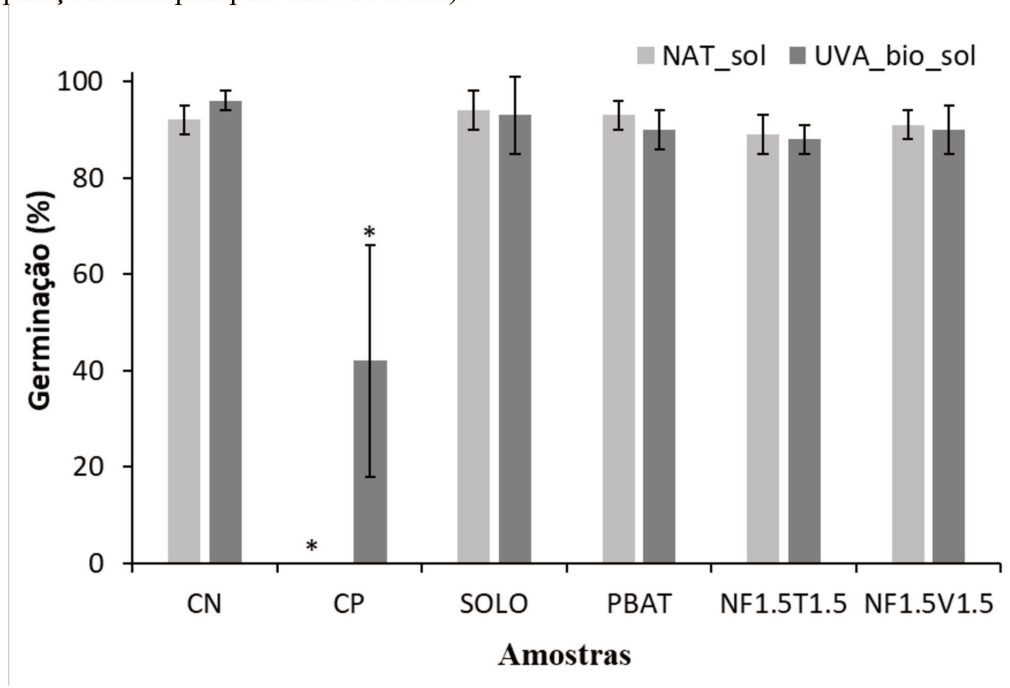
5.5. Análises ecotoxicológicas por Bioensaios

Neste item estão apresentados os resultados das avaliações ecotoxicológicas dos solubilizados preparados com solo e misturas de solo com as amostras naturais (NAT_sol). Também encontram-se apresentados os resultados para os solubilizados de solo e misturas de solo com as amostras envelhecidas, após ensaio de biodegradação (UVA_bio_sol). Os resultados tabelados das análises dos bioensaios estão apresentados no Apêndice K.

5.5.1. Bioensaio - *Lactuca sativa*

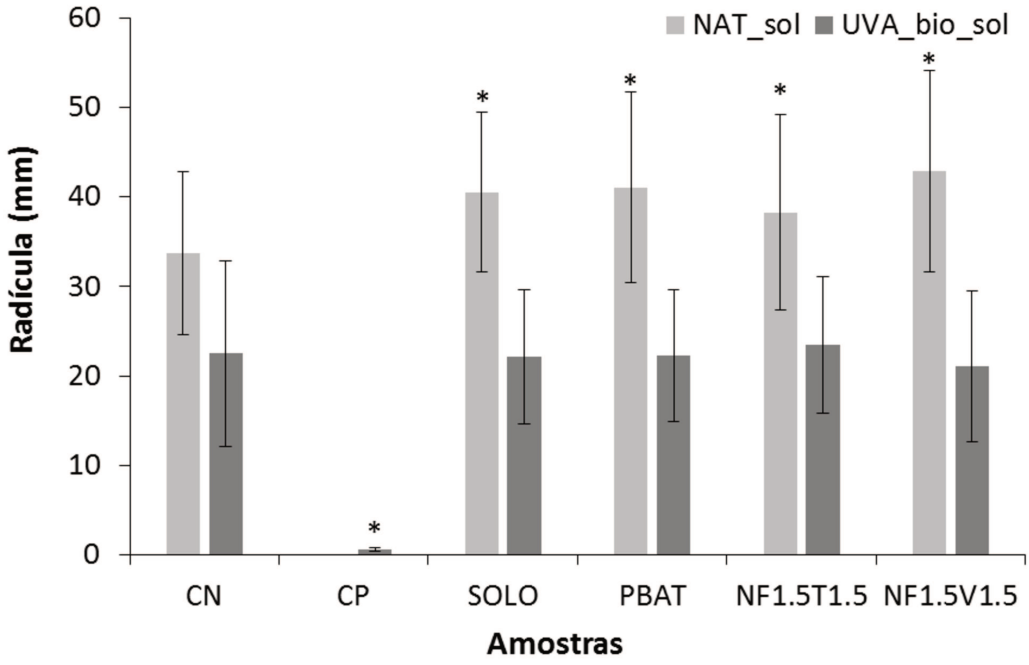
As Figuras 86 a 88 mostram os resultados de germinação, comprimento de hipocótilo e de radícula obtidos pelo bioensaio com *L. sativa.*

Figura 86 – Resultados de germinação de sementes de *Lactuca sativa* para amostras de solubilizado.*Estatisticamente significativo em relação ao CN (Kruskal-Wallis; p<0,05; comparações múltiplas pelo teste de Dunn).



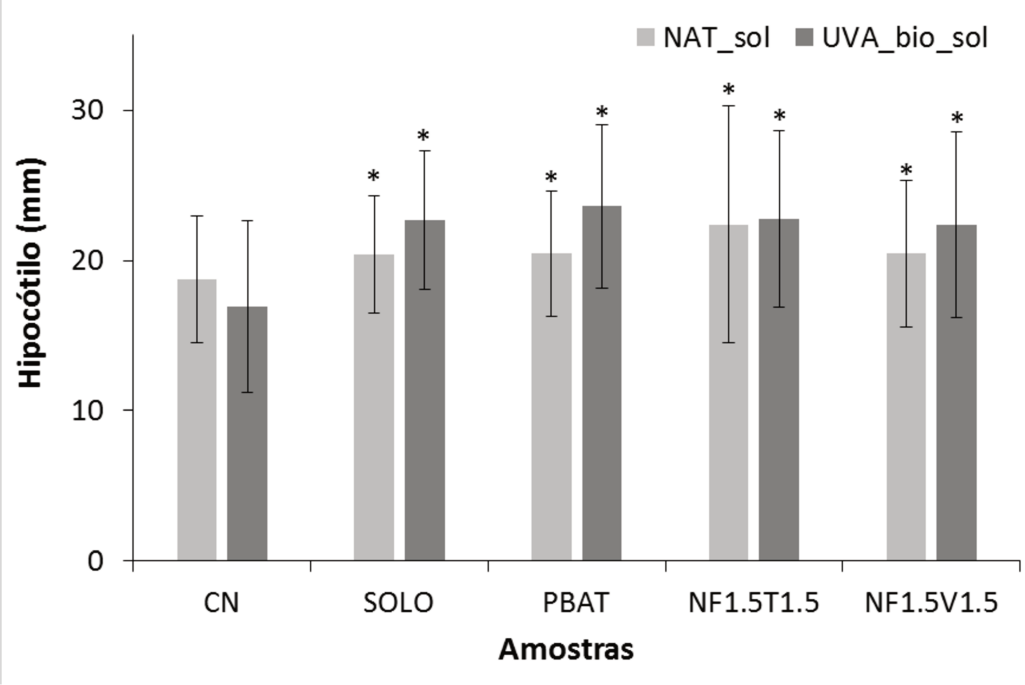
Fonte: O autor (2019)

Figura 87 - Resultados de comprimento de radícula de *Lactuca sativa* para amostras de solubilizado. .*Estatisticamente significativo em relação ao CN (Kruskal-Wallis; p<0,05; ; comparações múltiplas pelo teste de Dunn).



Fonte: O autor (2019)

Figura 88 - Resultados de comprimento de hipocótilo de sementes de *Lactuca sativa* para amostras de solubilizado.*Estatisticamente significativo em relação ao CN (Kruskal-Wallis; p<0,05; comparações múltiplas pelo teste de Dunn).



Fonte: O autor (2019)

Em ambos os períodos avaliados, a germinação não apresentou diferença significativa em relação ao controle negativo (CN) para nenhuma das amostras de solubilizado. Reduções estatisticamente significativas foram verificadas apenas para o controle positivo (CP), indicando respostas adequadas do bioensaio à solução de sulfato de zinco, empregada como controle de referência para fitotoxicidade (SOBRERO; BRONCO, 2004). O comprimento de radícula para o CP, avaliado no segundo monitoramento, também apresentou inibição significativa em relação ao CN.

Todas as amostras de solubilizado de solo preparadas antes do ensaio de biodegradação, com as amostras de filmes naturais, revelaram aumento significativo do comprimento da radícula em relação ao CN. O mesmo comportamento foi observado para o comprimento do hipocótilo. As amostras de solubilizado de solo preparadas após o ensaio de biodegradação apresentaram alteração significativa (aumento) apenas do comprimento de hipocótilo, em relação ao CN.

O aumento significativo do comprimento das estruturas da raíz (hipocótilo e/ou radícula) pode ter ocorrido por influência de nutrientes presentes no solubilizado de solo, os quais não ocorrem no controle negativo do teste (água ultrapura). Para verificar uma possível influência dos filmes plásticos sobre estes resultados, foi realizada a análise estatística dos parâmetros avaliados em relação ao solubilizado de solo puro. Por esta

análise, em ambos os períodos de monitoramento, não houve diferença significativa do comprimento do hipocótilo e da radícula para as amostras de solubilizado preparadas com solo e os filmes de PBAT. Assim, não é possível atribuir aos filmes os efeitos estimulantes observados, sendo mais coerente a hipótese relacionada aos nutrientes do solo.

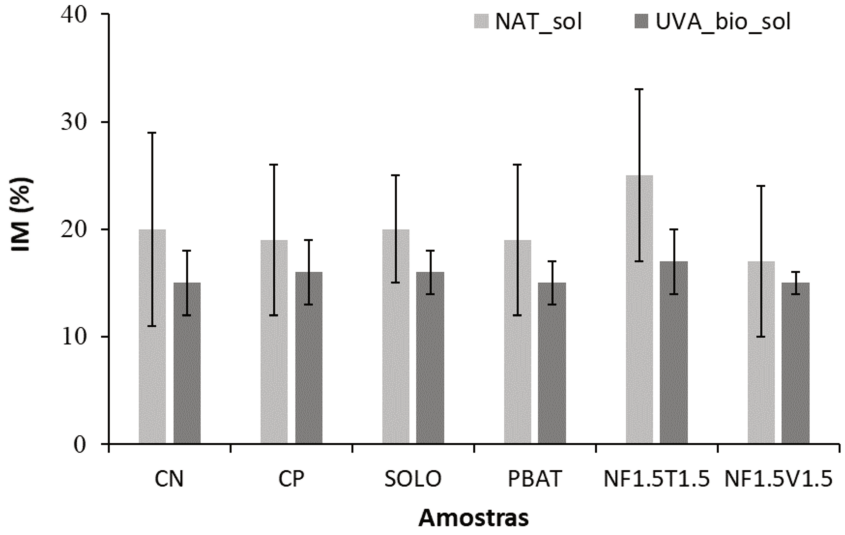
Alguns efeitos negativos sobre o crescimento de alface e tomate foram observados em estudos conduzidos com monômeros do PBAT (MARTIN-CLOSAS; BOTET; PELACHO, 2014) e com extrato aquoso preparados diretamente com os filmes *mulch* que possuíam o PBAT como matriz principal (SERRANO-LUIZ; MARTIN-CLOSAS; PELACHO, 2018). Por outro lado, estudos que avaliaram o solo após a degradação do PBAT, reportaram ausência de fitotoxicidade para aveia, agrião, rabanete (RYCHTER et al., 2010) e feijão (HARADA et al., 2019). No caso dos filmes *mulch* biodegradáveis, a avaliação ecotoxicológica da amostra ambiental (solo após degradação dos materiais) permite uma observação mais próxima do que se espera em um cenário real de destinação final. Além disso, a possibilidade de avaliar amostras ambientais como o solo é relevante por se tratarem de misturas complexas, com variedade de compostos químicos, os quais podem apresentar interação, levando a efeitos sinergísticos, antagônicos e aditivos (HEYS et al., 2016).

No presente trabalho, os resultados observados pelo bioensaio com o organismo teste *L.* sativa, indicam ausência de efeitos fitotóxicos das amostras de solubilizado de solo com diferentes filmes *mulch*, antes e após os processos de fotodegradação e biodegradação.

5.5.2. Bioensaio - *Allium cepa*

Os resultados de Índice Mitótico (IM) estão apresentados na Figura 89. Nenhuma das amostras de solubilizado avaliadas, em ambos os monitoramentos, apresentou IM estatisticamente significativo em relação ao CN. Dessa forma, os solubilizados não apresentaram efeito citotóxico.

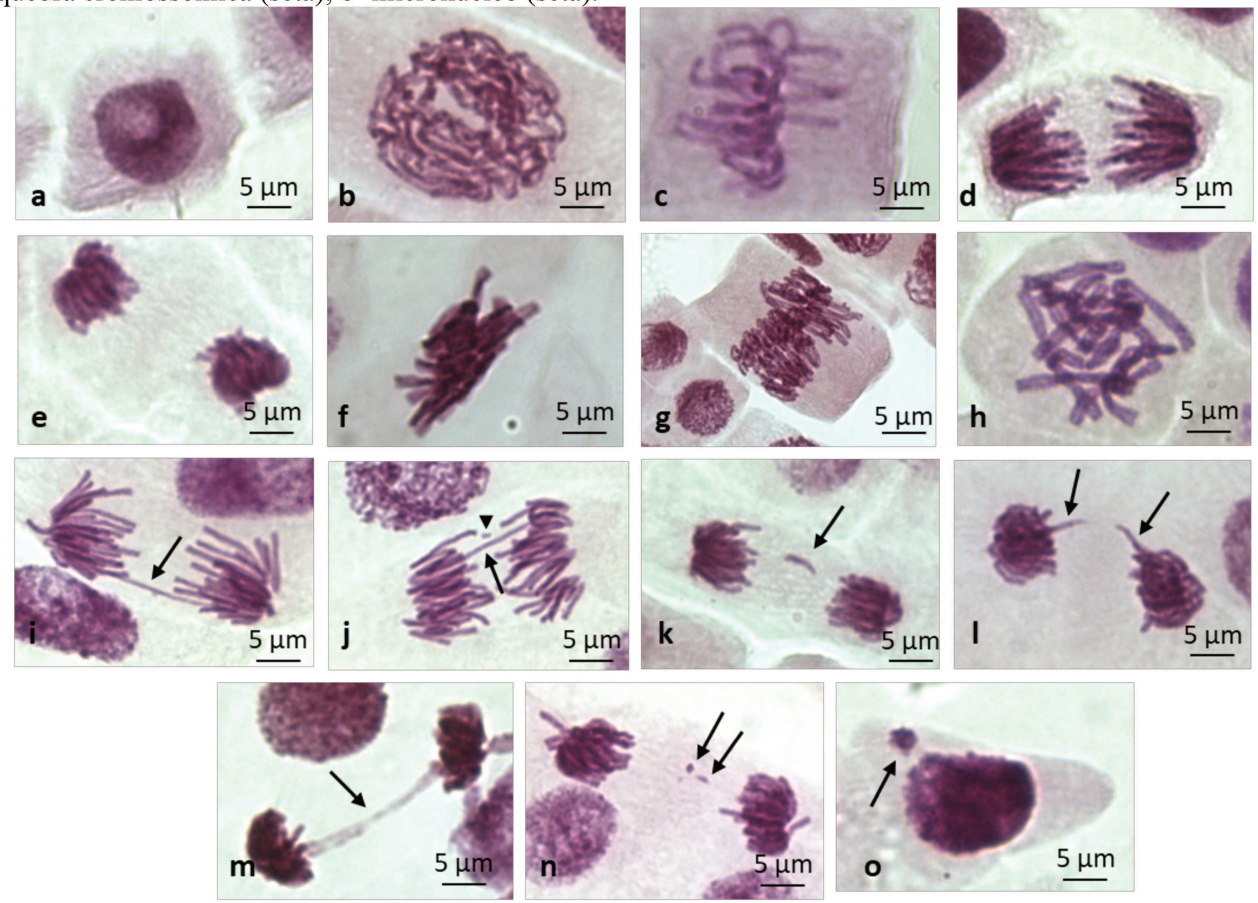
Figura 89 - Resultados do Índice Mitótico (IM) para as amostras de solubilizado de solo em células meristemáticas de *Allium cepa*.



Fonte: O autor (2019)

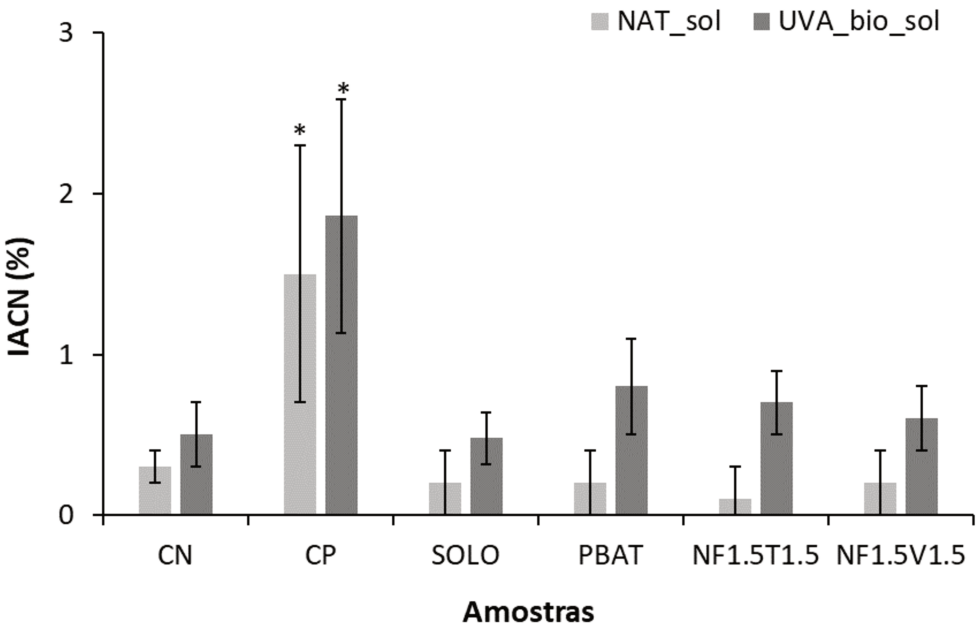
A Figura 90 ilustra as alterações cromossômicas identificadas em células meristemáticas de *A. cepa* como atraso, aderência, perda, ponte, C-metáfase, quebra, poliploidia. Os resultados do Índice de Alterações Cromossômicas e Nucleares (IACN) estão apresentados no gráfico da Figura 91. Com exceção do controle positivo (CP), as amostras avaliadas em ambos os monitoramentos não apresentaram diferença significativa em relação ao CN. O mesmo comportamento foi verificado para a frequência de micronúcleos em células das regiões meristemática e F1, cujos resultados encontram-se reportados nas Figuras 92 e 93. O metanossulfonato de metila (MMS), usado como CP, é um agente alquilante (transfere um radical alquila para a outra molécula, neste caso, para o DNA), portanto com característica mutagênica e carcinogênica (RANK;NIELSEN, 1997; MAZZEO; FERNANDES; MARIN-MORALES, 2011; LIMAN et al., 2012; KAUR, 2014; SOMMAGGIO et al., 2018a). Os resultados significativos para este tratamento confirmam uma resposta adequada para o bioensaio com o organismo teste *A. cepa*.

Figura 90 - Células meristemáticas de *Allium cepa*: a- interfase normal; b- prófase normal; c- metáfase normal; d- anáfase normal; e- telófase normal; f- metáfase com aderência cromossômica; g- metáfase poliplóide; h- C-metáfase; i- anáfase com ponte cromossômica (seta); j- anáfase com ponte (seta) e quebra cromossômica (ponta de seta); k- telófase com perda cromossômica (seta); l – telófase com atraso cromossômico (seta); m- telófase com ponte cromossômica (seta); n- telófase com quebra cromossômica (seta); o- micronúcleo (seta).



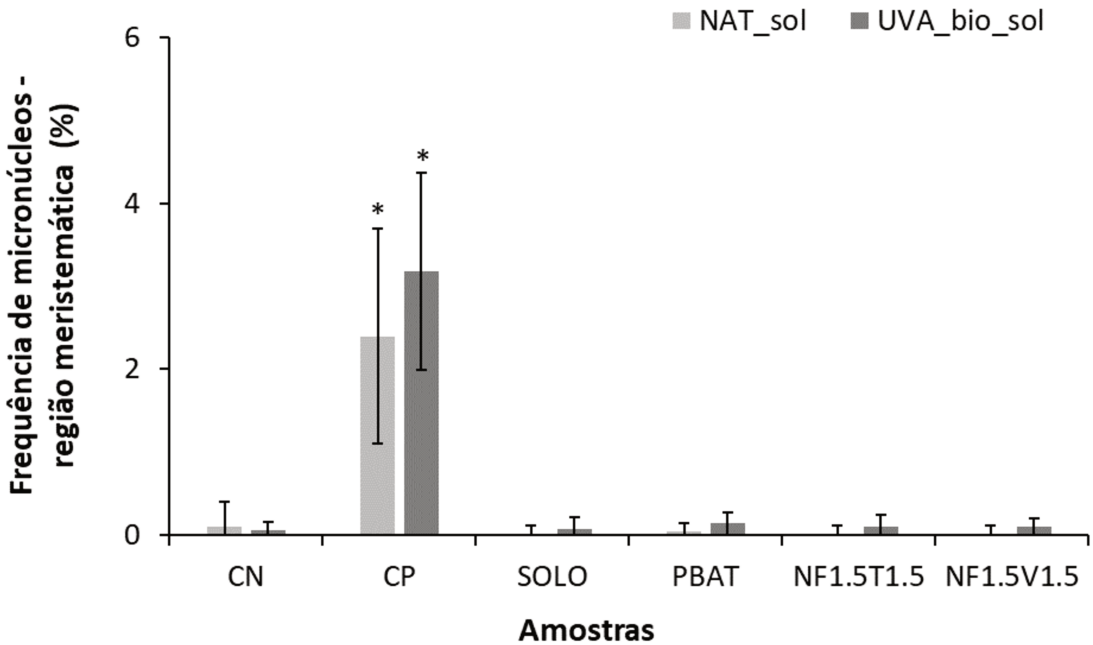
Fonte: O autor (2019)

Figura 91 - Resultados de Índice de Alterações Cromossômicas e Nucleares (IACN) para amostras de solubilizado de solo em células meristemáticas de *Allium cepa*. *Estatisticamente significativo (Kruskal-Wallis, p<0,05; comparações múltiplas pelo teste de Dunn).



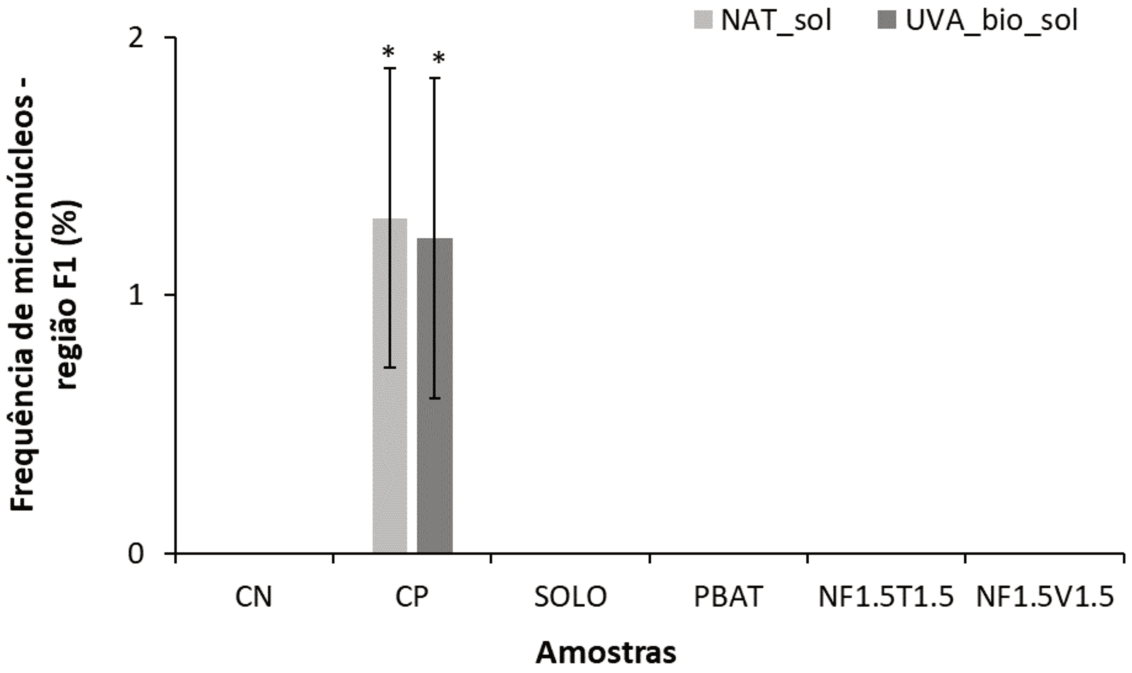
Fonte: O autor (2019)

Figura 92 - Resultados de frequência de micronúcleos na região meristemática de *Allium cepa*. Estatisticamente significativo (Kruskal-Wallis, p<0,05; comparações múltiplas pelo teste de Dunn).



Fonte: O autor (2019)

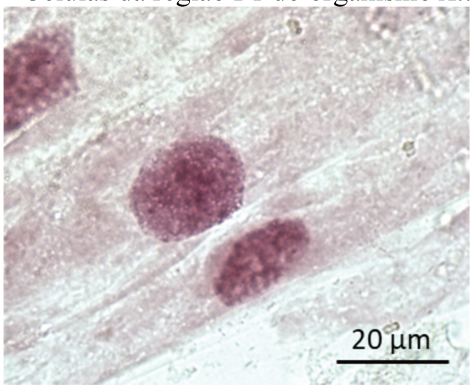
Figura 93 - Resultados de frequência de micronúcleos na região F1 de *Allium cepa*. Estatisticamente significativo (Kruskal-Wallis, p<0,05; comparações múltiplas pelo teste de Dunn).



Fonte: O autor (2019)

Palsikowski et al. (2018b) empregaram o bioensaio com *A. cepa* para avaliação da genotoxicidade de solubilizado de solo após 8 meses de degradação do PBAT modificado com extensor de cadeia. Os autores observaram que não houve indução significativa de alterações cromossômicas e de MNs na região meristemática de *A. cepa*. No presente estudo, pelos resultados do IACN e frequência de MNs na região meristemática, constatou-se a ausência de efeitos genotóxicos das amostras de solubilizado preparadas com a mistura de solo e filmes *mulch* de PBAT. Os resultados da frequência de MNs na região F1, por sua vez, confirmam ausência de efeitos mutagênicos destas amostras. A Figura 94 ilustra células da região F1 em condição de normalidade.

Figura 94 - Células da região F1 do organismo *Allium cepa*.



Fonte: O autor (2019)

5.5.3. Bioensaio - Cultura de células HepG2/C3A

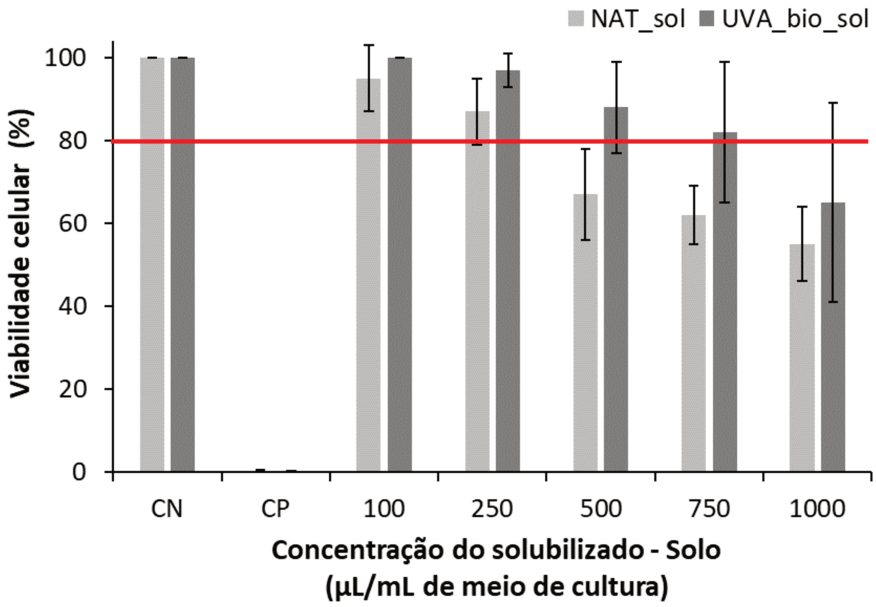
5.5.3.1. Ensaio do MTT

Os resultados de viabilidade celular, obtidos pelo teste MTT realizado com cultura celular de HepG2/C3A estão apresentados nas Figuras 95 a 98.

Para todos os ensaios, o controle positivo (CP) apresentou valores de viabilidade inferiores a 1%. Estes resultados são coerentes uma vez que a substância empregada como CP de fato induz citotoxicidade. O surfactante Triton X-100 leva à perda de integridade da bicamada lipídica da célula (KOLEY;BARD, 2010). Resultados similares para o Triton X-100 foram reportados por Agnihotri et al. (2015) em células de hepatocarcinoma humano HepG2.

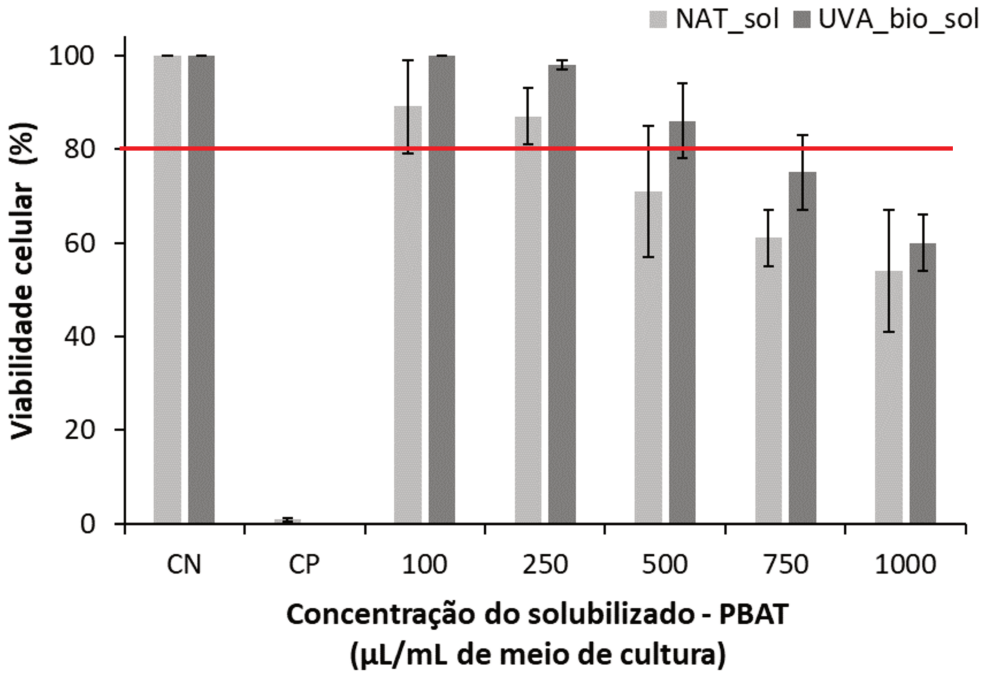
A maior concentração que apresentou valores de viabilidade celular acima de 80% entre todas as amostras de solubilizado testadas, foi 250 µL/mL de meio de cultura. Para os solubilizados SOLO, PBATNAT, NF1.5T1.5NAT, NF1.5V1.5NAT, os valores médios de viabilidade nessa concentração foram 87%, 87%, 93% e 97%, respectivamente. Dessa forma, a concentração de 250 µL/mL foi selecionada para a realização dos testes do cometa e do MN.

Figura 95 - Resultados de viabilidade celular para as amostras de solubilizado de solo puro, antes e após o ensaio de biodegradação.



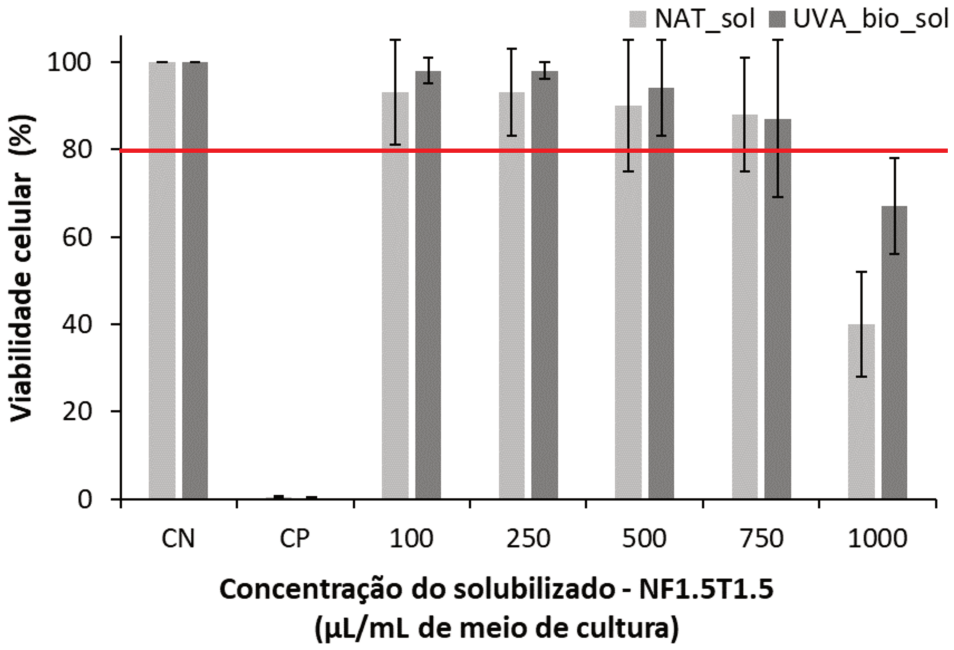
Fonte: O autor (2019)

Figura 96 - Resultados de viabilidade celular para as amostras de solubilizado de solo e PBAT puro, antes e após o ensaio de biodegradação.



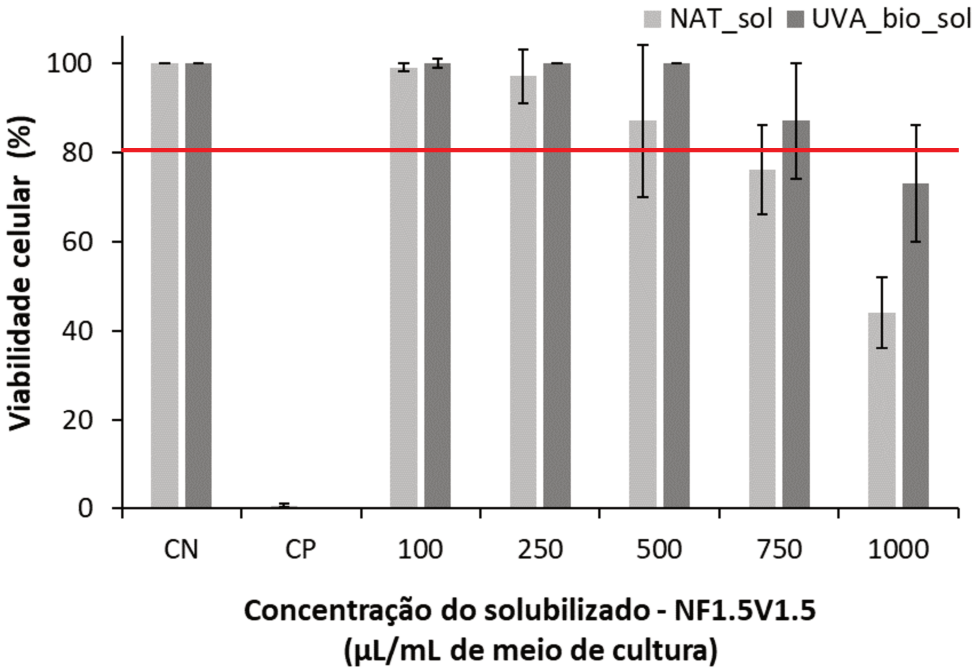
Fonte: O autor (2019)

Figura 97 - Resultados de viabilidade celular para as amostras de solubilizado de solo e NF1.5T1.5, antes e após o ensaio de biodegradação.



Fonte: O autor (2019)

Figura 98 - Resultados de viabilidade celular para as amostras de solubilizado de solo e NF1.5V1.5, antes e após o ensaio de biodegradação.



Fonte: O autor (2019)

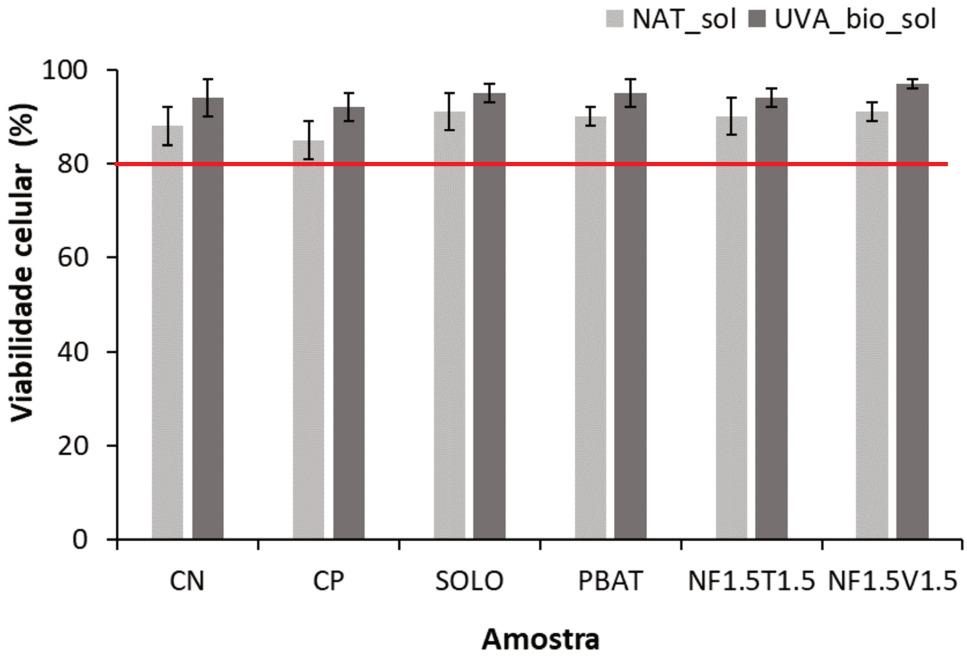
Fukushima et al. (2012) realizaram o teste MTT com células de fibroblastos L929 para filmes de PBAT puro e seus nanocompósitos com argilas montmorilonita, fluorhectorita e sepiolita. Amostras de 1 cm^2 destes materiais foram mantidas em meio de cultura por 24 h. Em seguida, o extrato foi utilizado para exposição das células, por diferentes períodos (24, 72 e 120 h). Não houve citotoxicidade provocada por nenhuma das amostras. Fukushima, Rasyida e Yang (2013) avaliaram as mesmas amostras pelo ensaio MTT em células de fibroblastos L929 e osteoblastos hFOb 1.19. Este estudo também foi conduzido com o extrato de filmes em meio de cultura e os períodos de exposição das células foram 24, 76 e 168 h. Nenhuma das amostras apresentou citotoxicidade.

No presente trabalho, observou-se que para todas as amostras de solubilizado, inclusive aquela preparada somente com solo, houve redução da viabilidade celular conforme aumentava-se a concentração da amostra em meio de cultura. Todavia, este efeito citotóxico pode ter ocorrido em decorrência de eventuais variações da osmolaridade e pH, condições do meio de cultura que afetam a viabilidade celular (SCHERLIESS, 2011).

5.5.3.2. Ensaio do cometa

Os resultados de viabilidade celular obtidos pela avaliação com Azul de Tripan das amostras de solubilizado de solo e filmes de PBAT estão apresentados na Figura 99. Todos os valores de viabilidade celular, para os testes realizados antes e após o ensaio de biodegradação, foram superiores a 80%, critério estabelecido para prosseguir o experimento. Este resultado reforça que a concentração de 250 µL de solubilizado/mL de meio de cultura é adequada para o estudo da genotoxicidade, confirmando o que foi previamente definido pelo ensaio do MTT.

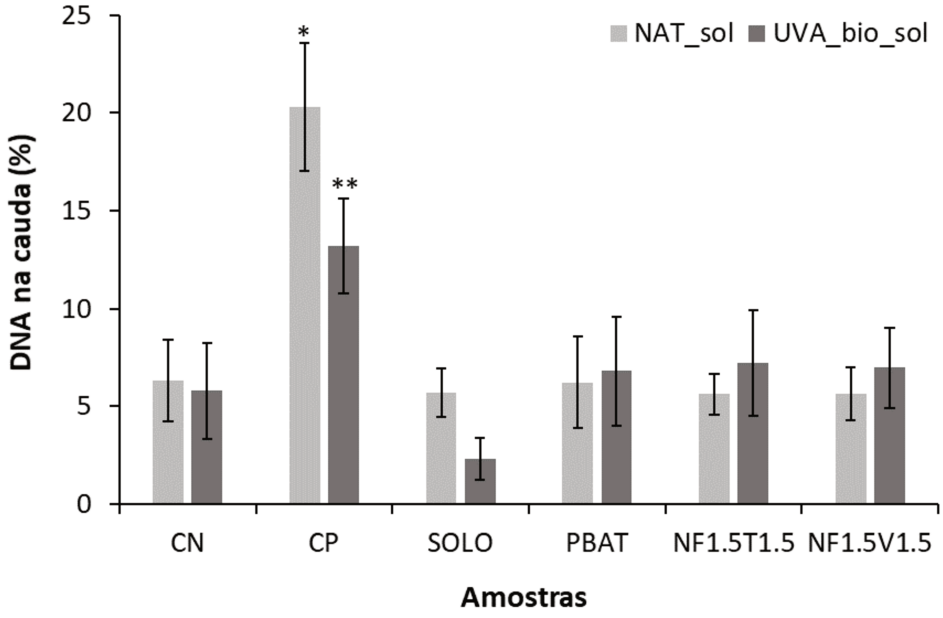
Figura 99 – Viabilidade celular para amostras de solubilizado de solo antes e após o ensaio de biodegradação, pelo ensaio com Azul de Tripan.



Fonte: O autor (2019)

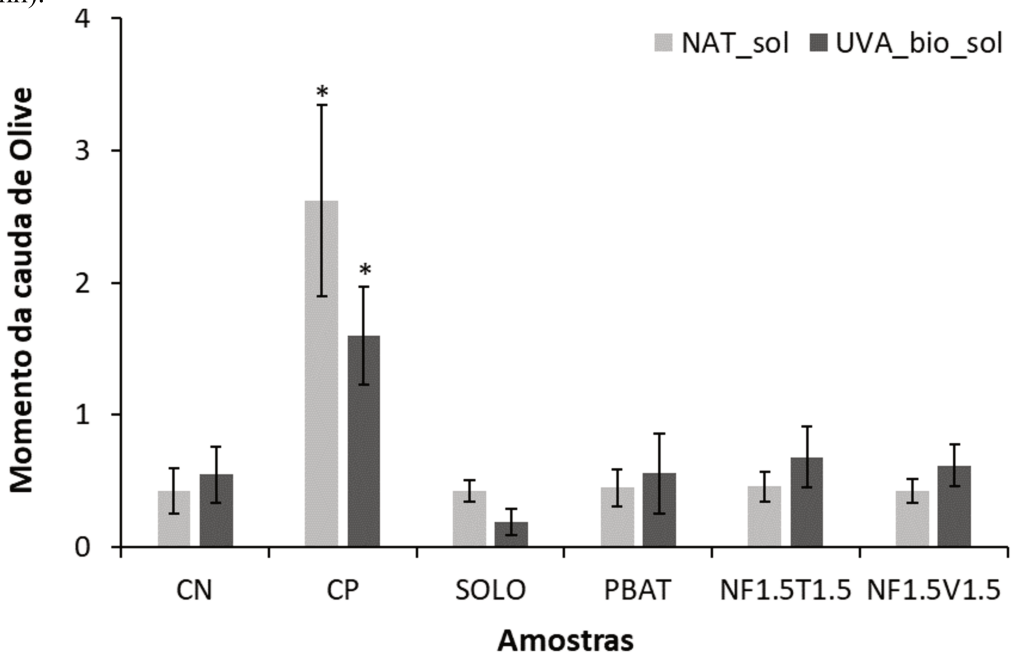
As Figuras 100 e 101 mostram os resultados das porcentagens de DNA na cauda e dos momentos da cauda de Olive, respectivamente.

Figura 100 - Porcentagem de DNA na cauda em células HepG2/C3A para as amostras de solubilizado de solo. *Estatisticamente significativo (Kruskal-Wallis, $p<0,05$; comparações múltiplas pelo teste de Dunn); ** estatisticamente significativo (ANOVA-um critério, $p<0,05$; comparações múltiplas pelo teste de Dunnett).



Fonte: O autor (2019)

Figura 101 - Momento da cauda de Olive em células HepG2/C3A para as amostras de solubilizado de solo. *Estatisticamente significativo (Kruskal-Wallis, p<0,05; comparações múltiplas pelo teste de Dunn).



Fonte: O autor (2019)

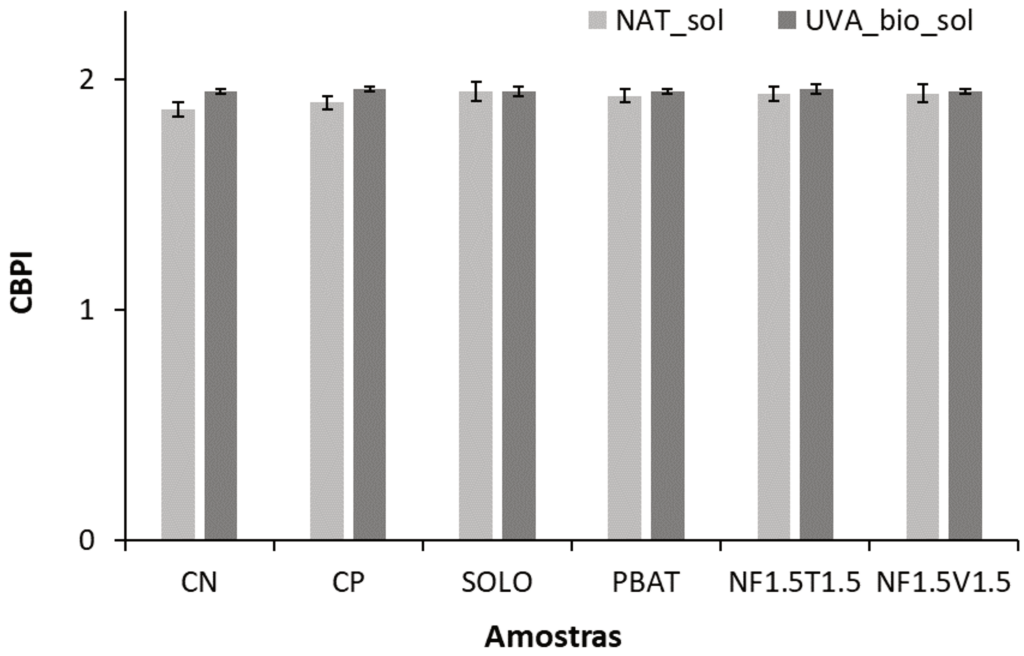
As amostras avaliadas pelo ensaio do cometa, antes e após o ensaio de biodegradação, não apresentaram valores estatisticamente diferentes de porcentagem de DNA na cauda e momento da cauda de Olive, quando comparados com os registrados para o CN. Assim, as amostras de solubilizados das misturas de solo e filmes de PBAT apresentaram ausência de efeitos genotóxicos, em ambos os períodos de monitoramento.

Não foram identificados estudos na literatura que tenham empregado o teste do cometa para avaliação da genotoxicidade referente ao polímero PBAT.

5.5.3.3. Ensaio do micronúcleo com bloqueio de citocinese

A Figura 102 apresenta os resultados do Índice de proliferação com bloqueio de citocinese (CBPI) avaliado em células HepG2/C3A para as amostras de solubilizado de solo antes e após o ensaio de biodegradação. Em ambos os períodos de avaliação, não houve alteração significativa deste parâmetro para nenhuma das amostras de solubilizado, o que indica a ausência de citotoxicidade.

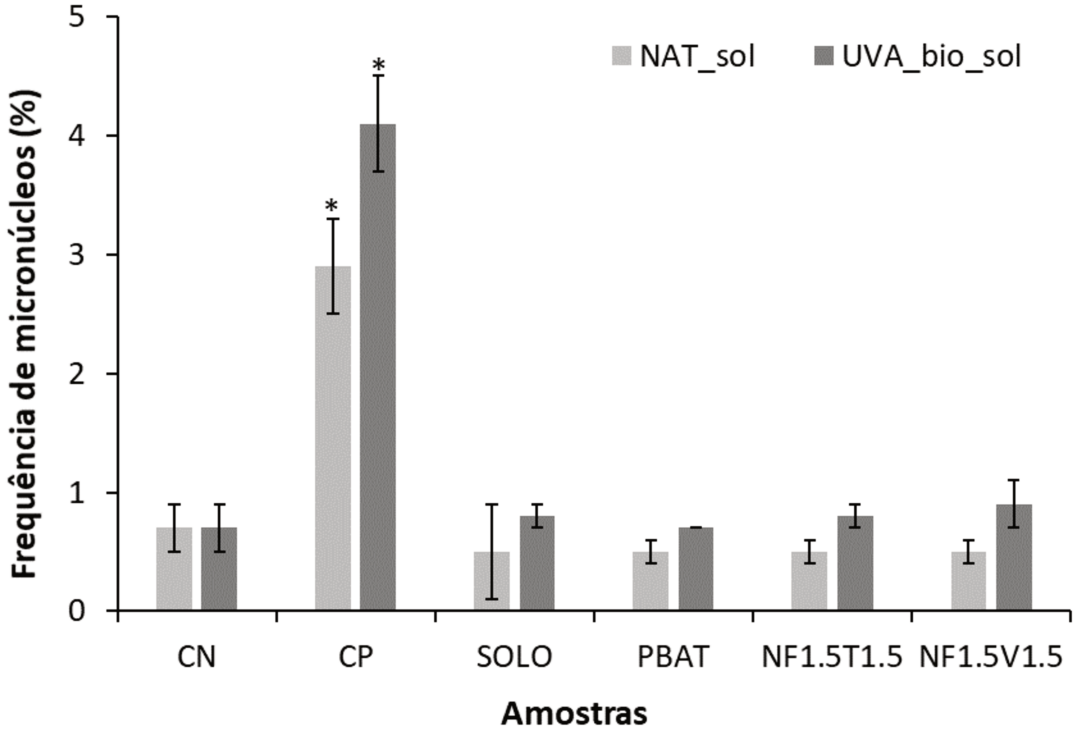
Figura 102 – Resultados de CBPI em células HepG2/C3A, para as amostras de solubilizado de solo.



Fonte: O autor (2019)

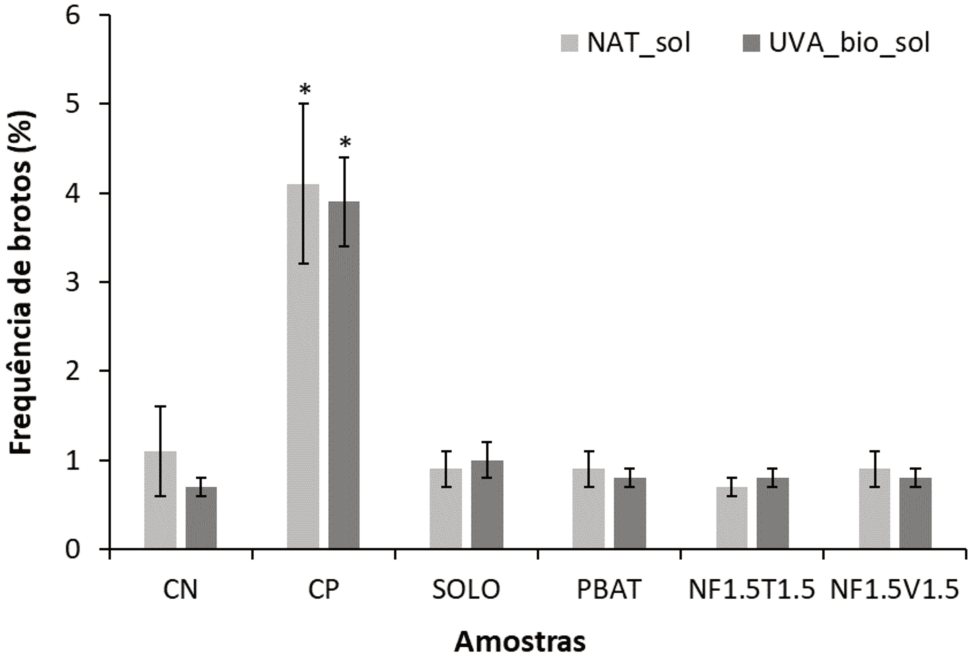
Como pode ser observado nas Figuras 103 a 105, não foram constatados resultados estatisticamente diferentes entre os ensaios realizados com as amostras de solubilizado de solo e o CN, para frequência de brotos, pontes e MNs, antes e após o ensaio de biodegradação.

Figura 103 - Resultados da frequência de micronúcleos em células HepG2/C3A, para as amostras de solubilizado de solo. *Estatisticamente significativo (Kruskal-Wallis, p<0,05; comparações múltiplas pelo teste de Dunn).



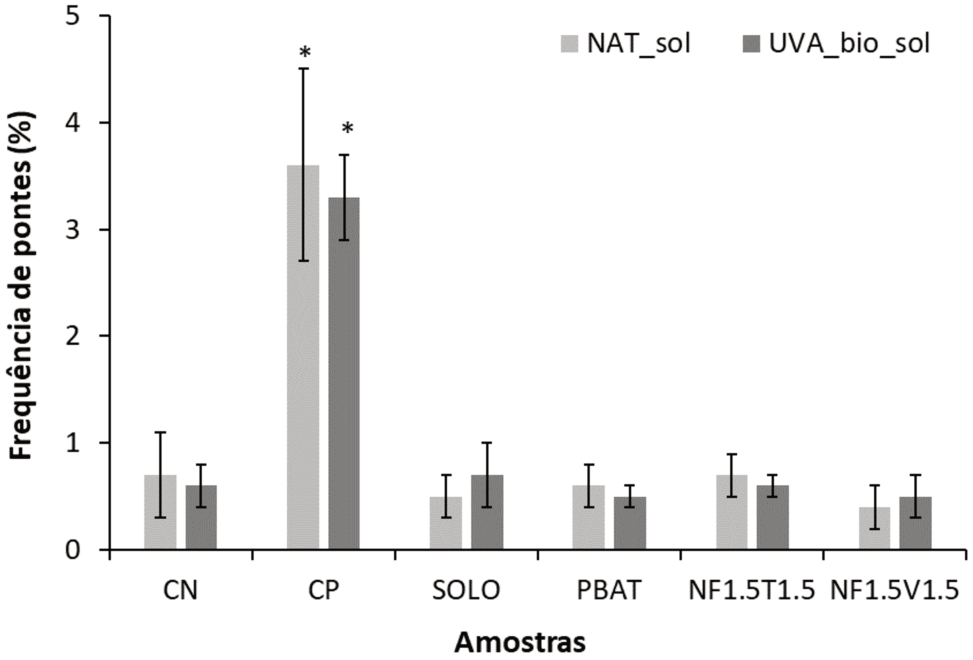
Fonte: O autor (2019)

Figura 104 - Resultados da frequência de brotos em células HepG2/C3A, para as amostras de solubilizado de solo. *Estatisticamente significativo (Kruskal-Wallis, p<0,05; comparações múltiplas pelo teste de Dunn).



Fonte: O autor (2019)

Figura 105 - Resultados da frequência de pontes em células HepG2/C3A, para as amostras de solubilizado de solo. *Estatisticamente significativo (Kruskal-Wallis, p<0,05; comparações múltiplas pelo teste de Dunn).



Fonte: O autor (2019)

Os resultados apresentados permitem afirmar que as amostras de solubilizado de solo não apresentaram efeitos genotóxicos para as células HepG2/C3A. Não foram encontrados na literatura outros estudos que tenham apresentado avaliação de genotoxicidade pelo teste de MN, referente ao polímero PBAT.

5.5.4. Análise comparativa entre os monitoramentos com os bioensaios

A Tabela 44 apresenta a comparação dos diferentes parâmetros avaliados nos monitoramentos inicial e final, indicando se as diferenças foram significativas ou não.

Tabela 44 – Análises estatísticas dos parâmetros avaliados pelos bioensaios com solubilizados de solo, antes e após a degradação dos filmes.

Bioensaio	**Amostras**	**Parâmetros avaliados nos bioensaios**		
		Germinação	**Comprimento de hipocótilo**	**Comprimento de radícula**
L. sativa	CN	NS	NS	S(-)
	SOLO	NS	NS	S(-)
	PBAT	NS	NS	S(-)
	NF1.5T1.5	NS	NS	S(-)
	NF1.5V1.5	NS	NS	S(-)
A. cepa	**Amostras**	**Índice Mitótico**	**Índice de Alterações Cromossômicas e Nucleares**	**Frequência MN – região meristemática**
	CN	NS	NS	NS
	SOLO	NS	NS	NS
	PBAT	NS	S(+)	NS
	NF1.5T1.5	NS	S(+)	NS
	NF1.5V1.5	NS	NS	NS
Ensaio do cometa-HEPG2/C3A	**Amostras**	**DNA na cauda (%)**	**Momento da cauda de Olive**	
	CN	NS	NS	
	SOLO	NS	NS	
	PBAT	NS	NS	
	NF1.5T1.5	NS	NS	
	NF1.5V1.5	NS	NS	
Ensaio do MN-HEPG2/C3A	**Amostras**	**CBPI**	**Frequência de brotos**	**Frequência de pontes**	**Frequência de MNs**
	CN	NS	NS	NS	NS
	SOLO	NS	NS	NS	NS
	PBAT	S(+)	NS	NS	NS
	NF1.5T1.5	S(+)	NS	NS	NS
	NF1.5V1.5	NS	NS	NS	NS

S(+) – apresentou aumento estatisticamente significativo entre os monitoramentos; S(-) – apresentou redução estatisticamente significativa entre os monitoramentos; NS – não apresentou diferença estatisticamente significativa entre os monitoramentos; Fonte: O autor (2019).

Considerando o bioensaio com o organismo teste *L. sativa*, houve redução significativa do comprimento de radícula para as amostras de solubilizado preparadas com solo e filmes plásticos após o ensaio de biodegradação. Todavia, esta redução também foi verificada para os controles negativo (CN) e ambiental (solubilizado preparado apenas com solo). Dessa forma, este comportamento pode ter sido ocasionado por diferenças de respostas entre as sementes empregadas nos dois monitoramentos, que são de lotes distintos.

Em geral, para os bioensaios com *A. cepa* e cultura celular não houve diferença significativa entre os monitoramentos avaliados. Exceções foram os parâmetros IACN, quantificado em células meristemáticas de cebola, bem como o CBPI, quantificado para células HEPG2/C3A. Estes dois parâmetros apresentaram aumento significativo para os solubilizados NF1.5T1.5UVA_bio_sol e PBATUVA_bio_sol. Nesses casos os aumentos não foram observados para os controles negativo e ambiental. Isso indica que a degradação dos filmes induziu um aumento de efeitos ecotoxicológicos, possivelmente decorrente da formação de subprodutos do PBAT. Mesmo ocorrendo este aumento, reitera-se que pela comparação com o CN em cada monitoramento, os efeitos adversos não foram significativos.

Outra observação é que este aumento não ocorreu para a amostra referente à formulação com negro de fumo e vitamina E. Já que os valores de mineralização para as diferentes formulações foram próximos, uma hipótese para este comportamento é que a presença de vitamina E na formulação pode ter favorecido a assimilação de subprodutos por microrganismos como carbono de biomassa, reduzindo a concentração de subprodutos na amostra de solo. Ainda não existem métodos validados que permitam a quantificação da biomassa no processo de biodegradação de plásticos. A norma ASTM D6400 (2019) recomenda que, quando possível, pelo avanço de conhecimento científico, a biomassa também seja quantificada. Outro parâmetro que permitiria explorar melhor essa hipótese seria a identificação e quantificação dos subprodutos de degradação nas amostras de solo e solubilizado.

6. CONCLUSÕES

O polímero PBAT, ao sofrer fotodegradação, apresenta uma competição entre processos de cisão de cadeia e reticulação, ambos levando à redução do alongamento. A presença dos aditivos minimizou a cisão de cadeias decorrente da exposição à radiação ultravioleta.

O estudo permitiu a seleção de duas formulações com maior potencial para aplicação como filme *mulch*, denominadas NF1.5T1.5 (amostra com 1,5% em massa de negro de fumo e 1,5% em massa de aditivo HALS) e NF1.5V1.5 (amostra com 1,5% em massa de negro de fumo e 1,5% em massa de vitamina E). Ambas as formulações, embora não tenham evitado a reticulação, diminuíram consideravelmente o processo de cisão de cadeias, minimizando os efeitos de degradação sobre as propriedades mecânicas. Estas formulações podem ser consideradas como potenciais para o emprego como filmes *mulch* biodegradáveis.

Em conjunto, as análises do ensaio de desintegração (SEM, DSC, FTIR e GPC) permitem inferir que o PBAT e suas formulações com aditivos sofrem degradação hidrolítica em solo com ataque preferencial da região amorfa, promovendo a migração de unidades alifáticas e aumento da fração e unidades aromáticas. Quanto menor a massa molar dos materiais, mais favorável a migração das unidades BA e o consequente aumento da fração de unidades BT.

A amostra envelhecida de PBAT puro apresentou maior taxa de desintegração e mineralização seguida das amostras com negro de fumo e vitamina E e, por fim, a formulação com negro de fumo e HALS. Esta ordem é coerente com a condição das amostras após o envelhecimento, uma vez que quanto maior a cisão de cadeia promovida durante a fotodegradação e menor teor de gel, de fato espera-se uma maior taxa de desintegração e metabolização dos produtos de degradação por microrganismos. Todavia, ao longo do processo de mineralização, as diferenças se tornaram mais sutis, indicando a influência de outro fator sobre a biodegradação das amostras, no sentido de retardar este processo. Este fator é possivelmente o aumento da fração de unidades aromáticas decorrente da migração de unidades alifáticas, o qual tende a acontecer mais rapidamente para os materiais com menor massa molar.

Ressalta-se que a maior proteção para as formulações com aditivos durante o envelhecimento acelerado não impediu e não retardou de forma significativa a

biodegradação em solo, o que é desejável considerando a proposta de disposição final para os filmes *mulch* biodegradáveis, que é a incorporação em solo após o uso.

Tanto antes como após os ensaios de envelhecimento e biodegradação, a avaliação ecotoxicológica dos solubilizados de misturas de solo com as amostras de PBAT, com e sem aditivos, indicou ausência de efeitos fitotóxicos pelo bioensaio com o organismo *L. sativa*. Não foram constatados efeitos citotóxicos e genotóxicos em células meristemáticas de *A. cepa* e a avaliação de células na região F1 indicou ausência de potencial mutagênico. Além disso, também não foram constatados efeitos genotóxicos pelos bioensaios com células HepG2/C3A.

Ressalta-se ainda, que a concentração inicial de plástico no solo empregada no preparo dos solubilizados foi cerca de uma ordem de grandeza acima da esperada como concentração de aplicação em campo. Dessa forma, não são esperados efeitos adversos em concentrações reais, o que reforça o potencial das formulações de PBAT com os aditivos estudados para aplicação como filmes *mulch*, também sob o ponto de vista da segurança ambiental.

7. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Sugere-se como estudos futuros:

- Estudo da influência da concentração de unidades aromáticas no PBAT sobre sua estrutura cristalina e processos de desintegração e biodegradação em solo;
- Caracterização da fração gel do PBAT e elucidação do mecanismo de reticulação;
- Estender análises de Ecotoxicologia para filmes *mulch* biodegradáveis comercialmente disponíveis;
- Realizar análises químicas do solo e solubilizado para identificação e quantificação das concentrações de subprodutos formados ao longo da degradação do PBAT.

8. REFERÊNCIAS

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS – ABNT 10006.” Procedimento para a obtenção de extrato solubilizado de resíduos sólidos”, 2004.

AGNIHOTRI, S.; BAJAJ, G.; MUKHERJI, S; MUKHERJI, S. Arginine- assisted immobilization of silver nanoparticles on ZnO nanorods: an enhanced and reusable antibacterial substrate without human cell cytotoxicity. Nanoscale, Londres, v.7, n.16, p. 7415-7429, 2015.

AL-ITRY, R.; LAMNAWAR, K.; MAAZOUZA, A. Improvement of thermal stability, rheological and mechanical properties of PLA, PBAT and their blends by reactive extrusion with functionalized epoxy. Polymer Degradation and Stability, Amsterdam, v. 97, p. 1898- 1914, 2012.

AL-HARTOMY, O.M.; AL-SOLAMY, F.; AL-GHAMDI, A.; DISHOVSKY, N.; IVANOV, M.; MIHAYLOV, M.; EL-TANTAWY, F. Influence of carbon black structure and specific surface area on the mechanical and dielectric properties of filled rubber composites. International Journal of Polymer Science, 2011. DOI: http://dx.doi.org/10.1155/2011/521985. Disponível em: https://www.hindawi.com/journals/ijps/2011/521985/. Acesso em: 18 dezembro 2018.

ALLEN, N.S.; PENA, J.M.; EDGE, M.; LIAUW, C.M. Behavior of carbon black pigments as excited quenchers in LDPE. Polymer Degradation and Stability, Amsterdã, v. 67, n. 3, p.563-566, 2000.

AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS- ASTM D 5338 – Standard Test Method for Determining Aerobic Biodegradation of Plastic Materials under Controlled Composting Conditions, 2003.

AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS- ASTM D 882 – Standard test method for tensile properties of thin plastic sheeting, 2012.

AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS- ASTM D6400- Standard Specification for Labeling of Plastics Designed to be Aerobically Composted in Municipal or Industrial Facilities, 2019.

AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS- ASTM D5988 - Standard Practice for Determining Aerobic Biodegradation of Plastic Materials in Soil, 2012.

AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS- ASTM G 154 - Standard Practice for Operating Fluorescent Ultraviolet (UV) Lamp Apparatus for Exposure of Nonmetallic Materials, 2012.

AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS- ASTM D6866 – "Standard Test Methods for Determining Biobased Content of Solid, Liquid and Gaseous Samples Using Radiocarbon Analysis", 2016.

AQUINO, K.A.S.; ARAÚJO, E.S. Estudo da estabilização térmica em filmes de poli (metacrilato de metila) radioestáveis. Revista Brasileira de Pesquisa e Desenvolvimento, v. 6, n. 1, p. 30-33, 2004.

ASHRAF, M.; AKRAM, N.A.; AL-QURAINY, F.; FOOLAD, M. R. Drought tolerance: roles of organic osmolytes, growth regulators, and mineral nutrients. Advances in Agronomy, San Diego, v. 111, p. 249-296, 2011.

ASHTON, S.J. Design, construction and research application of a differential electrochemical mass spectrometer (DEMS). Berlin: Springer, 2012, 219p.

AZEVEDO, H.S.; REIS, R.L. Understanding the enzymatic degradation of biodegradable polymers and strategies to control their degradation rate. In: REIS, R.L.; ROMÁN, J.S. (Eds.). Biodegradable systems in tissue engineering and regenerative medicine. Boca Raton: CRC Press, 2004. pp.177-200.

AZQUETA, A.; COLLINS, A. R. The Comet Assay: A Sensitive and Quantitative Method for Analysis of DNA Damage. Encyclopedia of Analytical Chemistry, 2011. DOI: https://doi.org/10.1002/9780470027318.a9192. Disponível em: https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/9780470027318.a9192. Acesso em: 18 dezembro 2012.

BANKS, M.K.; SCHULTZ, K.E. Comparison of plants for germination toxicity tests in petroleum-contaminated soil. Water Air Soil Pollution, Nova Iorque, v. 167, p. 211-219, 2005.

BASF. Tinuvin 783. São Paulo, 2004. (Catálogo comercial).

BASF. PBAT Ecoflex F Blend C 1200, 2013. (Catálogo commercial).

BEYER, J., PETERSEN, K., SONG, Y., RUSS, A., GRUNG, M.; BAKKE, T.; TOLLEFSEN, K.E. Environmental risk assessment of combined effects in aquatic ecotoxicology: a discussion paper. Marine Environmental Research, Amsterdã, v. 96, p. 81-91, 2014.

BIANCHI, J.; MANTOVANI, M.S.; MARIN-MORALES, M.A. Analysis of the genotoxic potential of low concentrations of Malahtion on the *Allium cepa* cells and rat hepatoma tissue culture. Journal of Environmental Sciences, Amsterdã, v. 36, p. 102-111, 2015.

BILCK, A.P.; GROSSMANN, M.V.E.; YAMASHITA, F. Biodegradable mulch films for strawberry production. Polymer Testing, Amsterdã, v. 29, n.4, p. 471-476, 2010.

BIUNDO, A.; HROMIC, A; PAVKOV-KELLER, T.; GRUBER, K.; QUARTINELLO, F.; HAERNVAL, K.; PERZ, V.; ARREL, M.S.; ZINN, M.; RIBITSCH, D.; GUEBITZ, G.M. Characterization of a poly(butylene adipate-co-terephthalate)-hydrolyzing lipase from *Pelosinus fermentans*. Applied Microbiology and Biotechnology, Berlim, v.100, p.1753-1764, 2016.

BLÄSING, M.; AMELUNG, W. Plastics in soil: analytical methods and possible sources. Science of the Total Environment, Amsterdã, v. 612, p. 422-435, 2018.

BREGOLI, L., POZZI-MUCELLI, S., MANODORI, L. Molecular Methods for Nanotoxicology. In: KHAN, H.A., ARIF, I.A. (Eds.) Toxic Effects of Nanomaterials. Sharjah: Bentham Science Publishers, 2012. pp. 97-120.

BREWER, S.A. Carbon black pigments. In: CHARVAT, R.A. Coloring of plastics. Hoboken: John, Wiley & Sons, 2004. p. 159-174.

BRITISH STANDARD BS 8472. Methods for the assessment of the oxo-biodegradation of plastics and of phyto-toxicity of residues in controlled laboratory conditions. 2011.

BREULMANN, M.; KÜNKEL, A.; PHILIPP, S.; REIMER, V.; SIEGENTHALER, K.O.; SKUPIN, G.; YAMAMOTO, M. Biodegradable Polymers. In: ELVERS, B. Ullmann's Polymers and Plastics: Products and Processes. Weinheim, Wiley, 2016.

BRIASSOULIS, D. Mechanical behavior of biodegradable agriculture films under field conditions. Polymer Degradation and Stability, Amsterdã, v. 91, p. 1256-1272, 2006.

CAI, Y.; JUNGANG, L.V; FENG, J.. Spectral Characterization of Four Kinds of Biodegradable Plastics: Poly (Lactic Acid), Poly (Butylene Adipate-Co-Terephthalate), Poly (Hydroxybutyrate-Co-Hydroxyvalerate) and Poly (Butylenes Succinate) with FTIR and Raman Spectroscopy. Journal of Polymers And The Environment, Norwell, v. 21, n. 1, p.108-114, 2013.

CABOT. Carbon blacks for specialty applications. 1988 (catálogo comercial).

CACERES, C.A.; CANEVAROLO, S.V. Degradação do polipropileno durante a extrusão e a geração de compostos orgânicos voláteis. Polímeros: Ciência e Tecnologia, São Carlos, v. 19, n. 1, p. 79-74, 2009.

CANEVAROLO, S.V. Chain scission distribution function for polypropylene degradation during multiple extrusions. Polymer Degradation and Stability, Amsterdã, v. 709, p.71-76, 2000.

CAPAGNA-FERNANDES, A.F.; MARIN, E.B.; PENHA, T.H.F.L. Application of root growth endpoint in toxicity tests with lettuce. Ecotoxicology and Environmental Contamination, Campinas, v. 11, n. 1, p. 27-32, 2016.

CARDONA, Y.T.; ROCHA, P.S.; CRISTINA, T.; FERNANDES, C.; MARIN-MORALES, M.A. Cytotoxic and genotoxic effects of two hair dyes used in the formulation of black color. Food and chemical toxicology, Amsterdã, v. 88, p. 9-15, 2015.

CHANDRA, R., RUSTGI, R. Biodegradable Polymers. Progress in Polymer Science, Amsterdã, v. 23, p.1273-1335, 1998.

CHIVRAC, F.; KADLECOVÁ, Z.; POLLET, E.; AVÉROUS, L. Aromatic copolyester-based nano-biocomposites: elaboration, structural characterization and properties. Journal of Polymers and the Environment, Nova Iorque, v.14, p. 393-401, 2006.

COMPANHIA AMBIENTAL DO ESTADO DE SÃO PAULO – CETESB. Planilhas para avaliação. 2013. Disponível em: <http://cetesb.sp.gov.br/areas-contaminadas/planilhas-para-avaliacao/>. Acesso em: 21 março 2018.

CONSÓRCIO AGROBIOFILM. Agrobiofilm: Plásticos Biodegradáveis para Cobertura do Solo. Silvex, 2013.

COSTERTON, J.W.; LEWANDOWSKI, Z.; CALDWELL, D.E.; KORBER, D.R.; LAPPIN-SOCOTT, H.M. Microbial Biofilms. Annual. Review of Microbiology, Palo Alto, v. 49.p.711-745, 1995.

DECODIER, I.; DILLEN, L.; CUNDARI, E.; KIRSCH-VOLDERS. Elimination of micronucleated cells by apoptosis after treatment with inhibitors of microtubules. Mutagenesis, Oxford, v. 17, n. 4, p. 377-344, 2002.

DEUTSCHES INSTITUT FÜR NORMUNG-DIN 38412-30. 1989. German standard methods for the examination of water, waste water and sludge; bio-assays (group L); determining the tolerance of Daphnia to the toxicity of waste water by way of a dilution series (L 30).

DEUTSCHES INSTITUT FÜR NORMUNG-DIN 38412-34. 1997. Determination Of The Inhibitory Effect Of Waste Water On The Light Emission Of Photobacterium Phosphoreum (test Using Preserved Luminescent Bacteria).

DE PAOLI, M.A. Degradação e Estabilização de Polímeros. São Paulo: Editora Artliber, 2008. 286p.

EN 13655. Plastics - Mulching thermoplastic films for use in agriculture and horticulture, 2002.

FALCÃO, G.A.M.; ALMEIDA, T.G.; BARDI, M.A.G.; CARVALHO, L.H.; CANEDO, E.L. PBAT/organoclay composite films – part 2: effect of UV aging on permeability, mechanical properties and biodegradation. Polymer. Bulletin, Berlin, v. 76, n.1, p. 291-301, 2019.

FELISBERTI, MI; SANCHEZ, E. M. S.; SARON, C. Simulador ambiental para envelhecimento acelerado de polímeros. Congresso Brasileiro de Engenharia e Ciência dos Materiais, 14, p. 51401-51409. Disponível em: <http://www.gppol.iqm.unicamp.br/Congressos/14CBECIMAT/TC4 04-014.pdf>. Acesso em 29 de março de 2019.

FENECH, M. The in vitro micronucleous technique. Mutation Research, Amsterdã, v. 455, p. 81-95, 2000.

FENECH, M. Cytokinesis-block micronucleous cytome assay. Nature, Londres, v. 2, p. 1084-1104, 2007.

FENG, S.; WU, D.; LIU, H.; CHEN, C.; LIU, J.; YAO, Z.; XU, J.; ZHANG, M. Crystallization and creep of the graphite nanosheets based poly(butylene adipate-co-terephthalate) biocomposites. Termochimica Acta, Amsterdã, v. 587, p. 72-80, 2014.

FERNANDES, L.L.; FREITAS, C.A.; DEMARQUETTE, N.R.; FECHINE, G.J.M. Estudo do efeito do tipo de polipropileno na fotodegradação da blenda polipropileno/poliestireno de alto impacto. Polímeros, São Carlos, v. 22, n. 1, p. 61-68, 2012.

FERNANDES, T.C.C.; MAZZEO, D.E.C.; MARIN-MORALES, M.A. Mechanism of micronuclei formation in polyploidizated cells of *Allium cepa* exposed to trifluralin herbicide. Pesticide Biochemistry and Physiology, Filadélfia, v. 88, n. 3, p. 252-259, 2007.

FERNANDES, T.C.C.; MAZZEO, D.E.C.; MARIN-MORALES, M.A. Origin of nuclear and chromosomal alterations derived from the action of an aneugenic agent – trifluralin herbicide. Ecotoxicology and Environmental Safety, Filadélfia, v. 72, n. 6, p. 1680-1686, 2009.

FEULGEN, R.; ROSSENBECK, H. Mikros-kopisch-chemischer Nachweis einer Nucleinsäure vom Typus der Thymonucleisäure und die darauf beruhende elective Färbung von Zellkernen in mikroskopischen Präparaten. Hoppe-Seyler's Z. physiologische Chemie, Berlin, v. 135, p.203-248, 1924.

FOTAKIS, G., TIMBRELL, J.A. In vitro cytotoxicity assays: comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride. Toxicology Letters, Amsterdã, v. 160, n. 2, p. 171-177, 2006.

FUKUSHIMA, K; WU, M-H.; BOCCHINI, S.; RASYIDA, A.; YANG, M-C. PBAT based nanocomposites for medical and industrial applications. Materials Science and Engineering C, Amsterdã, v. 32, n. 6, p. 1331-1351, 2012.

FUKUSHIMA, K.; RASYIDA, A.; YANG, M-C. Characterization, degradation and biocompatibility of PBAT based nanocomposites. Applied Clay Science, Amsterdã, v. 80, p.291-298, 2013.

GALEGÁRIO, F.F.; AMARO, M.; WEIHMANN, C.R.; SANHUEZA, R.M.V.; FREIRE, J.M.; AMARANTE, C.V.T.; SANTOS, H.P.; BENDER, R.J.; PALOMBINI, M.C.; PROTAS, J.F.S.; COUTINHO, E.F. 2005. Colheita e pós-colheita. Disponível

em:<https://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Morango/MesaSerraGaucha/colheita.htm>. Acesso em: 29 dezembro 2016.

GAN, Z.; KUWABARA, K.; YAMAMOTO, M.; ABE, H.; DOI, Y. Solid-state structures and thermal properties of aliphatic-aromatic poly(butylene adipate co-terephthalate) copolyesters. Polymer Degradation and Stability, Amsterdã, v. 83, n. 2, p. 289-300, 2004.

GENSLER, R.; PLUMMER, C.J.G; KAUSCH, H-H.; KRAMER, E.; PAUQUET, J-R.; ZWEIFEL, H. Thermo-oxidative degradation of isotactic polypropylene at high temperatures: phenolic antioxidants versus HALS. Polymer Degradation and Stability, Amsterdã, v. 67, n. 2, p.195-208, 2000.

GLEADALL, A.; PAN, J.; ATKINSON, H. A simplified theory of crystallization induced by polymer chain scissions for biodegradable polyesters. Polymer Degradation and Stability, Amsterdã, v. 97, n. 9, p. 1616-1620, 2012.

GLUSKENS, G., KABAMBA, M.S. Photo-oxidation of polymers. Part V: a new chain scission mechanism in polyolefins. Polymer Degradation and Stability, Amsterdã, v. 4, n. 1, p. 69-76, 1982.

GONÇALVES A.O.; FAGNANI M.A.; PEREZ J.G. Efeitos da cobertura do solo com filme de polietileno azul no consumo de água da cultura da alface cultivada em estufa. Engenharia Agrícola, Jaboticabal, v. 25, n. 3, p. 622-631, 2005.

GRANT, W.F. Chromosome aberration assays in Allium. A report of the US Environmental Protection Agency – Gene-Tox Program. Mutation Research, Amsterdã, v. 99, n. 3, p. 273-291, 1982.

GRAY, R.L.; LEE, R.E.; SANDERS, B.M. Low volatility antioxidants for schorch protection of polyurethane foams. Journal of Vinyl & Additive Technology, Hoboken, v. 2., n. 3, p.265-269, 1996.

GUTIÉRREZ-VILLARREAL, M.H.; ZAVALA-BETANCOURT, S.A. A comparative study of photodegradation of two series of cyclic olefin copolymers. International Journal of Polymer Science, 2017. DOI: https://doi.org/10.1155/2017/1870814. Disponível em: https://www.hindawi.com/journals/ijps/2017/1870814/. Acesso em: 18 dezembro 2018.

GYORI, B.M.; VENKATACHALAM, G.; THIAGARAJAN, P.S.; HSU, D.; CLEMENT, M-V. OpenComet: an automated tool for comet assay image analysis. Redox Biology, Amsterdã, v. 2, p. 457-465, 2014.

HARADA, J.; SOUZA, A.G.; MACEDO, J.R.N.; ROSA, D.S. Soil culture: influence of different natural fillers incorporated in biodegradable mulching films. Journal of Molecular Liquids, Amsterdã, v. 273, p. 33-36, 2019.

HARTMANN, A.; AGURELL, E.; BEEVERS, C.; BRENDLER-SCHWAAB, S.; BURLINSON, B.; COLLINS, A.; SMITH, A.; SPEIT, G.; THYBAUD, V.; TICE, R.R. Recommendations for conducting the in vivo alkaline comet assay. Mutagenesis, Londres, v. 18, n. 1, p. 45-51, 2003.

HERNÁNDEZ, A.F.; PARRÓN, T.; TSATSAKIS, A.M.; RAQUENA, M.; ALARCÓN, R.; LÓPES-GUANIDO, O. Toxic effects of pesticide mixtures at a molecular level: their relevance to human health. Toxicology, Shannon, v.307, p. 136-145, 2013.

HERRERO, O.; MARTÍN, J.M.P.; FREIRE, P.F.; LÓPEZ, L.C.; PEROPADRE, A.; HAZEN, M.J. Toxicological evaluation of emerging concerns by use the *Allium cepa* test. Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, Amsterdã, v. 743, n. 1-2, p. 20-24, 2012.

HEYS, K.A.; SHORE, R.F.; PEREIRA, M.G.; JONES, K.C.; MARTIN, F.L. Risk assessment of environmental mixture effects. Royal Society of Chemistry Advances, Londres, v. 4, n. 53, p. 47844-47857, 2016.

HIRSCH, D., KEMMERLING, R.; DAVIS, S., CAMPS, J., MELTZER, P.S.; RIED, T.; GAISER, T. Chromothripsis and focal copy number alterations determine poor outcome in malignant melanoma. Cancer Research, Filadélfia, v. 73, n. 5, p. 1454-1460, 2013.

HINTZCHE, H.; HEMMAN, U.; POTH, A.; UTESCH, D.; LOTT, J.; STOPPER, H. Fate of micronuclei and micronucleated cells. Mutation Research, Amsterdã, v. 771, p. 85-98, 2017.

INNOCENTI, F.D. Biodegradation Behaviour of Polymers in the Soil. In: BASTIOLI,C. (Ed.). Handbook of Biodegradable Polymeric Materials and Their Applications.Valencia: American Scientific Publishers, 2005. p. 57-102.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION – ISO 17556. 2012. Plastics – Determination of the ultimate aerobic biodegradability of plastic materials in soil by measuring the oxygen demand in a respirometer or the amount of carbon dioxide envolved.

KALE, G., AURAS, R., SINGH, S.P. Degradation of commercial biodegradable packages under real composting and ambient exposure conditions. Journal of Polymers and the Environment, Nova Iorque, v. 14, n. 3, p. 317-334, 2006.

KALE, G., AURAS, R., SINGH, S.P., NARAYAN, R. Biodegradability of polylactide bottles in real and simulated composting conditions. Polymer Testing, Amsterdã, v. 26, n. 8, p. 1049-1061, 2007.

KASIRAJAN, S.; NGOUAJIO, M. Polyethylene and biodegradable mulches for agricultural applications: a review. Agronomy for Sustainable Development, Berlim, v. 32, n. 2, p.501-520, 2012.

KAUR, G. Evaluation of DNA damage by methyl methane sulfonate in *Allium cepa* root cells by comet assay. World Journal of Environmental Biosciences, Pune, v. 3, n. 2, p. 109-115, 2014.

KAVA-CELIKER, H.; MALLIKARJUNAN, P.K.; Agricultural applications of biodegradable films. In: GARCIA, M.P.M.; GOMEZ-GUILLÉN, M.C.; LÓPEZ-CABALLERO, M.E.; BARBOSA-CÁNOVAS, G.V (Eds.). Edible films and coatings: fundamentals and applications. Boca Raton: Taylor & Francis, 2017. pp. 363-390.

KELLY, J.H. Permanent human hepatocyte cell line and its use in a liver assist device (LAD) US 5290684 A, 1994.

KIJCHAVENGKUL, T.; AURAS, R.; RUBINO, M.; NGOUAJIO, M.; FERNANDEZ, T. Development of an automatic laboratory-scale respirometric system to measure polymer biodegradability. Polymer Testing, Amsterdã, v. 25, n. 8, p. 1006-1016, 2006.

KIJCHAVENGKUL, T., AURAS, R., RUBINO, M., NGOUAJIO M, FERNANDEZ, R.T. Assessment of aliphatic-aromatic copolyester biodegradable mulch films. Part I: field study. Chemosphere, Londres, v. 71, n. 5, p. 94 -953, 2008a.

KIJCHAVENGKUL, T., AURAS, R., RUBINO, M., NGOUAJIO, M., FERNANDES, R.T. Assessment of aliphatic-aromatic copolyester biodegradable mulch films. Part II: Laboratory simulated conditions. Chemosphere, Londres, v. 71, n. 9, p. 1607-1616, 2008b.

KIJCHAVENGKUL, T., AURAS, R., RUBINO, M., SELKE, S., NGOUAJIO, M., FERNANDEZ, R. Atmospheric and soil degradation of aliphatic-aromatic polyester films. Polymer Degradation and Stability, Amsterdã, v. 95, n. 2, p. 99-107, 2010a.

KIJCHAVENGKUL, T. Design of biodegradable aliphatic aromatic polyester films for agricultural applications using response surface methodology. School of packaging, East Lansing, MI: Michigan State University, 2010b. 277 p. Tese (Doutorado).

KIJCHAVENGKUL, T.; AURAS, R.; RUBINO, M.; SELKE, S.; NGOUAJIO, M.; FERNANDEZ, R.T. Biodegradation and hydrolysis rate of aliphatic aromatic polyester. Polymer Degradation and Stability, Amsterdã, v.95, n. 12, p. 2641-2647, 2010c.

KIJCHAVENGKUL, T., AURAS, R., RUBINO, M., SELKE, S., NGOUAJIO, M., FERNANDEZ, R. Formulation selection of aliphatic aromatic biodegradable polyester film exposed to UV/solar radiation. Polymer Degradation and Stability, Amsterdã, v. 97, n. 10, p.1929-1926, 2011.

KLEIN, E.; LUKES, V.; CIBULKOVA, Z. On the energetic of phenol antioxidants activity. Petroleum & Coal, Bratislava, v. 47, n. 1, p. 33-39, 2005.

KLOOSTERMAN, W.P., CUPPEN, E. Chromothripsis in congenital disorders and cancer: similarities and differences. Current Opinion in Cell Biology, Amsterdã, v. 25, n. 3, p. 341-348, 2013.

KUMARAVEL, T.S.; VILHAR, B.; FAUX, S.P.; JHA, A.N. Comet assay measurements: a perspective. Cell Biology and Toxicology, Dordrecht, v. 25, n. 1, p. 53-64, 2009.

KUTZ, M. Handbook of Environmental Degradation of Materials. Nova Iorque: Willian Andrew Publishing, 2012. 936p.

KUWABARA, K.; GAN, Z.; NAKAMURA, T.; ABE, H.; DOI, Y. Crystalline/amorphous phase structure and molecular mobility of biodegradable poly(butylene adipate-co-terephthalate) and related polyesters. Biomacromolecules, Washington, v. 3, n. 2, p. 390-396, 2002.

KYRIKOU, J., BRIASSOULIS, D.J. Biodegradation of agricultural plastic films: a critical review. Journal of Polymers and Environment, Norwell, v. 15, n. 2, p. 125-150, 2007.

LAMONT, W. Plastic mulches. In: LAMONT, W. (Ed.). Production of vegetables, strawberries, and cut flowers using plasticulture. Ithaca: Natural Resource, Agriculture, and Engineering Service (NRAES), 2004. pp. 9-14.

LESAFRE, N.; BELLAYER, S.; VEZIN, H.; FONTAINE, G.; JIMENEZ, M.; BOURBIGOT, S. Recent advances on the ageing of flame retarded PLA: effect of UV-light and/or relative humidity. Polymer Degradation and Stability, Amsterdã, v. 139, p. 143-164, 2017.

LEME, D.M., MARIN-MORALES, M.A. Allium cepa test in environmental monitoring: a review on its application. Mutation Research, Amsterdã, v. 682, n. 1, p. 71-81, 2009.

LIMAN, R.; GÖKÇE, U.G.; AKYYIL, D.; EREN, Y.; KONUK, M. Evaluation of genotoxic and mutagenic effects of aqueous extract from aerial parts of *Linaria genistifolia* subsp. *Genistifolia*. Brazilian Journal of Pharmacognosy, Curitiba, v. 22, p. 541-548, 2012.

LOVEL, D.P.; OMORI, T. Statistical issues in the use of the comet assay. Mutagenesis, Londres, v. 23, n.3, p. 171-182, 2008.

LYU, S.; SCHLEY, J.; LOY, B.; LIND, D.; HOBOT, C. Kinetics and time-temperature equivalence of polymer degradation. Biomacromolecules, Washington, v. 8, n. 7, p. 2301-2310, 2007.

MA, T., XU, Z., XU, C., McCONNELL, H. The improved Allium/Vicia root tip assay for clastogenicity of environmental pollutants. Mutation Research, Amsterdã, v. 334, n. 2, p. 185-195, 1995.

MANZANO, B.C.; ROBERTO, M.M.; HOSHINA, M.M.; MENEGÁRIO, A.A.; MARIN-MORALES. Evaluation of the genotoxicity of waters impacted by domestic and industrial effluents of a highly industrialized region of São Paulo State, Brazil, by the comet assay in HTC cells. Environmental Science and Pollution Research, Berlim, v. 22, n. 2, p. 1399-1407, 2015.

MARIANI, P.D.S. Estudo da biodegradação da blenda de poli (ϵ-caprolactona) e amido modificado em meios sólido e líquido. Faculdade de Engenharia Química, Campinas, SP: UNICAMP, 2005. 77p. Dissertação (Mestrado).

MARIANI, P.D.S., NETO, A.P.V., SILVA, J.P., CARDOSO, E.J.B.N, ESPOSITO, E., MEI, L.H.I. Mineralization of poly (ε–caprolactone)/adipate modified starch blend in agricultural soil. Journal of Polymer and the Environment, Norwell, v. 15, n. 1, p.19-24, 2007.

MARIN-MORALES, M.A.; HOSHINA, M.M.; HARA, R.Q.; SOMMAGGIO, L.R.D. Eco-genotoxicity in aquatic systems. In: POLONINI, H.; BRAYNER, R. Aquatic Toxicology. Foster city: OMICS Group eBooks, 2016, pp. 1-19.

MARTIN-CLOSAS, L.; BOTET, R.; PELACHO, A.M. An in vitro crop plant ecotoxicity test for agricultural bioplastic constituents. Polymer Degradation and Stability, Amsterdã, v. 108, p. 250-256, 2014.

MAZZEO, D.E.C.; FERNANDES, T.C.C.; MARIN-MORALES, M.A. Cellular damages in the *Allium cepa* test system, caused by BTEX mixture prior and after biodegradation process. Chemosphere, Londres, v. 85, n. 1, p. 13-18, 2011.

MAZZEO, D.E.C.; MATSUMOTO, S. T.; LEVY, C.E.; ANGELIS, D.F.; MARIN-MORALES, M.A. Application of micronucleous test and comet assay to evaluate BTEX biodegradation. Chemosphere, Londres, v. 90, n. 3, p. 1030-1036, 2013.

MEI, L.H.I. Plásticos e bioplásticos: definições, matérias-primas e sustentabilidade. In: MEI, L.H.I (Org.). Bioplásticos: Biodegradáveis & Biobased. Campinas: Editora Unicamp, 2016. pp.21-47.

MELLO, M.L.S.; VIDAL, B.C. A reação de Feulgen. Ciência e cultura, Campinas, v.30, n.6, p. 665-676, 1978.

MOSMANN, T. Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. Journal of Immunological Methods, Amsterdã, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, 1983.

MOTULSKY, H.; BROWN, R. Dectecting outliers when fitting data with nonlinear regression – a new method based on robust nonlinear regression and the false discovery rate. BCM Bioinformatics, Londres, v. 7, p. 123-143, 2006.

MUTHURAJ, R.; MISRA, M.; MOHANTY, A.K. Hydrolytic degradation of biodegradable polyesters under simulated environmental conditions. Journal of Applied Polymer Science,

Hoboken, v. 132, n. 27, p.5-10, 2015.

NATARAJAN, A.T.; DARROUDI, F. Use of human hepatoma cells for in vitro metabolic activation of chemical mutagens/carcinogens. Mutagenesis, Oxford, v .6, n. 5, p. 399- 403, 1991.

NEFIC, H.; MUSANOVIC, J.; METOVIC, A.; KURTESHI, K. Chromosomal and nuclear alterations in root tip cells of *Allium cepa L.* induced by alprazolam. Medical Archives, Poznań, v. 67, n. 6, p. 388-392, 2013.

NEGREIROS M.Z.; COSTA F.A.; MEDEIROS J.F.; LEITÃO V.B.R.M.; BEZERRA NETO F.; ESPÍNOLA SOBRINHO J. Rendimento e qualidade de melão sob lâminas de irrigação e cobertura de solo com filmes de polietileno de diferentes cores. Horticultura Brasileira, Brasília, v. 23, n. 3, p. 772-779, 2005.

NETO, P.F. Avaliação de bioplástico como cobertura do solo para cultivo agrícola. 2014. Disponível em: www.agrisus.org.br/arquivos/relatorio_final_PA1351.pdf. Acesso em: 22 março de 2016.

NEWMAN, M.C., UNGER, M.A. Fundamentals of Ecotoxicology. 2. Ed. Boca Raton: Lewis Publishers, 2002.

NGOUAJIO, M.; AURAS, R.; FERNANDEZ, R.T.; RUBINO, M.; COUNTS, J.W.; KIJCHAVENGKUL, T. T. Field performance of aliphatic-aromatic copolyester biodegradable mulch films in a fresh market tomato production system. HortTechnology, Alexandria, v.18, n. 4, p. 605-610, 2008.

OLIVE, P.L.; BANÁTH, J.P.; DURAND, R.E. Heterogeneity in radiation-induced DNA damage and repair in tumor and normal cells measured using the “comet” assay. Radiation research, Lawrence, v. 122, n. 1, p. 86-94, 1990.

ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT –OECD 406. Skin sensitisation, 1992.

ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT –OECD 471. Bacterial Reverse Mutation Test, 1997.

ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT –OECD 423.

Acute oral toxicity – acute toxic class method, 2001.

ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT –OECD 404. Acute dermal irritation/corrosion, 2002.

ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT –OECD 208. Terrestrial plant test: seedling emergence and seedling growth, 2003.

ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT – OECD 405. Acute eye irritation/corrosion, 2012.

ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT –OECD 487. Guideline for the testing of chemicals, in vivo mammalian alkaline comet assay, 2014a.

ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT –OECD 487. Guideline for the testing of chemicals, in vitro mammalian cell micronucleus test, 2014b.

ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT -OECD. Overview of the set of OECD Genetic Toxicology Test Guidelines and updates performed in 2014-2015, 2017. Disponível em: www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocument pdf/?cote=ENV-JM-MONO(2016)33/rev1&doclanguage=en. Acesso em: 9 setembro 2018.

OSTLING, O., JOHANSON, K.J. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. Biochemical and Biophysical Research Communications, Filadélfia, v. 123, p. 291-298, n. 1, 1984.

PASSOS, F.A. 2013. Como plantar morango. Disponível em: http://revistagloborural.globo.com/vida-na-fazenda/comoplantar/noticia/2013/12/comoplantar-morango.html. Acesso em: 29 de dezembro de 2016.

PADRÓN, A.J.C. Mechanistic aspects of polymer photostabilization. Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry, Amsterdã, v. 49, n. 1-2, p.1-39, 1989.

PALSIKOWSKI, P.A.; KUCHNIER, C.N.; PINHEIRO, I.F.; MORALES, A.R. Biodegradation in soil of PLA/PBAT blends compatibilized with chain extender. Journal of Polymers and the Environment, Nova Iorque, v. 26, n. 1, p. 330-341, 2018a.

PALSIKOWSKI, P.A.; ROBERTO, M.M.; SOMMAGGIO, L.R.D.; SOUZA, P.M.S.; MORALES, A.R.; MARIN-MORALES, M.A. Ecotoxicity evaluation of the biodegradable polymers PLA, PBAT and its blends using *Allium cepa* as test organism. Journal of Polymers and the Environment, Nova Iorque, v. 26, n. 3, p. 938-945, 2018b.

PEELMAN, N.; RAGAERT, P.; DE MEULENAER, B.; ADONS, D.; PEETERS, R.; CARDON, L.; IMPE, F.V.; DEVLIEGHERE, F. Application of bioplastics for food packaging. Trends in Food Science & Technology, Londres, v. 32, n. 2, p. 128-141, 2013.

PEREIRA, B.; GONÇALVES, A.R.; COSTA, R.S.; LIMA, F.J.L.; PEREIRA, S.V.; SOUZA, J.G.; MARTINS, F.R.; RÜTHER, R. Atlas Brasileiro de Energia Solar. São José dos Campos: Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais- INPE, 2017.

PERZ, V., BAUMSHLAGER, A.; BLEYMAIER, K.; ZITZENBACHER, S., HROMIC, A.; STEINKELLNER, G., PAIRITSCH, A.; LYSKOWSKI, A.; GRUBER, K.; SINKEL, C.; KUPER, U.; RIBITSCH, D.; GUEBITZ, G.M. Hydrolysis of synthetic polyesters by *Clostridium botulinum* esterases. Biotechnology and Bioengineering, Hoboken, v. 113, n. 5, p. 1024-1034, 2016a.

PERZ, V.; BLEYMAIER, K.; SINKEL, C.; KUEPER, U.; BONNEKESSEL, M.; RIBITSCH, D.; GUEBITZ, G.M. Substrate specificities of cutinases on aliphatic-aromatic polyesters and their model substrates. New Biotechnology, Amsterdã, v. 33, n. 2, p. 295-304, 2016b.

PING, T.; ZHOU, Y.; HE, Y.; TANG, Y.; YANG, J.; AKRAM, M.Y.; NIE, J. Preparation and characterization of yellowing resistance and low volume shrinkage of fluorinated polysiloxane urethane acrylate. Progress in Organic Coatings, Amsterdã, v. 97, p.74-81, 2016.

PINHEIRO, L.A.; CHINELATTO, M.A.; CANEVAROLO, S.V. The role of chain scission and chain branching in high density polyethylene during thermo-mechanical degradation. Polymer Degradation and Stability, Londres, v. 86, n. 3, p.445-453, 2004.

POVEDA, P.N.S. Estudo do efeito de nanopartículas de carbonato de cálcio, dióxido de titânio e óxido de zinco nas propriedades dos termoplásticos de polietileno de baixa densidade linear e copoliéster alifático aromático, submetidos à radiação ultravioleta. São Paulo: Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares da USP, 2015. 141 p. Tese (Doutorado).

PRIAC, A.; PIERRE-MARIE, B.; CRINI, G. Treated wastewater phytotoxicity assessment using Lactuca sativa: focus on germination and root elongation test parameters. Comptes Rendus Biologies, Paris, v. 340, n. 3, p. 188-194, 2017.

QURESHI, H.; ARSHAD, M.; BIBI, Y. Toxicity assessment and phytochemical analysis of *Broussonetia papyrifera* and *Lantana camara*: Two notorious invasive plant species. Journal of Biodiversity and Environmental Sciences, Rajshahi, v. 5, n. 2, p. 508-517, 2014.

QI, X.; BLIZANAC, B.; DUPASQUIER, A.; OLJACA, M.; LI, J.; WINTER, M. Understanding the influence of conductive carbon additives surface area on the rate performance of $LiFePO_4$ cathodes for lithium ion batteries. Carbon, Londres, v. 64, p.334-340, 2013.

RABEK, J.F. Photostabilization of polymers: principles and applications. Londres: Elsevier Applied Science, 1990, 594 p.

RABEK, J.F. Polymer photodegradation: mechanism and experimental methods. New York: Chapman & Hall, 1995. 597p.

RAGAZZO, P.; FERETTI, D; MONARCA, S.; DOMINICI, L.; CERETTI, E.; VIOLA, G.; PICCOLO, V.; CHIUCCHINI, N.; VILLARINI, M. Evaluation of cytotoxicity, genotoxicity and apoptosis of wastewater before and after disinfection with performic acid. Water Research, Londres, v. 116, 2017.

RANK, J.; NIELSEN, M.H. Allium cepa anaphase-telophase root tip chromosome aberration assay on N-methyl-N-nitrosourea, maleic hydrazide, sodium azide, and ethyl methanesulfonate. Mutation Research, Amsterdã, v. 390, p. 121-127.

REISINGER, K.; BLATZ, BRINKMANN, J.; DOWNS, T.R.; FISCHER, A.; HENKLER, F.; HOFFMANN, S.; KRUF, C.; LIEBSCH, M.; LUCH, A.; PIROW, R.; REUS, A.A.; SCHULZ, M.; PFUHLER, S. Validation of the 3D skin comet assay using full thickness skin models: transferability and reproducibility. Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, Amsterdã, v. 827, p. 27-41, 2018.

REN, N.; ATYAH, M.; CHEN, W-Y.; ZHOU, C-H. The various aspects of genetic and epigenetic toxicology: testing methods and clinical applications. Journal of Translational Medicine, Berlim, v. 15, p. 1-13, 2017.

RIVATON, A., GARDETTE, J.L. Photo-oxidation of aromatic polymers. Die Angewandte Makromolekulare Chemie, Weinheim, v. 261, n. 1, p. 173-188, 1998.

ROBERTSON, G.L. Food Packaging: principles and practice. Nova Iorque: Marcel Dekker Inc., 1993, 676p.

RYCHTER, P.; KAWALEC, M.; SOBOTA, M.; KURCOK, P.; KOWALCZUC, M. Study of aliphatic-aromatic copolyester degradation in sandy soil and its ecotoxicological impact. Biomacromolecules, Washington, v. 11, p. 839-847, 2010.

RZEPNA, M.; PRZYBYTNIAK, G.; SADLO, J. Radiation degradation and stability of PBAT: copolymer of aromatic and aliphatic esters. Journal of Applied Polymer Science, 2018. DOI: 10.1002/APP.46682. Disponível em: https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/app.46682. Acesso em: 27 de julho de 2019.

SADI, R. K.; FECHINE, G.J.M.; DEMARQUETTE, N.R. Effect of Prior Photodegradation on the biodegradation of polypropylene/poly(3- hydroxybutyrate) blends. Polymer Engineering and Science, Easton, v. 53, n. 10, p.2109-2122, 2013.

SAADI, Z., CESAR, G., BEWA, H. Fungal degradation of poly(butylene adipate-co-terephthalate) in soil and in compost. Journal of Polymers and the Environment, Nova Iorque, v. 21, n. 4, p. 893-901, 2013.

SAIKUMAR, P., DONG, Z., MIKHAILOV, V., DENTON, M., WEINBERG, J.; VENKATACHALAM, M.A. Apoptosis: definition, mechanisms and relevance to disease. American Journal of Medicine, Bridgewater, v. 107, n. 5, 489–506, 1999.

SALVADORI, D.M.F., RIBEIRO, L.R., FENECH, M. Teste de micronúcleo em células humanas *in vitro*. In: RIBEIRO, L.R., SALVADORI, D.M.F., MARQUES, E.K. Mutagênese ambiental. Canoas: ULBRA, 2003. p. 201-222.

SANCHEZ, E.M.S.; FELISBERTI, M.I.; COSTA, C.A.R.; GALEMBECK, F. Avaliação da degradação térmica e fotooxidativa do ABS para fins de reciclagem. Polímeros: Ciência e Tecnologia, v. 13, n. 3, São Carlos, p.166-172, 2003.

SANCHEZ, E.M.S. Ageing of PC/PBT blend: mechanical properties and recycling possibility. Polymer Testing, Londres, v. 26, n. 3, p.378-387, 2007.

SCARASCIA-MUGNOZZA, G., SCHETTINI, E., VOX, G., MALINCONICO, M., IMMIRZI, B., PAGLIARA, S. Mechanical properties decay and morphological behavior of biodegradable films for agricultural mulching in real scale experiment. Polymer Degradation and Stability, Londres, v. 91, n. 11, p. 2801-2808, 2006.

SERRANO-LUIZ, H.; MARTÍN-CLOSAS, L.; PELACHO, A.M. Application of an in vitro plant ecotoxicity test to unused biodegradable mulches. Polymer Degradation and Stability, Londres, v.158, p. 102-110, 2018.

SEVERINI, F., GALO, R., IPSALE, S. Environmental degradation of stabilized LDPE. Later Stages. Polymer Degradation and Stability, Londres, v. 17, n. 1, p.57-64, 1987.

SIEGENTHALER, K.O.; KÜNKEL, A.; SKUPIN, G.; YAMAMOTO, M. Ecoflex® and Ecovio® : biodegradable performance-enabling plastics. In: RIEGER, B.; KÜNKEL, A.; COATES, G.; REICHARDT, R.; DINJUS, E.; ZEVACO, T. (Eds.). Synthetic Biodegradable Polymers. Advances in Polymer Science. Berlim: Springer, 2012, pp. 91-136, 2012.

SILVEIRA, G.L.; LIMA, M.G.F.; REIS, G.B.; PALMIERI, M.J.; ANDRADE-VIEIRA, L.F. Toxic effects of environmental pollutants: comparative investigation using *Allium cepa L.* and *Lactuca sativa L.* Chemosphere, Londres, v. 178, p. 359-367, 2017.

SHAH, A.A.; HASAN, F.; HAMEED, A.; AHMED, S. Biological degradation of plastics: a comprehensive review. Biotechnology Advances, Filadélfia, v. 26, n. 3, p. 246-265, 2008.

SCHERLIESS, R. The MTT assay as tool to evaluate and compare excipient toxicity *in vitro* on respiratory epithelial cells. International Journal of Pharmaceutics, v. 411, p. 98-105, 2011.

SHLYAPINTOKH, V. Photochemical conversion and stabilization of polymers. New York: Hanser, 1984. 484p.

SIKORSKA, W.; RYDZ, J.; WOLNA-STYPKA, K.; MUSIOL, M.; ADAMUS, G. KWIENCIEN, I.; JANECZEK, H.; DUALE, K.; KOWALCZUK, M. Forensic engineering of advanced polymeric materials – part V: prediction studies of aliphatic-aromatic copolyester and polylactide commercial

blends in view of potential applications as compostable cosmetic packages. Polymers, Basel, v. 9, n. 7, p. 257-272, 2017.

SINTIM, H.Y.; FLURY, M. Is Biodegradable Plastic Mulch the Solution to Agriculture's Plastic Problem? Environmental Science & Technology, Washington, v. 51, n. 3, p.1068-1069, 2017.

SHOUMAN. Agricultural film. Disponível em: http://www.shouman.com/agricultural.html: Acesso em: 28 setembro 2018.

SOBRERO, M.C.; RONCO, A. Ensayo de toxicidad aguda con semillas de lechuga (Lactuca sativa L.). In: G. C. Morales (ed.), Ensayos Toxicológicos y Métodos de Evaluación de Calidad de Agua: estandarización, intercalibración, resultados y aplicaciones. Mexico: IMTA, 2004. pp. 71-79.

SOMMAGGIO, L.R.D.; MAZZEO, D.E.C.; PAMPLONA-SILVA, M.T.; MARIN-MORALES, M.A. Evaluation of the potential agricultural use of biostimulated sewage sludge using mammalian cell culture assays. Chemosphere, Londres, v. 199, p.10-15, 2018a.

SOMMAGGIO, L.R.D.; MAZZEO, D.E.C.; SANT' ANNA, D.A.S.; LEVY, C.E.; MARIN-MORALES, M.A. Ecotoxicological and microbiological assessment of sewage sludge associated with sugarcane bagasse. Ecotoxicology and Environmental Safety, v. 147, p. 550-557, 2018b.

SOUZA, P.M.S.; MORALES, A.R.; MARIN-MORALES, M.A.; MEI, L.H.I. PLA and montmorilonite nanocomposites: properties, biodegradation and potential toxicity. Journal of Polymers and the Environment, Nova Iorque, v. 21, n. 3, p. 738-759, 2013a.

SOUZA, P.M.S., CORROQUÉ, N.A., MORALES, A.R., MARIN-MORALES, M.A., MEI, L.H. PLA and organoclays nanocomposites: degradation process and evaluation of ecotoxicity, using *Allium cepa* as test organism. Journal of Polymers and the Environment, Nova Iorque, v. 21, n. 4, p. 1052-1063, 2013b.

STEPHENS, P.J.; GREENMAN, C.D.; FU, B.; FENGTANG, Y.; BIGNELL, G.R.; MUDIE, L.J.; PLEASANCE, E.D.; LAU, K.W.; BEARE, D.; STEBBINGS, L.A.; MCLAREN, S.; LIN, M-L.; MCBRIDE, D.J.; VARELA, I.; NIK-ZAINAL, S.; LEROY, C.; JIA, M.; MENZIES, A.; BUTLER, A.P.; TEAGUE, J.W.; QUAIL, M.A.; BURTON, J.; SWERDLOW, H.; CARTER, N.P.; MORSBERGER, L.A.; IACOBUZIO-DONAHUE, C.; FOLLOWS, G.A.; GREEN, A.R.; FLANAGAN, A.M.; STRATTON, P.A.F.; CAPPBELL, P.J. Massive genomic rearrangement

acquired in a single catastrophic event during cancer development. Cell, Filadélfia, v. 144, n. 1, p. 27-40, 2011.

STLOUKAL, P.; VERNEY, V.; COMMEREUC, S.; RYCHLY, J.; MATISOVA-RYCHLÁF, L.; PIS, V.; KOUTNY, M. Assessment of the interrelation between photooxidation and biodegradation of selected polyesters after artificial weathering. Chemosphere, Londres, v. 88, n. 10, p. 1214-1219, 2012.

STUDEBAKER, M.L.; BEATTY, J.R. The oxidative hardening of SBR. Rubber Chemistry and Technology, Akron, v. 45, n. 2, p. 450-466, 1972.

STUHLFAUTH, T. Ecotoxicological monitoring of industrial effluents. In: RICHARDSON, M (Ed.). Environmental Toxicology Assessment. Londres: Taylor & Francis,1995. pp. 187-198.

SVOBODA, P.; DVORACKOVA, M.; SVOBODOVA, D. Influence of biodegradation on crystallization of poly (butylene adipate-co-terephthalate). Polymers for Advanced Technology. Hoboken, v. 30, n. 3, p.552-562, 2019.

THUMARAT, U.; KAWABATA, T.; KAWABATA, T.; NAKAJIMA, M.; NAKAGIMA, H.; SUGIYAMA, H.; YAZAKI, K.; TADA, T.; WAKU, T.; TANAKA, N.; KAWAI, F. Comparison of genetic structures and biochemical properties of tandem cutinase-type polyesterases from *Thermobifida alba* AHK119. Journal of Bioscience and Bioengineering, Amsterdã, v. 120, n. 5, p. 491-497, 2015.

TICE, R.R.; AGURELL, E.; ANDERSON, D.; BURLINSON, B.; HARTMANN, A.; KOBAYASHI, H.; MIYAMAE, Y.; ROJAS, E.; RYU, J.C.; SASAKI, Y.F. Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. Environmental and molecular mutagenesis, Wilmington, v. 35, n. 3, p. 206-221, 2000.

TOUCHALEAUME, F.; MARTIN-CLOSAS, L.; ANGELLIER-COUSSY, H.; CHEVILLARD, A.; CESAR, G.; GONTARD, N.; GASTALDI, E. Performance and environmental impact of biodegradable polymers as agricultural mulching films. Chemosphere, Londres, v. 144, p. 433-439, 2016.

VENTURA-CAMARGO, B.V.; ANGELIS, D.F.; MARIN-MORALES, M.A. Assessment of the cytotoxic, genotoxic and mutagenic effects of the commercial black dye in *Allium cepa* cells before

and after bacterial biodegradation treatment. Chemosphere, Londres, v. 161, p. 325-332, 2016.

VERHEYEN, G.R.; DEUN, K.V.; MIERT, S.V. Testing the Mutagenicity Potential of Chemicals. Journal of Genetics and Genome Research, Amsterdã, v. 4, n. 1, p.1-11, 2017.

WALLACE, P.W.; HAERNVALL, K.; RIBITSCH, D.; ZITZENBACHER, S.; MATTHIAS, S.; STEINKELLNER, G.; GRUBER, K.; GUEBITZ, G.M.; BIRNER-GRUENBERGER, R. PpEst is a novel PBAT degrading polyesterase identified by proteomic screening of *Pseudomonas pseudoalcaligenes*. Applied Microbiology and Biotechnology, Berlim, v. 101, n. 6, p. 2291-2303, 2017.

WANG, J.; WANG, J.; WANG, G.; ZHU, L.; WANG, J. DNA damage and oxidative stress induced by imidacloprid exposure in the earthworm *Eisenia fetida*. Chemosphere, Amsterdã, v. 144, p. 510-517, 2016.

WILDE, B.; DECONINCK, S. Expert Statement. (Bio)degradable mulching films. Gent: OWS, 2017. Disponível em: http://www.ows.be/publication/expert-statement-biodegradable-mulching-films/. Acesso em: 10 outubro 2018.

WITT, U.; EINING, T.; YAMAMOTE, M.; KLEEBERG, I.; DECWER, W.-D.; MÜLLER, R.-J. Biodegradation of aliphatic-aromatic copolyesters: evaluation of the final biodegradability and ecotoxicological impact of degradation intermediates. Chemosphere, Amsterdã, v. 44, n. 2, p. 289-299, 2001.

WIKLUND, S.J.; AGURELL, E. Aspects of design and statistical analysis in the Comet assay. Mutagenesis, Londres, v. 18, n. 2, p. 167-176, 2003.

YANG, N.; SUN, Z-X.; FENG, L-S.; CHI, D-C.; MENG, W-Z.; HOU, Z-Y.; BAI, W.; LI, K-Y. Plastic film mulching for water-efficient agricultural applications and degradable films materials development research. Materials and Manufacturing Processes, Nova Iorque, v. 30, n. 2, p. 143-154, 2015.

YANUARYSKA, R.D. Comet assay assessment of DNA damage in buccal mucosa cells exposed to X-Rays via panoramic radiography. Journal of Dentistry Indonesia, Jacarta, v. 25, n. 1, p. 53-57, 2018.

YURI, J.E.; COSTA, N.D.; PINTO, J.M.; CORREIA, R.C. Uso de cobertura plástica no cultivo do meloeiro. Disponível em: https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/124972/INT118.pdf. Acesso em: 10 de outubro 2018.

ZUNSTEIN, M.T.; SCHINTLMEISTER, A.; NELSON, T.F.; BAUMGARTNER, R.; WOEBKEN, D.; Biodegradation of synthetic polymers in soils: tracking carbon into CO_2 and microbial biomass. Science Advances, 2018. DOI: https://doi.org/10.1126/sciadv.aas9024. Disponível em: http://advances.sciencemag.org/content/4/7/eaas9024. Acesso em: 19 dezembro 2018.

APÊNDICE A - PROCEDIMENTOS E SOLUÇÕES PARA MANUTENÇÃO DAS CÉLULAS HEPG2/C3A

1. Soluções para manutenção de células

1.1. Meio DMEM incompleto

Em um balão de 1 L, dissolver 9,77 g de meio DMEM (marca: Cultilab), 2,2 g de bicarbonato de sódio (marca: Qhemis) e 4,5 g de glicose (marca: Impex) em 800 mL de água ultrapura e agitar até completa dissolução. Adicionar 1 mL da solução de antibiótico-antimocótico (penicilina 10.000 U.I./mL/estreptomicina 10 mg/mL, marca: Cultilab) e completar o volume para 1000 mL. A depender do pH obtido utilizar solução de hidróxido de sódio ou ácido clorídrico para corrigir para 7,2. Filtrar em membrana estéril de porosidade 0,22 µm e aliquotar em frascos de vidro de 100 mL. Armazenar os frascos na faixa de 2 a 6 ºC em geladeira.

1.2. Meio de cultura DMEM completo

Adicionar soro bovino fetal (marca: Cultilab) estéril ao meio DMEM em uma proporção de 10%. Armazenar os frascos de vidro com meio DMEM em geladeira.

1.3. Solução de tampão fosfato salino (PBS)

Dissolver, em balão volumétrico, 0,2 g de cloreto de potássio (marca: Êxodo científica), 0,2 g de fosfato monobásico de potássio (marca: Synth), 8,0 g de cloreto de sódio (marca: LS Chemicals) e 1,15 g de fosfato dibásico de sódio anidro (marca: Nuclear) em 1000 mL de água ultrapura. Manter sob agitação até a completa solubilização. Corrigir o pH para 7,4 com solução de hidróxido de sódio ou ácido clorídrico. Aliquotar a solução de PBS em frascos de vidro de 250 mL e autoclavar por 20 minutos a 120 ºC/1 atm. Armazenar a solução em geladeira.

1.4. Tripsina EDTA 0,25%

Esterilizar a solução de Tripsina EDTA 0,25% (marca: Sigma) por filtração em membrana com tamanho de poro de 0,22 µm e aliquotar em frascos de vidro pequenos (50 mL). Armazenar os frascos de geladeira.

1.5. Solução de congelamento

Preparar o soro com complemento inativado. Para isso, descongelar frascos 50 mL de soro bovino fetal (marca: Cultilab) armazenados em freezer (previamente aliquotados) e posteriormente colocar a 56 °C em banho-maria por 1 hora, agitando suavemente a cada 15 minutos. Retirar o soro do banho-maria e esfriar em temperatura ambiente.

Em fluxo laminar, adicionar 10% de dimetilsulfóxido estéril (marca: Êxodo científica) ao volume desejado de soro com o complemento inativado. Armazenar a solução a -20 ºC (freezer).

2. Manutenção das células C3A

2.1. Repique

Antes de iniciar o manuseio das células, ligar o banho-maria a 37 ºC e colocar o meio DMEM completo, a solução de PBS e a tripsina 0,25%, que estavam armazenados na geladeira. Passar álcool 70% no fluxo e ligar a UV por 20 minutos. Decorrido este tempo, pode-se iniciar o manuseio das células no fluxo.

Retirar o frasco de cultura da estufa de CO_2. No fluxo, desprezar o meio e lavar 2 vezes com 5 mL de PBS. Retirar o excesso com auxílio de pipeta Pasteur. Adicionar 500 µL de tripsina 0,25%, fechar e deitar o frasco para cobrir toda a superfície de células confluentes. Colocar novamente na estufa a 37 ºC por 5 minutos. Decorrido os 5 minutos, retirar o frasco da estufa e desprender as células com leves batidas no fundo do frasco. Após o desprendimento, inativar a tripsina, imediatamente, com 1,5 mL de meio DMEM completo. Passar a suspensão celular por seringa de insulina estéril de 1 mL para obtenção de células isoladas. Dividir as células em novos frascos de cultura com auxílio de pipeta Pasteur. Cada frasco de cultura confeccionado deve conter 5 mL de meio DMEM completo.

2.2. Congelamento das células

Antes de iniciar o manuseio das células, ligar o banho-maria a 37 ºC e colocar o meio DMEM completo, a solução de PBS e a tripsina 0,25%, que estavam armazenados na geladeira. A solução de congelamento deve ser descongelada a temperatura ambiente e não deve ser colocada no banho-maria. Passar álcool 70% no fluxo e ligar a UV por 20 minutos. Decorrido este tempo, pode-se iniciar o manuseio das células no fluxo.

Retirar o frasco de cultura da estufa de CO_2 e, no fluxo, desprezar o meio e lavar 2 vezes com 5 mL de PBS. Retirar o excesso com pipeta Pasteur. Adicionar 500 µL de tripsina 0,25%, fechar e deitar o frasco. Colocar novamente na estufa a 37 ºC por 5 minutos. Decorrido os 5 minutos, retirar o frasco da estufa e desprender as células com leves batidas no fundo do frasco. Após o desprendimento acrescentar 1,5 mL de meio DMEM completo para inativação da tripsina.

Passar a suspensão celular por seringa de insulina estéril de 1 mL para obtenção de células isoladas. Transferir a suspensão celular para tubo Falcon estéril e centrifugar por 10 minutos a 1500 rpm. Após a centrifugação, desprezar o sobrenadante e ressuspender o pellet com 2 mL da solução de congelamento. Dividir o conteúdo do tubo Falcon em 2 tubos criogênicos. Imediatamente, levar os tubos criogênicos para o freezer -80 ºC por 10 horas. Após este período, acondicionar os tubos criogênicos em nitrogênio líquido.

2.3. Descongelamento das células

Antes de iniciar o manuseio das células ligar o banho-maria a 37 ºC e colocar o meio DMEM completo, que estava armazenado na geladeira. Passar álcool 70% no fluxo e ligar a UV por 20 minutos. Decorrido este tempo, pode-se iniciar o manuseio das células no fluxo.

Remover o tubo criogênico do nitrogênio líquido e colocá-lo em banho-maria a 37 ºC apenas até descolar o pellet (não esperar ficar totalmente descongelado). Verter o pellet de células ainda congelado em 10 mL de meio DMEM completo. Homogeneizar a suspensão celular com auxílio de pipeta Pasteur e centrifugar por 10 minutos a 1500 rpm. Desprezar o sobrenadante e ressuspender o pellet em 1 mL de meio DMEM completo. Transferir a suspensão celular para um frasco de cultura com 9 mL de meio DMEM completo. Incubar em estufa a 37 ºC com 5 % de CO_2.

APÊNDICE B - SOLUÇÕES PARA O ENSAIO DO COMETA

1. Agarose Comum

Em um béquer, adicionar 3 g de agarose comum (UltraPure™Agarose, marca: Invitrogen) e 200 mL de PBS. Ferver em forno microondas até a completa dissolução da agarose. Caso esta não seja utilizada imediatamente para a pré-gelatinização das lâminas, aguardar o resfriamento e a solidificação da mesma para o posterior armazenamento em geladeira.

Esta solução deve ser utilizada para a pré-gelatinização das lâminas. Para isso, derreter a agarose armazenada em forno microondas e colocar em banho-maria a 60 °C. Mergulhar as lâminas na agarose até atingir a parte fosca e remover o excesso do lado oposto com auxílio de papel higiênico. Depositar as lâminas pré-gelatinizadas em uma superfície reta para a secagem. Deixar secar e armazenar as lâminas em geladeira.

2. Agarose LMP (Low Melting Point)

Em um béquer, adicionar 0,25 g de agarose de baixo ponto de fusão- LMP (marca: Invitrogen) e 50 mL de PBS. Ferver em forno microondas até a completa dissolução da agarose. Aliquotar em frascos de 5 mL, aguardar a solidificação e armazenar em geladeira.

3. Solução Lise Estoque

Em um béquer, dissolver 73,05 g de cloreto de sódio, 18,6 g de EDTA-tritriplex (marca: Dinâmica); 0,6 g de Tris (marca: Sigma) em 445 mL de água ultrapura. Para a completa solubilização, o pH foi corrigido para 10 com a adição de solução de hidróxido de sódio. Armazenar a solução lise estoque a temperatura ambiente em frasco âmbar.

4. Solução Lise Final

Em uma proveta, adicionar 1 mL de Triton X-100 (marca: Impex), 10 mL de dimetilsulfóxido (marca: Êxodo científica) e 89 mL da solução de lise estoque. Com auxílio de um papel parafilme agitar a solução. Transferir para a cubeta de vidro horizontal e armazenar em geladeira.

6. EDTA 200 mM

Dissolver, em um béquer, 7,45 g de EDTA-tritriplex (marca: Dinâmica) em 100 mL de água ultrapura. Corrigir o pH 10,0 com a adição de solução de hidróxido de sódio.

7. NaOH 10N

Dissolver, em um béquer, 40 g de hidróxido de sódio (marca: Impex) em 100 mL de água ultrapura. Armazenar a temperatura ambiente em frasco plástico, protegido de luz.

8. Tampão de eletroforese

Em um béquer, adicionar 5 mL de EDTA-tritriplex 200 mM, 30 mL de NAOH 10N e 1000 mL de água ultrapura. Verificar se o pH está maior que 13. Preparar 1,5 L na hora da utilização. O tampão deve estar gelado no momento do uso, para isso reservar água ultrapura no dia anterior à corrida.

9. Solução de Neutralização

Dissolver, em um béquer, 24,25 g de Tris (marca: LGC Biotecnologia) em 475 mL de água ultrapura. Corrigir o pH para 7,5 com solução de ácido clorídrico. Armazenar em temperatura ambiente ou em geladeira, em frasco de vidro.

10. Solução de GelRed

Em um frasco recoberto com papel alumínio, adicionar 15 µL da solução de GelRed (marca: Biotium), 5 mL de solução de cloreto de sódio-NaCl 1M (preparada pela dissolução de 58,43 g de NaCl - marca: LS Chemicals – em 1 L de água ultrapura) e 45 mL de água ultrapura.

APÊNDICE C - SOLUÇÕES PARA O ENSAIO DO MICRONÚCLEO

1. Citocalasina B solução mãe (2 mg/ml)

Em fluxo laminar e utilizando um frasco estéril, adicionar 5 mg de citocalasina B (marca: Sigma) em 2,5 mL de dimetilsulfóxido (marca: Êxodo científica) estéril. Homogeneizar e fechar o frasco. Recobrir o frasco com papel alumínio, identificar e armazenar a -20 ºC (*freezer*).

2. Citocalasina B solução uso (350 µg/ml)

Em um frasco de congelamento estéril, adicionar o 1,65 mL de PBS estéril e 350 µL da solução mãe de citocalasina B. Fechar e recobrir o frasco com papel alumínio, identificar e armazenar a -20 ºC (*freezer*).

3. Solução Hipotônica de Citrato de Sódio 0,01%

Em um béquer, dissolver o 1 g de citrato de sódio (marca: Impex) em 100 mL de água deionizada. Agitar até completa solubilização. Armazenar em frasco de 100 mL na geladeira. A solução de citrato de sódio 0,01% deve ser utilizada gelada na colheita do teste do micronúcleo. Esta solução hipotônica incha as células facilitando a visualização dos micronúcleos.

4. Fixador Carnoy

Em proveta misturar 3 partes de álcool etílico absoluto (marca: Synth) para 1 parte de ácido acético glacial (marca: LS Chemicals). Preparar no momento do uso.

6. Giemsa

Em frasco âmbar, misturar 3 g de Giemsa (marca: Shynth) com 162 mL de glicerina (marca: Shynth). Deixar em banho-maria a 60 ºC *overnight*. Posteriormente, adicionar 252 mL de metanol (marca: Ecibra) e homogeneizar. Filtrar e armazenar em frasco de vidro âmbar em geladeira. Em uma proveta, misturar 50 mL de água com 2,5 mL da solução de Giemsa. Esta solução deve ser preparada no momento da utilização. Para a coloração, cobrir as lâminas com o corante por 5 minutos. Lavar com água corrente e deixar secar a temperatura ambiente.

APÊNDICE D - CURVAS TERMOGRAVIMÉTRICAS E DERIVADAS DOS ADITIVOS TINUVIN 783 E VITAMINA E

Figura 1 - Curva termogravimétrica do aditivo Tinuvin 783.

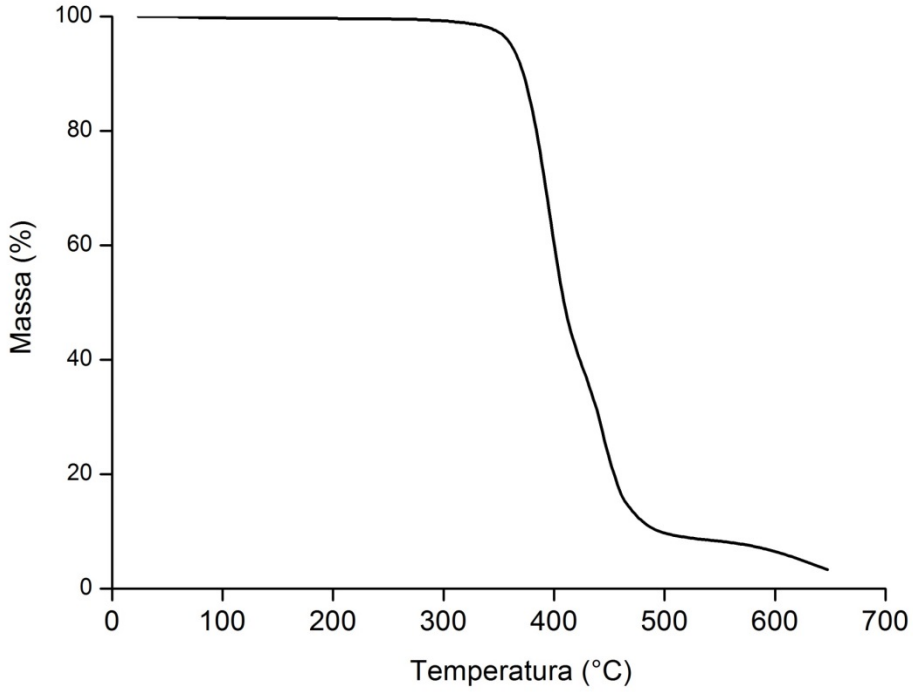
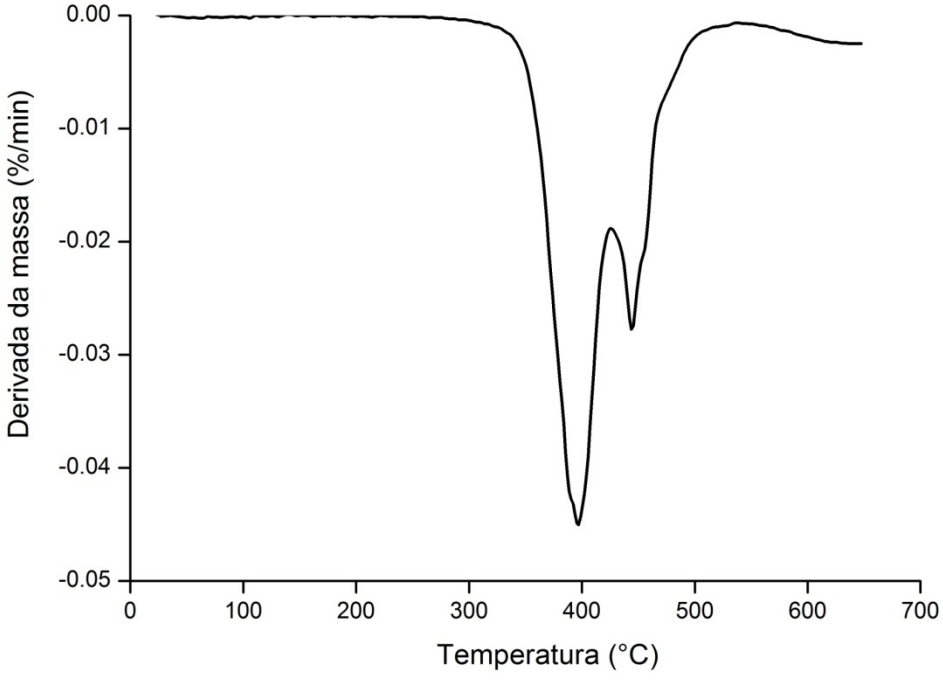


Figura 2- Derivada da curva termogravimétrica do aditivo Tinuvin 783.



Fonte: O autor (2019)

Figura 3- Curva termogravimétrica do aditivo vitamina E.

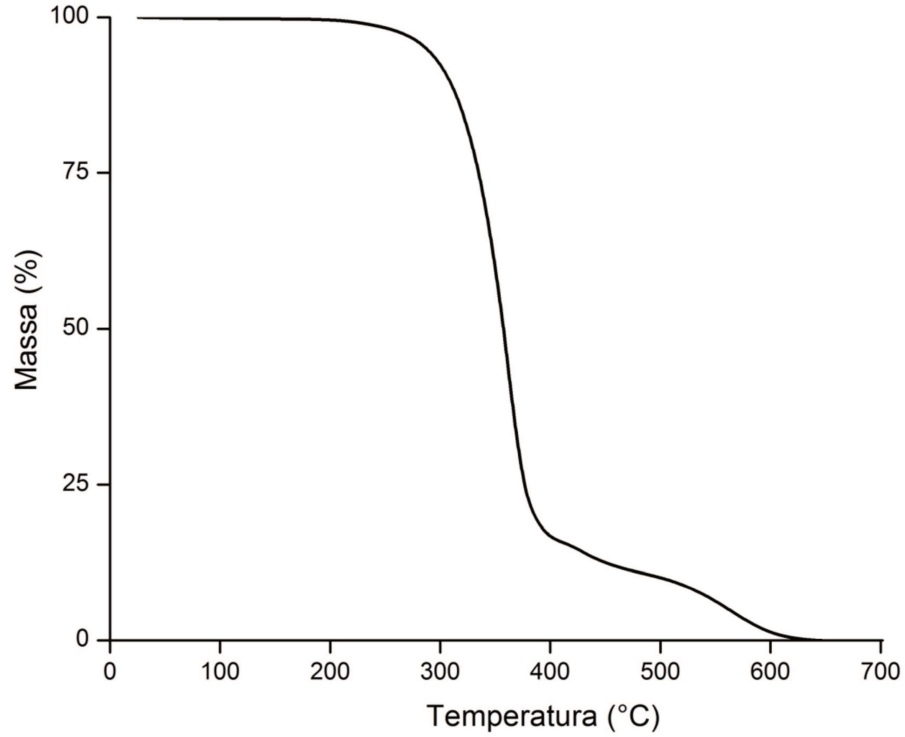
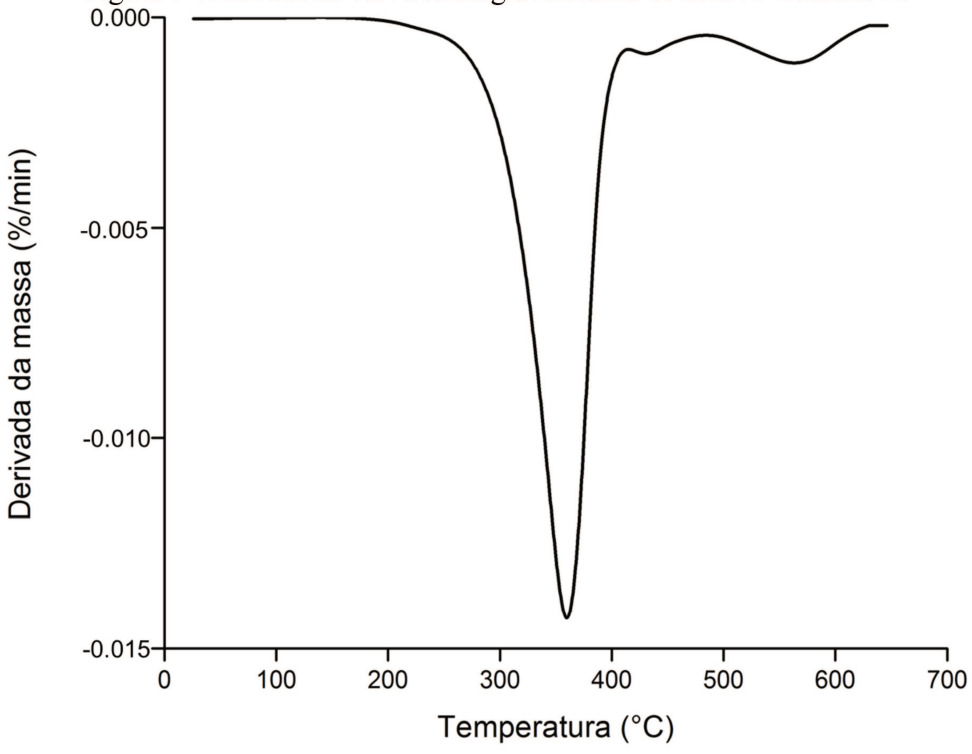


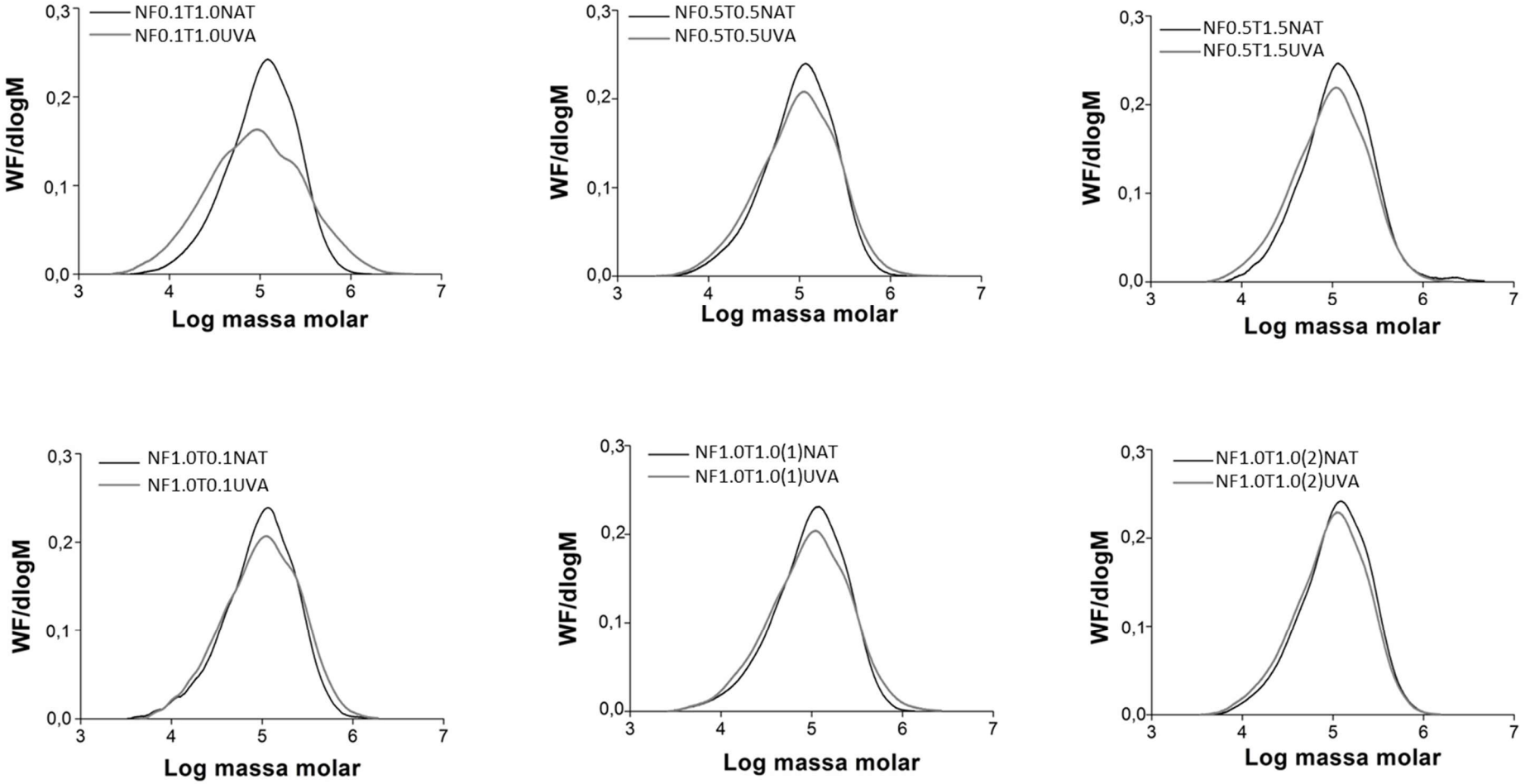
Figura 4- Derivada da curva termogravimétrica do aditivo vitamina E.



Fonte: O autor (2019)

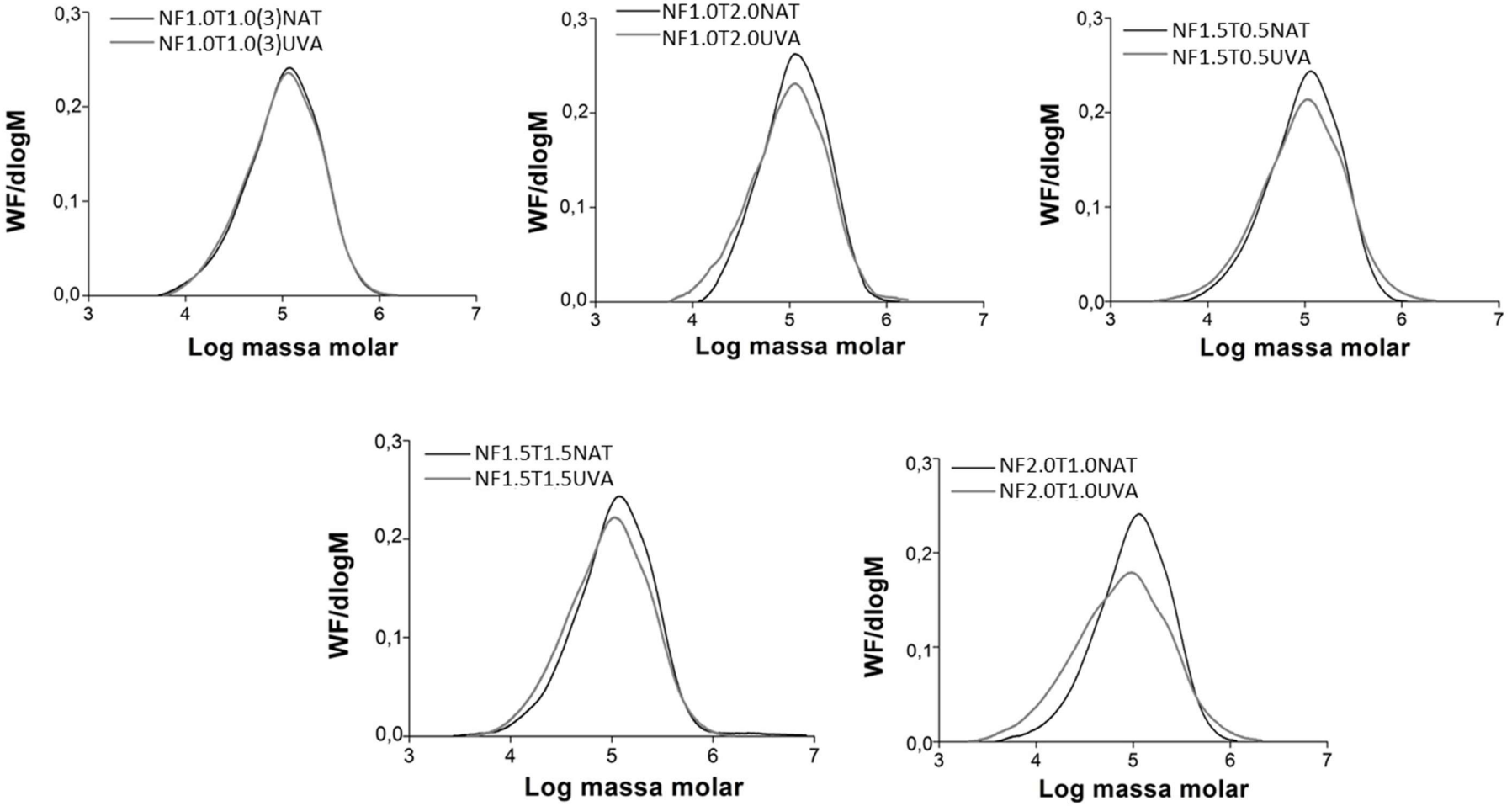
APÊNDICE E - CURVAS DE DISTRIBUIÇÃO DE MASSA MOLAR

Figura 1 - Curvas de distribuição de massa molar de amostras de PBAT com negro de fumo e HALS, antes e depois do envelhecimento acelerado.



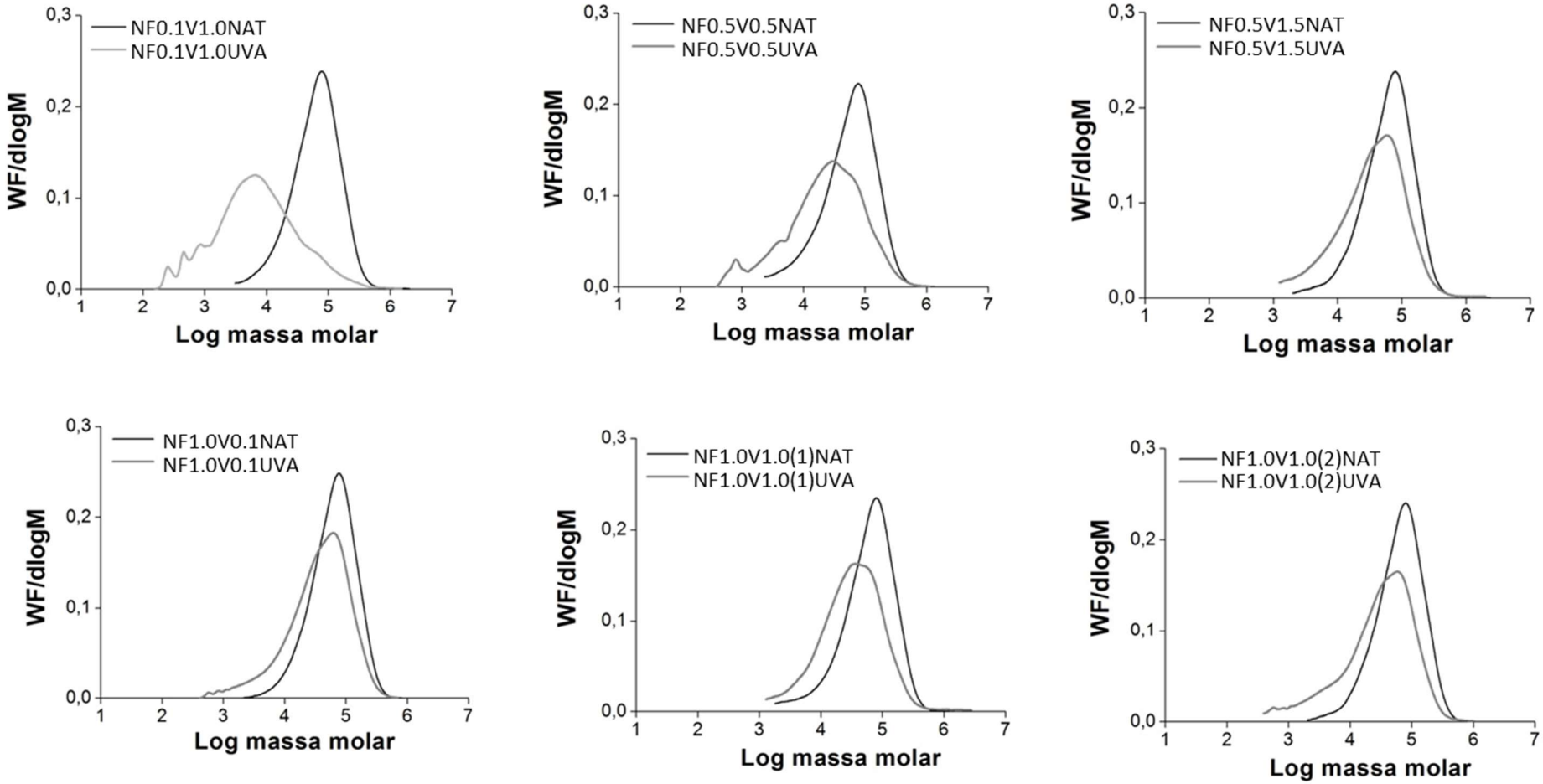
Fonte: O autor (2019)

Figura 2 - Curvas de distribuição de massa molar de amostras de PBAT com negro de fumo e HALS, antes e depois do envelhecimento acelerado (continuação).



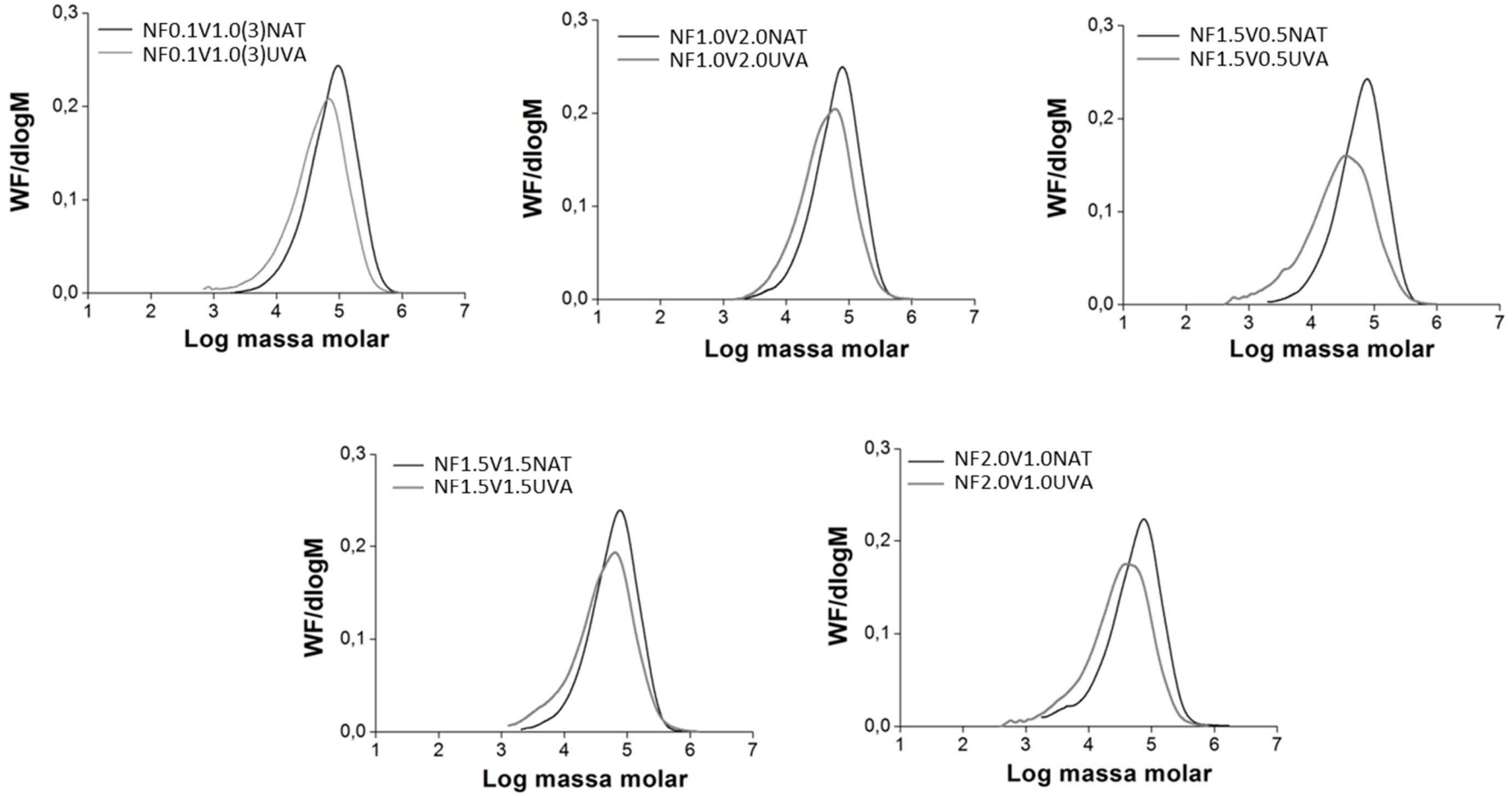
Fonte: O autor (2019)

Figura 3 - Curvas de distribuição de massa molar de amostras de PBAT com negro de fumo e vitamina E, antes e depois do envelhecimento acelerado.



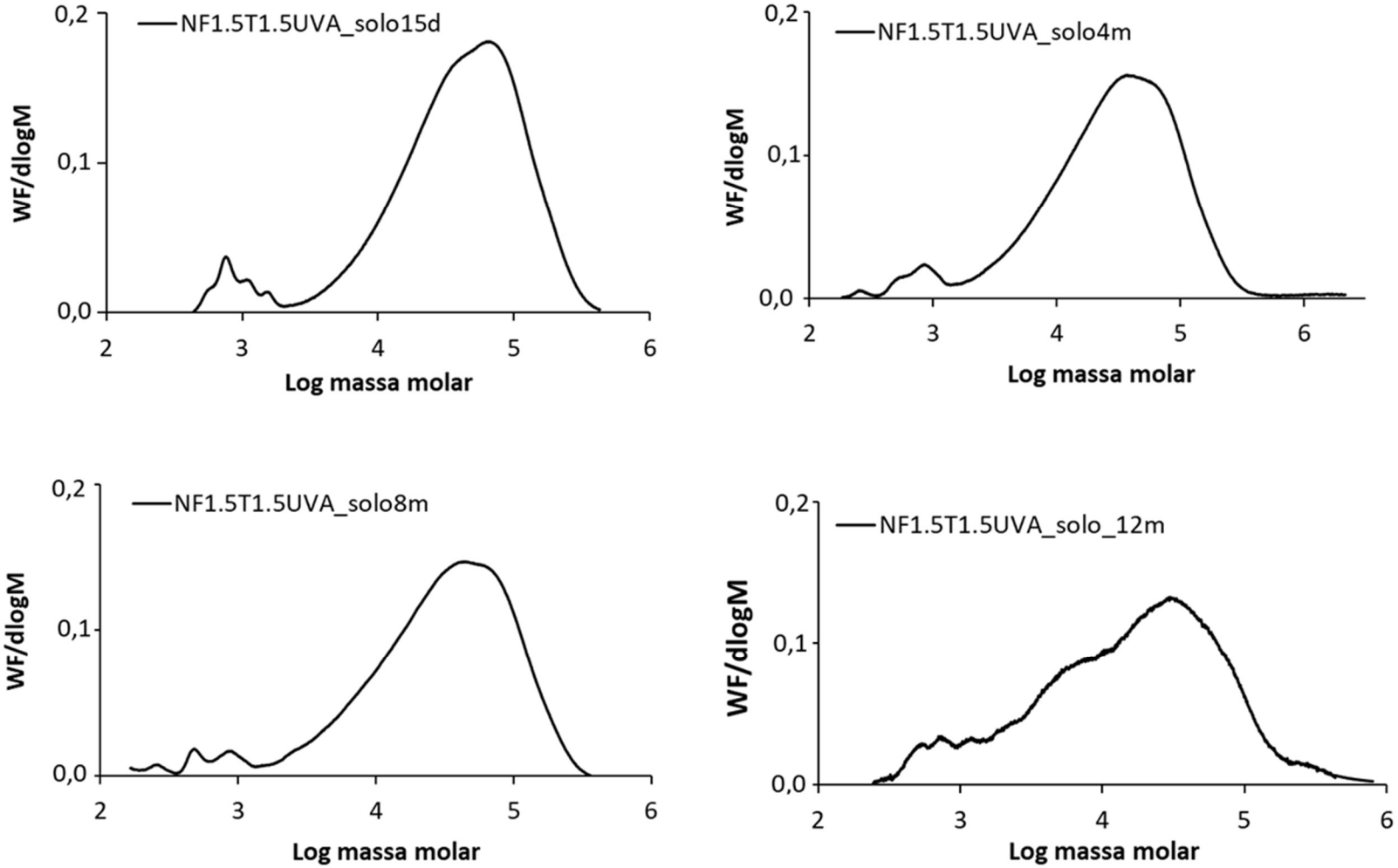
Fonte: O autor (2019)

Figura 4 - Curvas de distribuição de massa molar de amostras de PBAT com negro de fumo e vitamina E, antes e depois do envelhecimento acelerado (continuação).



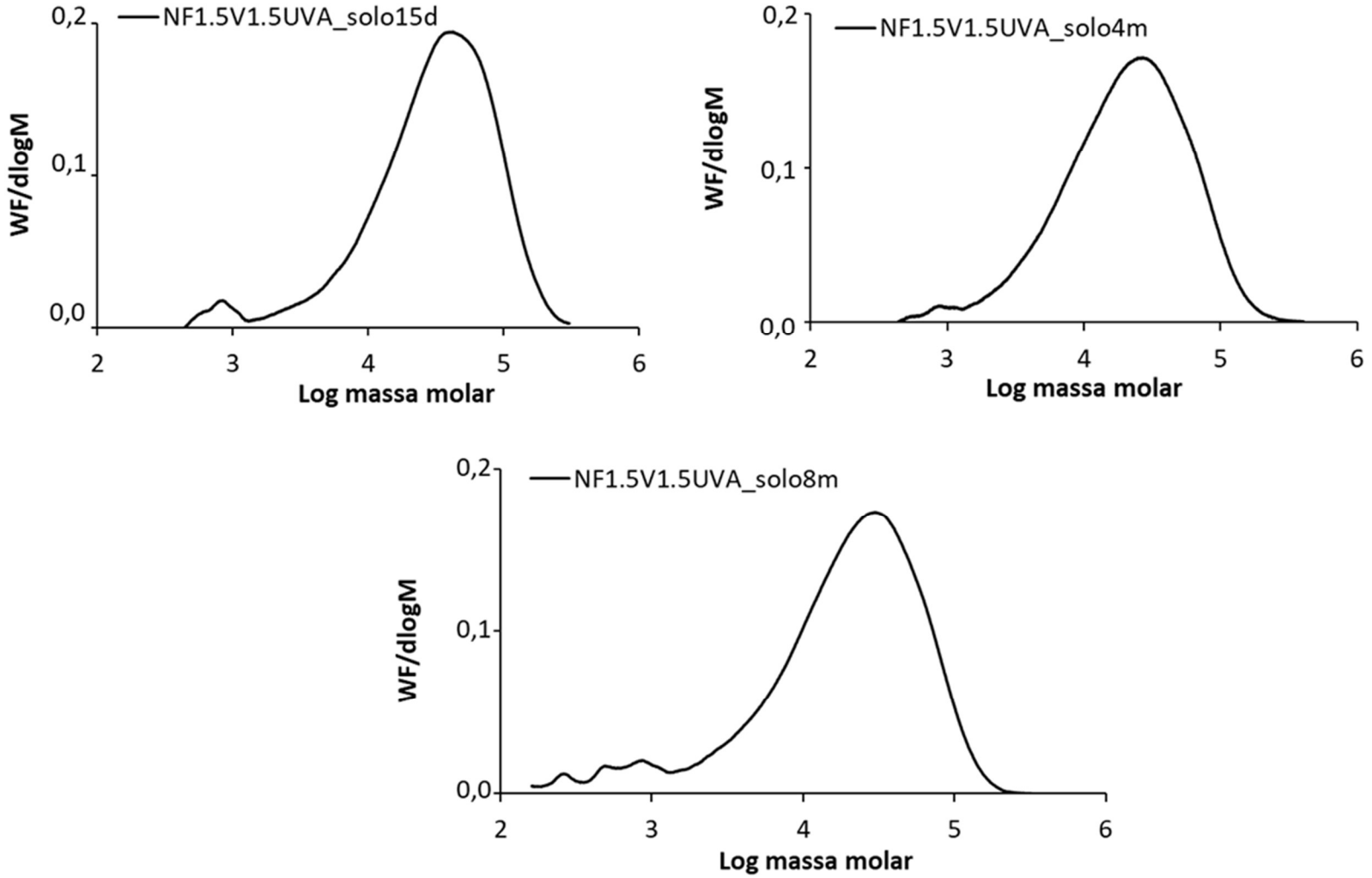
Fonte: O autor (2019)

Figura 5- Curvas de distribuição de massa molar de amostras de PBAT com negro de fumo e HALS, após degradação em solo por 15 dias, 4 meses, 8 meses e 12 meses.



Fonte: O autor (2019)

Figura 6 - Curvas de distribuição de massa molar de amostras de PBAT com negro de fumo e vitamina E, após degradação em solo por 15 dias, 4 meses e 8 meses.

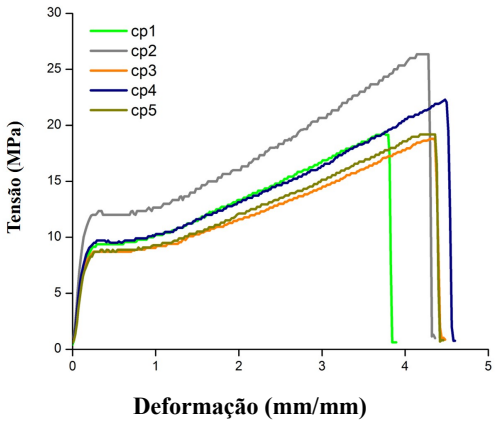


.

Fo e: O uto (2 9

APÊNDICE F - RESULTADOS DE PROPRIEDADES MECÂNICAS

Figura 1 – Curva tensão x deformação da amostra NF0.1T1.0NAT.



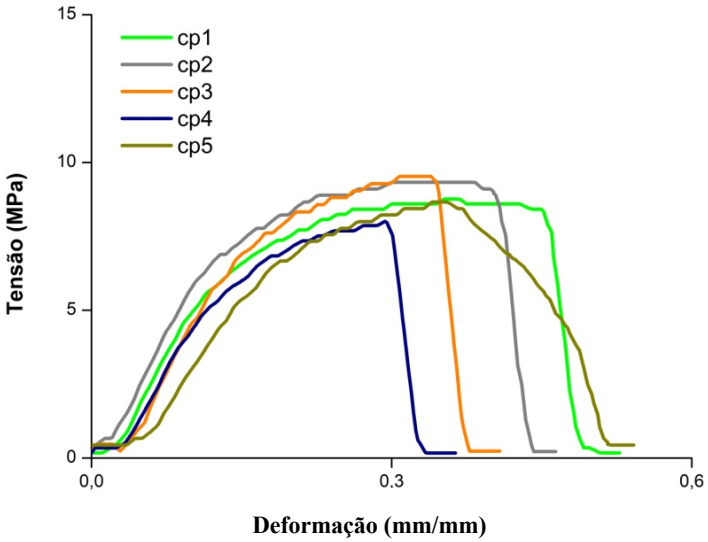
Fonte: O autor (2019)

Tabela 1 – Resultados de propriedades mecânicas da amostra NF0.1T1.0NAT.

Corpo de prova	Espessura (mm)	Resistência à tração (MPa)	Alongamento (%)	Módulo de Young (MPa)
cp1	0,032	19	380	65
cp2	0,020	26	430	71
cp3	0,039	19	436	49
cp4	0,035	22	451	57
cp5	0,033	19	436	52

Fonte: O autor (2019)

Figura 2– Curva tensão x deformação da amostra NF0.1T1.0UVA.



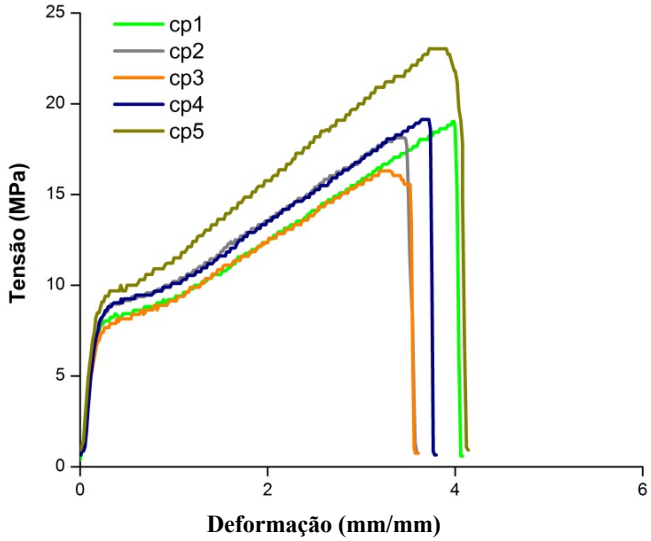
Fonte: O autor (2019)

Tabela 2- Resultados de propriedades mecânicas da amostra NF0.1T1.0UVA.

Corpo de prova	Espessura (mm)	Resistência à tração (MPa)	Alongamento (%)	Módulo de Young (MPa)
cp1	0,038	9	43	67
cp2	0,030	9	39	66
cp3	0,028	10	31	70
cp4	0,039	8	28	60
cp5	0,030	9	45	49

Fonte: O autor (2019)

Figura 3- Curva tensão x deformação da amostra NF0.5T0.5NAT.



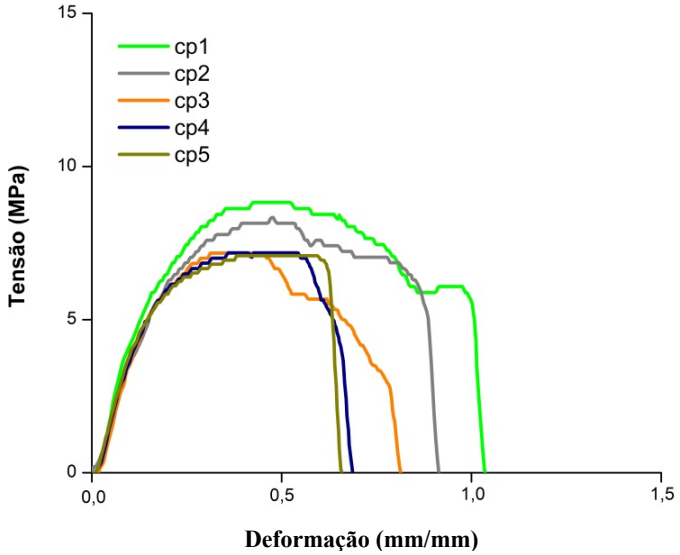
Fonte: O autor (2019)

Tabela 3 – Resultados de propriedades mecânicas da amostra NF0.5T0.5NAT.

Corpo de prova	Espessura (mm)	Resistência à tração (MPa)	Alongamento (%)	Módulo de Young (MPa)
cp1	0,034	19	398	54
cp2	0,032	18	347	36
cp3	0,027	16	355	35
cp4	0,031	19	370	48
cp5	0,022	23	403	47

Fonte: O autor (2019)

Figura 4 - Curva tensão x deformação da amostra NF0.5T0.5UVA.



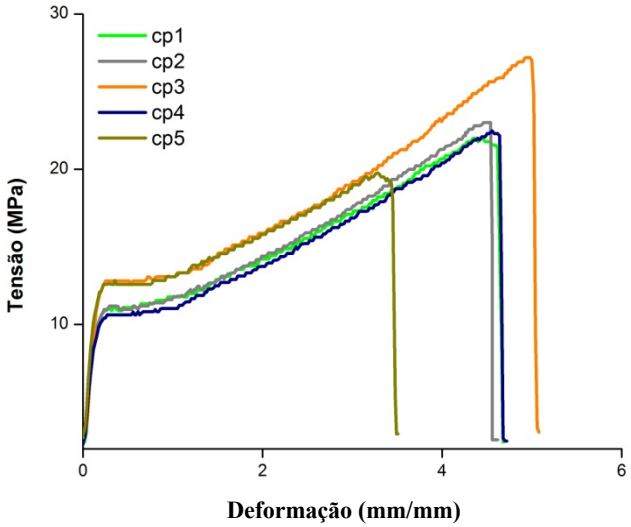
Fonte: O autor (2019)

Tabela 4- Resultados de propriedades mecânicas da amostra NF0.5T0.5UVA.

Corpo de prova	Espessura (mm)	Resistência à tração (MPa)	Alongamento (%)	Módulo de Young (MPa)
cp1	0,034	9	98	66
cp2	0,036	8	85	45
cp3	0,040	7	76	51
cp4	0,039	7	64	51
cp5	0,048	7	60	48

Fonte: O autor (2019)

Figura 5- Curva tensão x deformação da amostra NF0.5T1.5NAT.



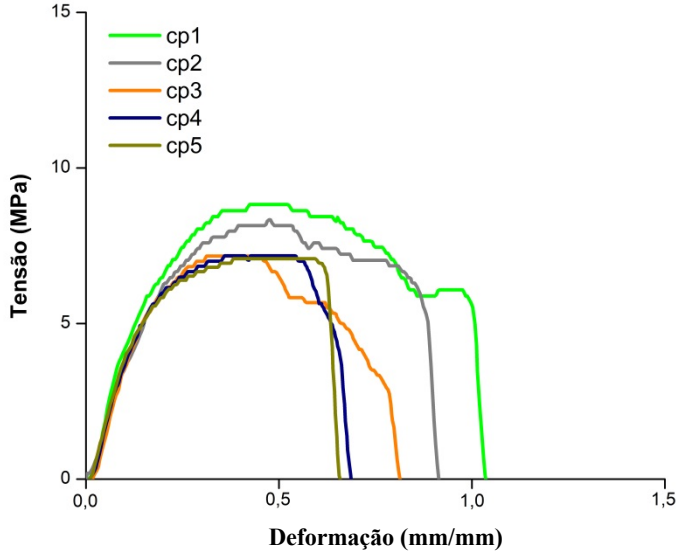
Fonte: O autor (2019)

Tabela 5 – Resultados de propriedades mecânicas da amostra NF0.5T1.5NAT.

Corpo de prova	Espessura (mm)	Resistência à tração (MPa)	Alongamento (%)	Módulo de Young (MPa)
cp1	0,030	22	467	52
cp2	0,031	23	456	52
cp3	0,026	27	503	54
cp4	0,032	23	469	54
cp5	0,027	20	347	62

Fonte: O autor (2019)

Figura 6 – Curva tensão x deformação da amostra NF0.5T1.5UVA.



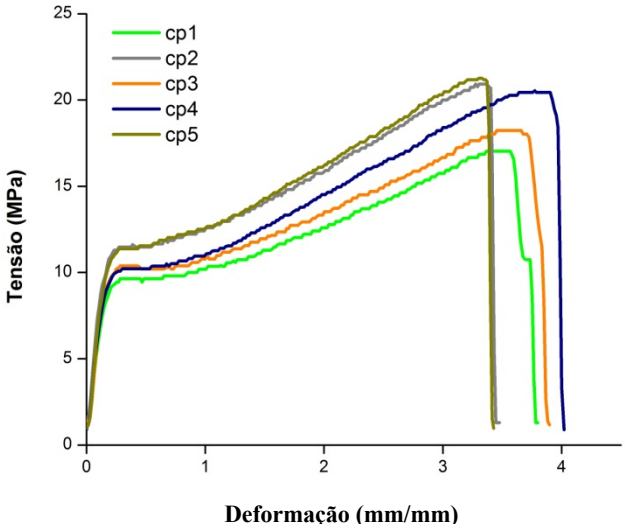
Fonte: O autor (2019)

Tabela 6 - Resultados de propriedades mecânicas da amostra NF0.5T1.5UVA.

Corpo de prova	Espessura (mm)	Resistência à tração (MPa)	Alongamento (%)	Módulo de Young (MPa)
cp1	0,034	14	122	63
cp2	0,036	6	29	55
cp3	0,040	11	67	73
cp4	0,039	9	116	45
cp5	0,048	8	76	58

Fonte: O autor (2019)

Figura 7 – Curva tensão x deformação da amostra NF1.0T0.1NAT.



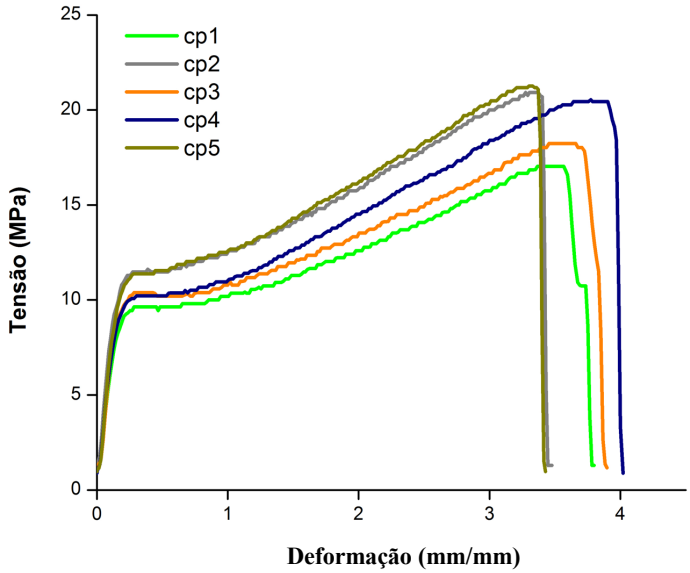
Fonte: O autor (2019)

Tabela 7 – Resultados de propriedades mecânicas da amostra NF1.0T0.1NAT.

Corpo de prova	Espessura (mm)	Resistência à tração (MPa)	Alongamento (%)	Módulo de Young (MPa)
cp1	0,036	17	358	47
cp2	0,036	21	342	65
cp3	0,034	18	372	51
cp4	0,045	21	390	55
cp5	0,041	21	337	59

Fonte: O autor (2019)

Figura 8 – Curva tensão x deformação da amostra NF1.0T0.1UVA



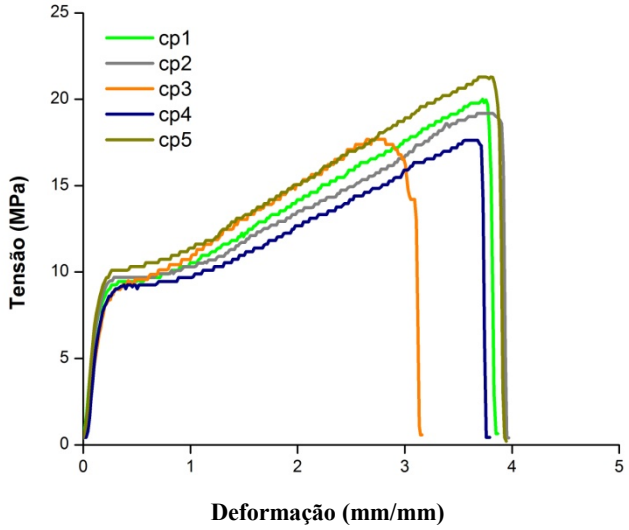
Fonte: O autor (2019)

Tabela 8 – Resultados de propriedades mecânicas da amostra NF1.0T0.1UVA.

Corpo de prova	Espessura (mm)	Resistência à tração (MPa)	Alongamento (%)	Módulo de Young (MPa)
cp1	0,036	13	178	58
cp2	0,036	13	192	59
cp3	0,040	11	209	47
cp4	0,040	11	168	53
cp5	0,038	12	228	48

Fonte: O autor (2019)

Figura 9 - Curva tensão x deformação da amostra NF1.0T1.0(1)NAT.



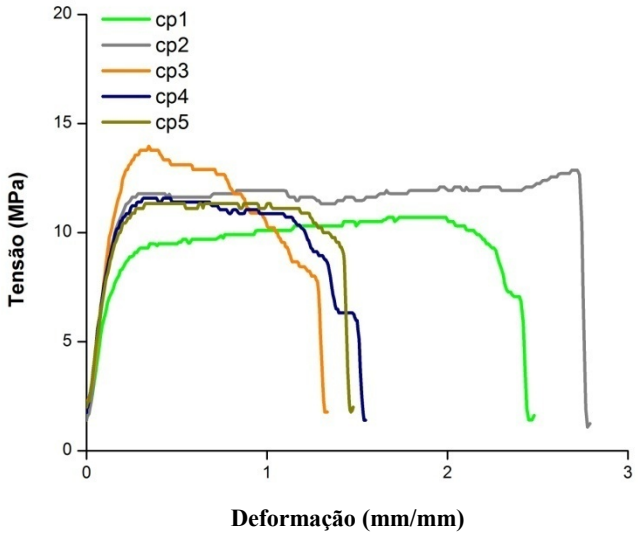
Fonte: O autor (2019)

Tabela 9 – Resultados de propriedades mecânicas da amostra NF1.0T1.0(1)NAT.

Corpo de prova	Espessura (mm)	Resistência à tração (MPa)	Alongamento (%)	Módulo de Young (MPa)
cp1	0,031	20	376	56
cp2	0,033	19	388	73
cp3	0,023	18	299	47
cp4	0,031	18	367	69
cp5	0,031	21	382	74

Fonte: O autor (2019)

Figura 10 - Curva tensão x deformação da amostra NF1.0T1.0(1)UVA.



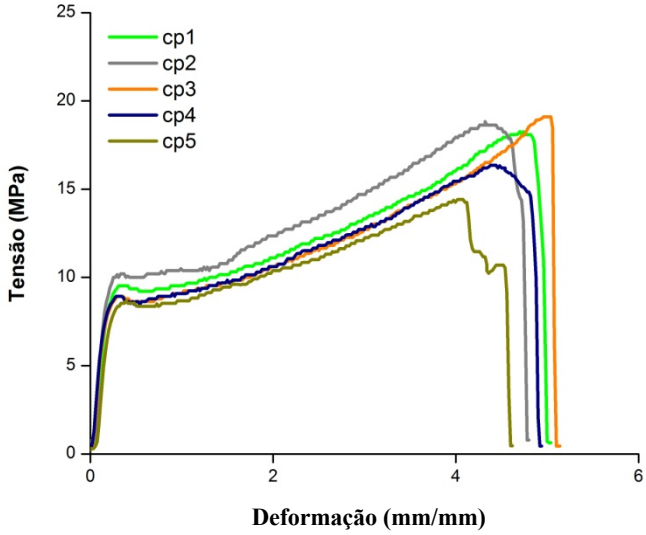
Fonte: O autor (2019)

Tabela 10 - Resultados de propriedades mecânicas da amostra NF1.0T1.0(1)UVA.

Corpo de prova	Espessura (mm)	Resistência à tração (MPa)	Alongamento (%)	Módulo de Young (MPa)
cp1	0,033	11	227	47
cp2	0,043	13	275	61
cp3	0,037	11	131	47
cp4	0,038	12	137	58
cp5	0,03	11	146	54

Fonte: O autor (2019)

Figura 11 - Curva tensão x deformação da amostra NF1.0T1.0(2)NAT.



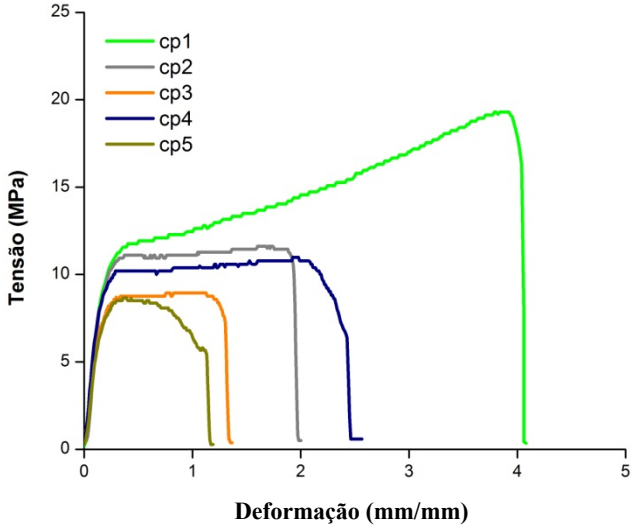
Fonte: O autor (2019)

Tabela 11 - Resultados de propriedades mecânicas da amostra NF1.0T1.0(2)NAT.

Corpo de prova	Espessura (mm)	Resistência à tração (MPa)	Alongamento (%)	Módulo de Young (MPa)
cp1	0,042	18	479	63
cp2	0,034	19	457	78
cp3	0,044	19	501	62
cp4	0,044	16	479	69
cp5	0,043	14	406	62

Fonte: O autor (2019)

Figura 12 - Curva tensão x deformação da amostra NF1.0T1.0(2)UVA.



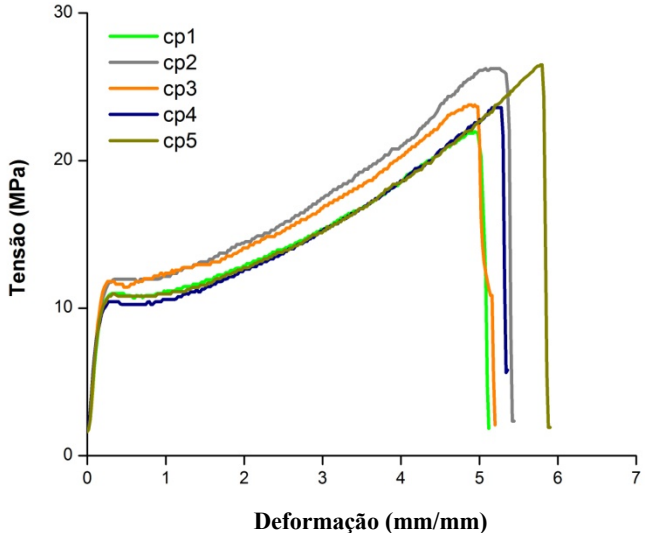
Fonte: O autor (2019)

Tabela 12 - Resultados de propriedades mecânicas da amostra NF1.0T1.0(2)UVA.

Corpo de prova	Espessura (mm)	Resistência à tração (MPa)	Alongamento (%)	Módulo de Young (MPa)
cp1	0,038	19	393	84
cp2	0,039	12	191	80
cp3	0,035	9	132	46
cp4	0,034	11	243	64
cp5	0,047	9	112	57

Fonte: O autor (2019)

Figura 13 - Curva tensão x deformação da amostra NF1.0T1.0(3)NAT.



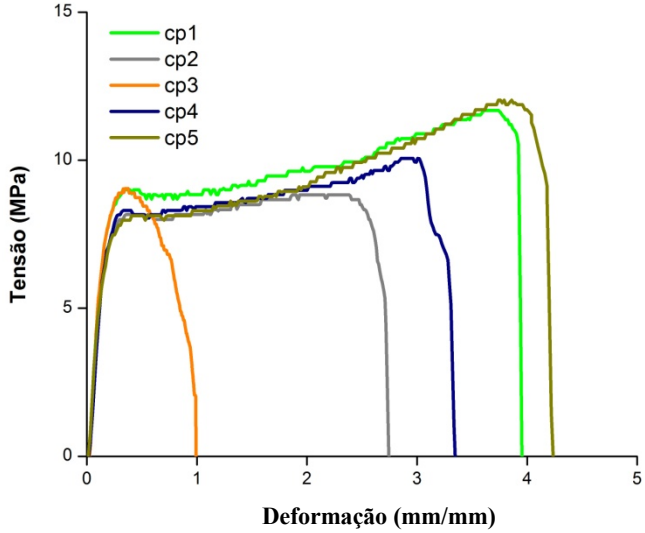
Fonte: O autor (2019)

Tabela 13 – Resultados de propriedades mecânicas da amostra NF1.0T1.0(3)NAT.

Corpo de prova	Espessura (mm)	Resistência à tração (MPa)	Alongamento (%)	Módulo de Young (MPa)
cp1	0,043	22	501	48
cp2	0,034	26	536	50
cp3	0,035	24	502	50
cp4	0,039	24	529	52
cp5	0,045	27	585	53

Fonte: O autor (2019)

Figura 14 - Curva tensão x deformação da amostra NF1.0T1.0(3)UVA



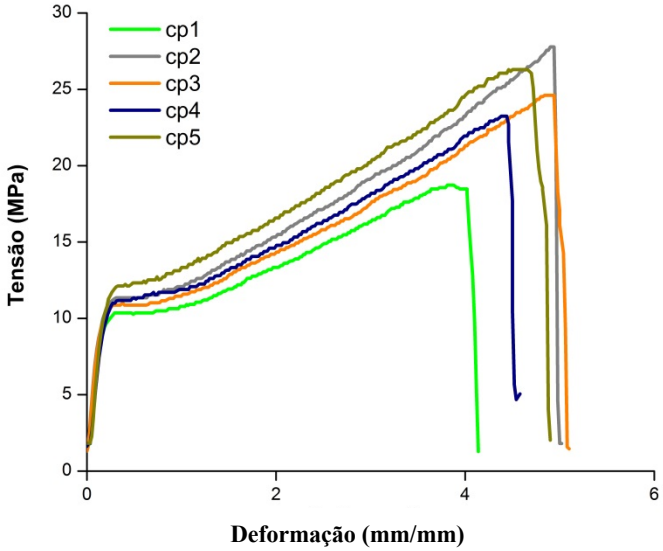
Fonte: O autor (2019)

Tabela 14– Resultados de propriedades mecânicas da amostra NF1.0T1.0(3)UVA.

Corpo de prova	Espessura (mm)	Resistência à tração (MPa)	Alongamento (%)	Módulo de Young (MPa)
cp1	0,044	11	389	65
cp2	0,040	9	256	70
cp3	0,045	9	97	72
cp4	0,049	10	304	56
cp5	0,041	12	416	62

Fonte: O autor (2019)

Figura 15 - Curva tensão x deformação da amostra NF1.0T2.0NAT.



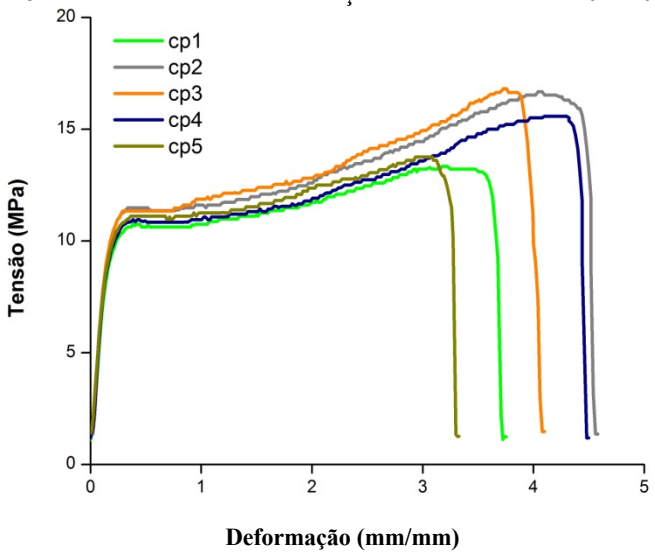
Fonte: O autor (2019)

Tabela 15 - Resultados de propriedades mecânicas da amostra NF1.0T2.0NAT.

Corpo de prova	Espessura (mm)	Resistência à tração (MPa)	Alongamento (%)	Módulo de Young (MPa)
cp1	0,047	19	404	49
cp2	0,037	28	494	63
cp3	0,046	25	494	63
cp4	0,037	23	445	44
cp5	0,033	26	472	48

Fonte: O autor (2019)

Figura 16 - Curva tensão x deformação da amostra NF1.0T2.0UVA.



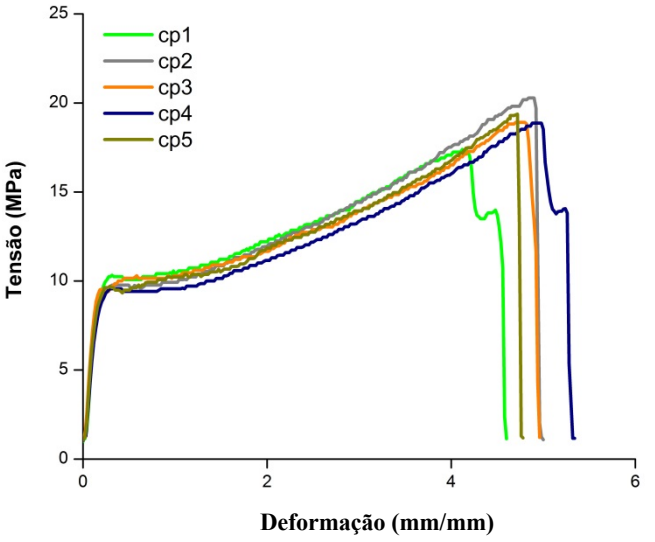
Fonte: O autor (2019)

Tabela 16 - Resultados de propriedades mecânicas da amostra NF1.0T2.0UVA.

Corpo de prova	Espessura (mm)	Resistência à tração (MPa)	Alongamento (%)	Módulo de Young (MPa)
cp1	0,054	13	361	54
cp2	0,054	17	446	58
cp3	0,050	17	389	56
cp4	0,056	16	438	56
cp5	0,048	14	320	56

Fonte: O autor (2019)

Figura 17 - Curva tensão x deformação da amostra NF1.5T0.5NAT.



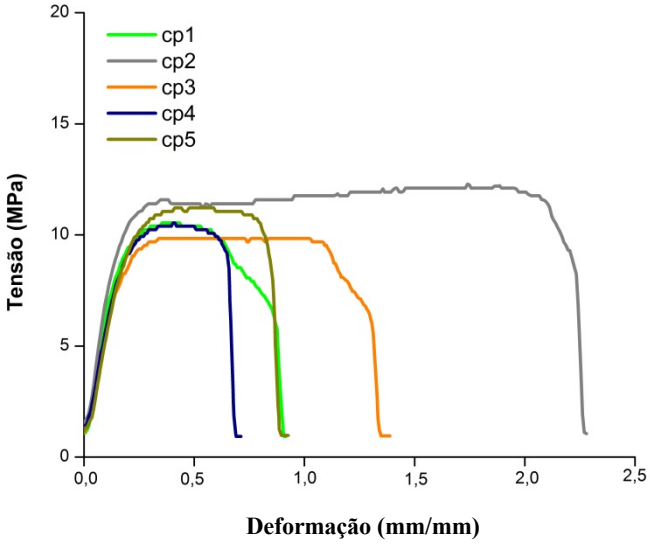
Fonte: O autor (2019)

Tabela 17 - Resultados de propriedades mecânicas da amostra NF1.5T0.5NAT.

Corpo de prova	Espessura (mm)	Resistência à tração (MPa)	Alongamento (%)	Módulo de Young (MPa)
cp1	0,041	17	418	49
cp2	0,043	20	490	49
cp3	0,044	19	481	59
cp4	0,046	19	500	47
cp5	0,045	19	469	52

Fonte: O autor (2019)

Figura 18 - Curva tensão x deformação da amostra NF1.5T0.5UVA.



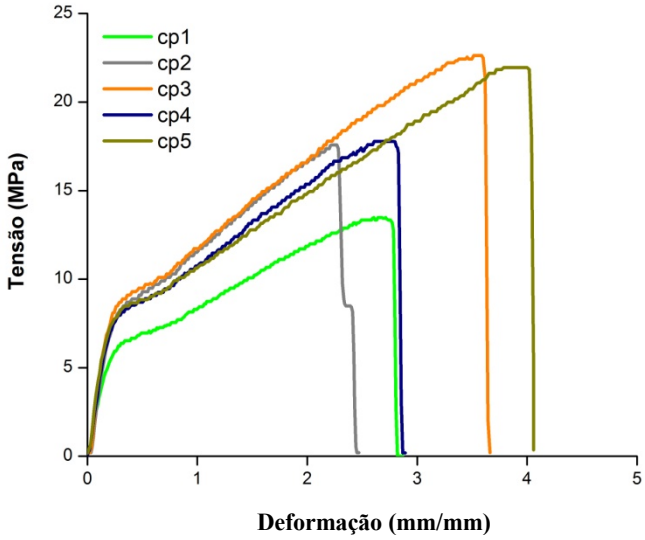
Fonte: O autor (2019)

Tabela 18 - Resultados de propriedades mecânicas da amostra NF1.5T0.5UVA.

Corpo de prova	Espessura (mm)	Resistência à tração (MPa)	Alongamento (%)	Módulo de Young (MPa)
cp1	0,043	11	88	53
cp2	0,038	12	213	55
cp3	0,042	10	131	45
cp4	0,043	11	68	44
cp5	0,041	11	85	44

Fonte: O autor (2019)

Figura 19- Curva tensão x deformação da amostra NF1.5T1.5NAT.



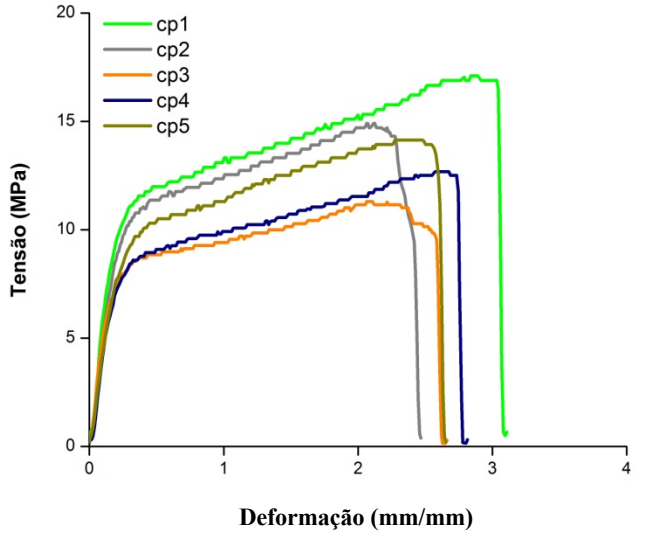
Fonte: O autor (2019)

Tabela 19 – Resultados de propriedades mecânicas da amostra NF1.5T1.5NAT.

Corpo de prova	Espessura (mm)	Resistência à tração (MPa)	Alongamento (%)	Módulo de Young (MPa)
cp1	0,045	13	277	44
cp2	0,033	18	225	56
cp3	0,033	23	357	64
cp4	0,036	18	282	42
cp5	0,037	22	396	57

Fonte: O autor (2019)

Figura 20 - Curva tensão x deformação da amostra NF1.5T1.5UVA.



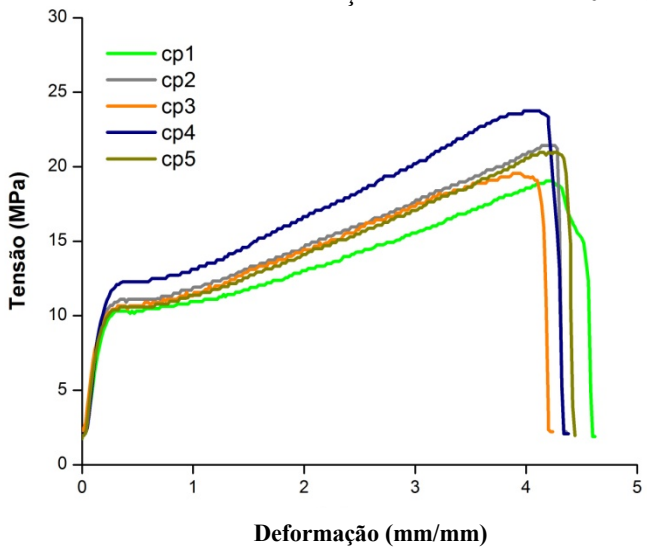
Fonte: O autor (2019)

Tabela 20- Resultados de propriedades mecânicas da amostra NF1.5T1.5UVA.

Corpo de prova	Espessura (mm)	Resistência à tração (MPa)	Alongamento (%)	Módulo de Young (MPa)
cp1	0,030	17	302	66
cp2	0,034	15	225	73
cp3	0,046	11	257	61
cp4	0,041	13	271	57
cp5	0,033	14	257	48

Fonte: O autor (2019)

Figura 21 - Curva tensão x deformação da amostra NF2.0T1.0NAT.



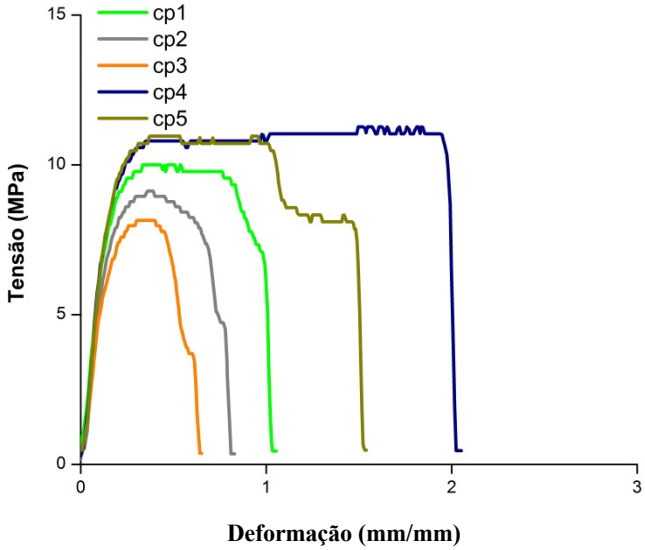
Fonte: O autor (2019)

Tabela 21- Resultados de propriedades mecânicas da amostra NF2.0T1.0 NAT.

Corpo de prova	Espessura (mm)	Resistência à tração (MPa)	Alongamento (%)	Módulo de Young (MPa)
cp1	0,042	19	433	39
cp2	0,033	21	434	43
cp3	0,03	20	414	47
cp4	0,032	24	423	45
cp5	0,034	21	437	45

Fonte: O autor (2019)

Figura 22 - Curva tensão x deformação da amostra NF2.0T1.0UVA.



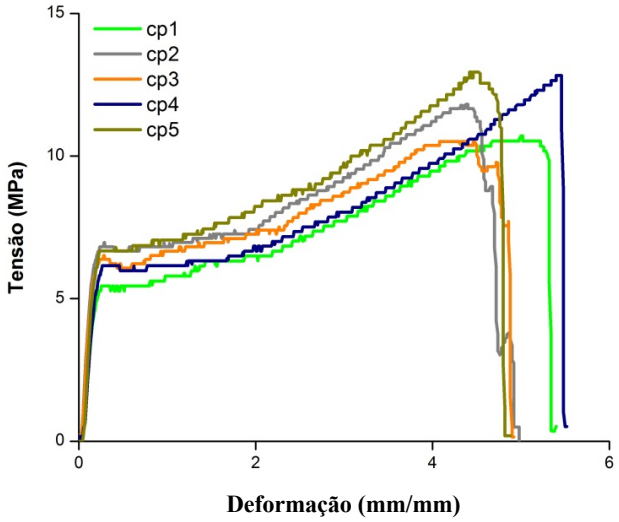
Fonte: O autor (2019)

Tabela 22- Resultados de propriedades mecânicas da amostra NF2.0T1.0UVA.

Corpo de prova	Espessura (mm)	Resistência à tração (MPa)	Alongamento (%)	Módulo de Young (MPa)
cp1	0,030	10	100	58
cp2	0,038	9	76	71
cp3	0,036	8	61	44
cp4	0,029	11	194	71
cp5	0,028	11	146	70

Fonte: O autor (2019)

Figura 23 - Curva tensão x deformação da amostra NF0.1V1.0NAT.



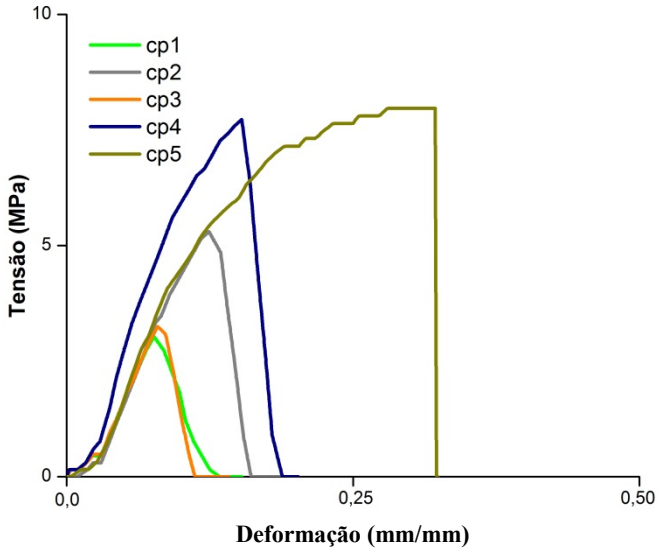
Fonte: O autor (2019)

Tabela 23- Resultados de propriedades mecânicas da amostra NF0.1V1.0NAT.

Corpo de prova	Espessura (mm)	Resistência à tração (MPa)	Alongamento (%)	Módulo de Young (MPa)
cp1	0,038	11	526	41
cp2	0,044	12	451	60
cp3	0,045	11	442	53
cp4	0,039	13	540	44
cp5	0,034	13	465	59

Fonte: O autor (2019)

Figura 24- Curva tensão x deformação da amostra NF0.1V1.0UVA.



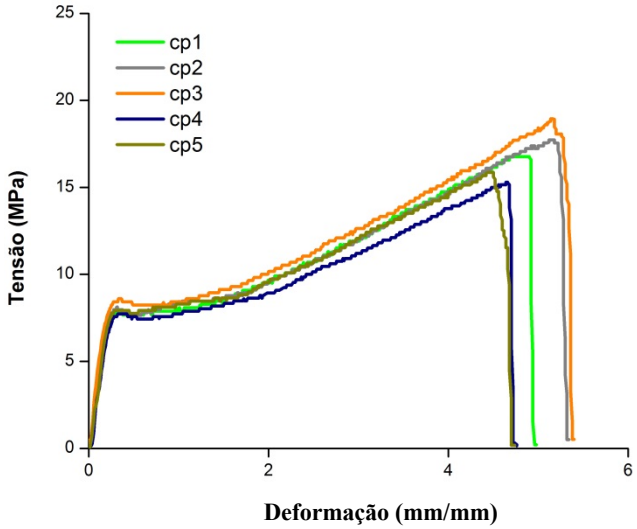
Fonte: O autor (2019)

Tabela 24 - Resultados de propriedades mecânicas da amostra NF0.1V1.0UVA.

Corpo de prova	Espessura (mm)	Resistência à tração (MPa)	Alongamento (%)	Módulo de Young (MPa)
cp1	0,044	3	12	50
cp2	0,044	5	16	63
cp3	0,041	3	9	57
cp4	0,044	8	13	86
cp5	0,041	8	32	65

Fonte: O autor (2019)

Figura 25 - Curva tensão x deformação da amostra NF0.5V0.5NAT.



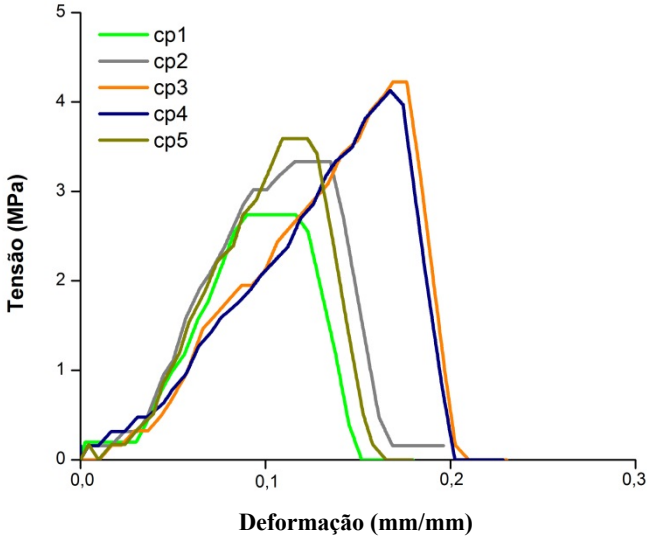
Fonte: O autor (2019)

Tabela 25- Resultados de propriedades mecânicas da amostra NF0.5V0.5NAT.

Corpo de prova	Espessura (mm)	Resistência à tração (MPa)	Alongamento (%)	Módulo de Young (MPa)
cp1	0,033	17	490	51
cp2	0,041	18	518	65
cp3	0,038	19	532	64
cp4	0,044	15	465	56
cp5	0,037	16	448	38

Fonte: O autor (2019)

Figura 26 - Curva tensão x deformação da amostra NF0.5V0.5UVA.



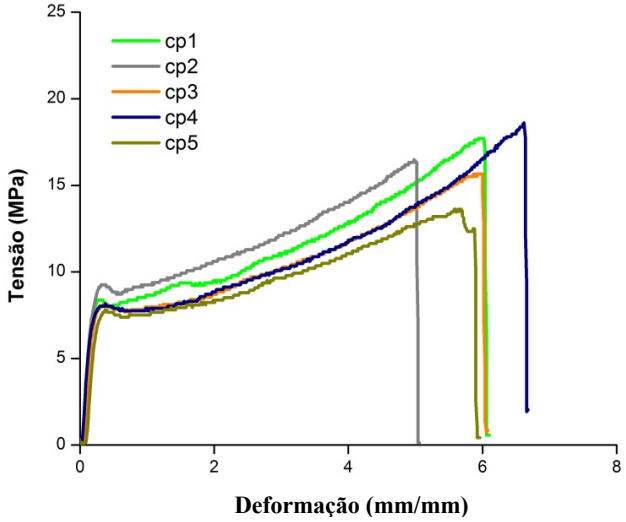
Fonte: O autor (2019)

Tabela 26 - Resultados de propriedades mecânicas da amostra NF0.5V0.5UVA.

Corpo de prova	Espessura (mm)	Resistência à tração (MPa)	Alongamento (%)	Módulo de Young (MPa)
cp1	0,034	3	10	41
cp2	0,042	3	11	45
cp3	0,041	4	15	28
cp4	0,042	4	16	27
cp5	0,039	4	10	42

Fonte: O autor (2019)

Figura 27 - Curva tensão x deformação da amostra NF0.5V1.5NAT.



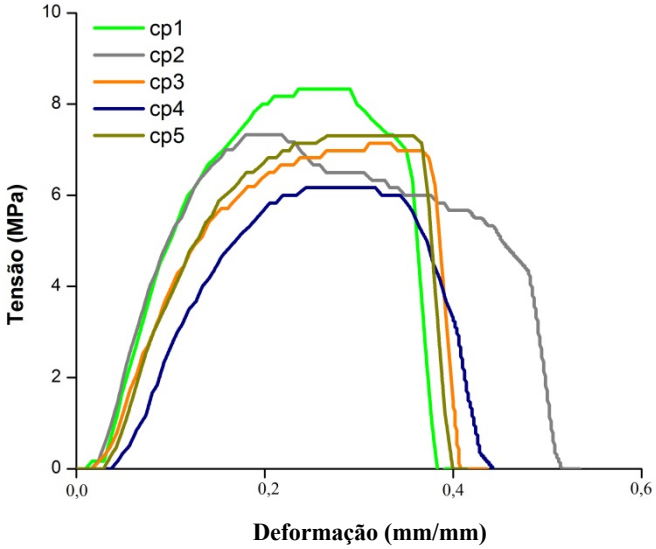
Fonte: O autor (2019)

Tabela 27- Resultados de propriedades mecânicas da amostra NF0.5V1.5NAT.

Corpo de prova	Espessura (mm)	Resistência à tração (MPa)	Alongamento (%)	Módulo de Young (MPa)
cp1	0,047	18	599	64
cp2	0,049	16	498	60
cp3	0,046	16	592	64
cp4	0,049	19	659	68
cp5	0,047	13	550	59

Fonte: O autor (2019)

Figura 28 - Curva tensão x deformação da amostra NF0.5V1.5UVA.



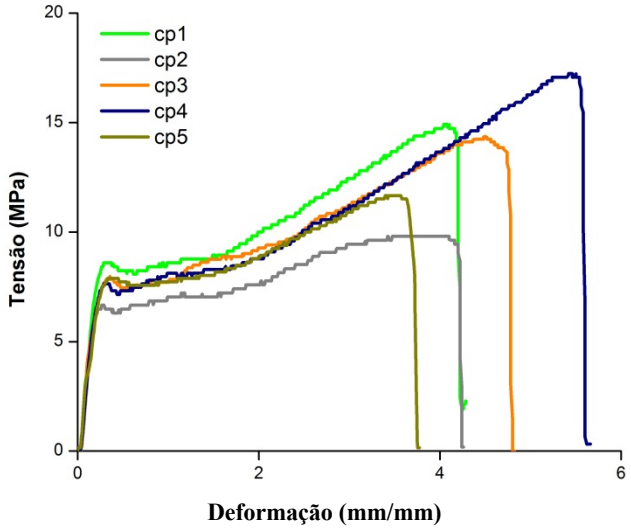
Fonte: O autor (2019)

Tabela 28- Resultados de propriedades mecânicas da amostra NF0.5V1.5UVA.

Corpo de prova	Espessura (mm)	Resistência à tração (MPa)	Alongamento (%)	Módulo de Young (MPa)
cp1	0,040	8	32	73
cp2	0,040	7	46	74
cp3	0,042	7	34	60
cp4	0,040	6	36	49
cp5	0,042	7	33	68

Fonte: O autor (2019)

Figura 29 - Curva tensão x deformação da amostra NF1.0V0.1NAT.



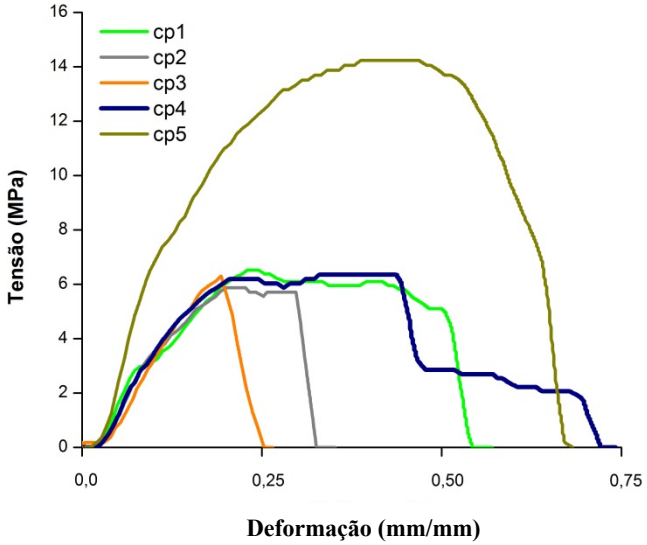
Fonte: O autor (2019)

Tabela 29- Resultados de propriedades mecânicas da amostra NF1.0V0.1NAT.

Corpo de prova	Espessura (mm)	Resistência à tração (MPa)	Alongamento (%)	Módulo de Young (MPa)
cp1	0,038	15	417	43
cp2	0,036	10	417	50
cp3	0,051	14	469	65
cp4	0,041	17	548	50
cp5	0,044	12	358	61

Fonte: O autor (2019)

Figura 30- Curva tensão x deformação da amostra NF1.0V0.1UVA.



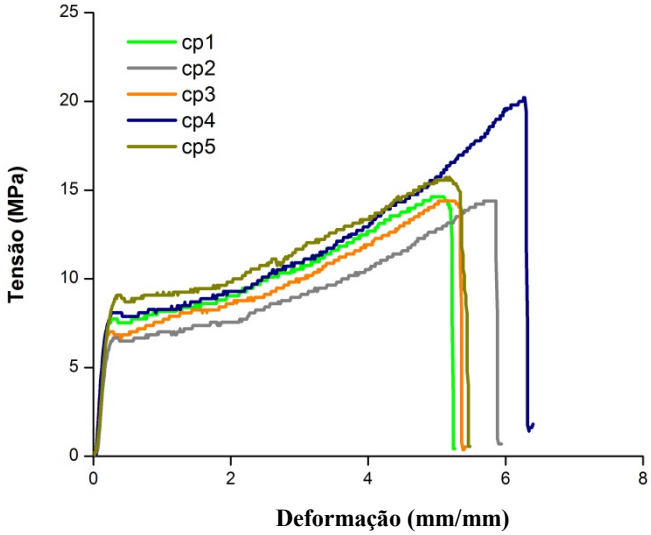
Fonte: O autor (2019)

Tabela 30 - Resultados de propriedades mecânicas da amostra NF1.0V0.1UVA.

Corpo de prova	Espessura (mm)	Resistência à tração (MPa)	Alongamento (%)	Módulo de Young (MPa)
cp1	0,047	7	48	63
cp2	0,042	6	27	50
cp3	0,037	6	16	48
cp4	0,042	6	41	58
cp5	0,047	11	61	85

Fonte: O autor (2019)

Figura 31 - Curva tensão x deformação da amostra NF1.0V1.0(1)NAT.



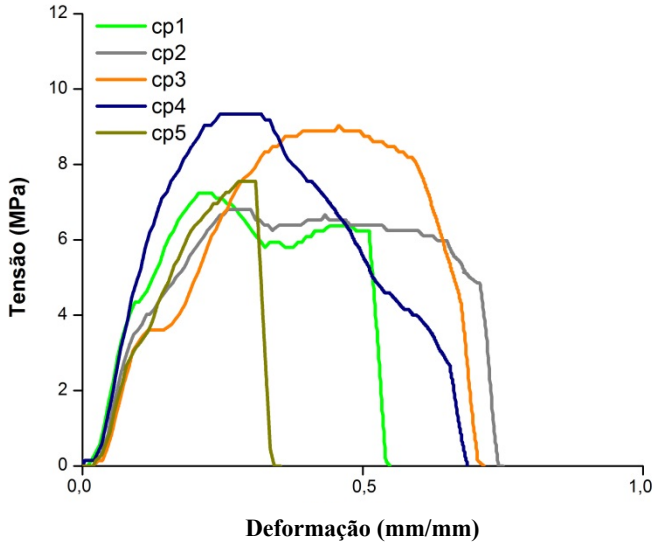
Fonte: O autor (2019)

Tabela 31 - Resultados de propriedades mecânicas da amostra NF1.0V1.0(1)NAT.

Corpo de prova	Espessura (mm)	Resistência à tração (MPa)	Alongamento (%)	Módulo de Young (MPa)
cp1	0,031	15	516	67
cp2	0,038	14	579	51
cp3	0,038	14	530	65
cp4	0,033	20	622	67
cp5	0,036	16	528	49

Fonte: O autor (2019)

Figura 32 - Curva tensão x deformação da amostra NF1.0V1.0(1)UVA.



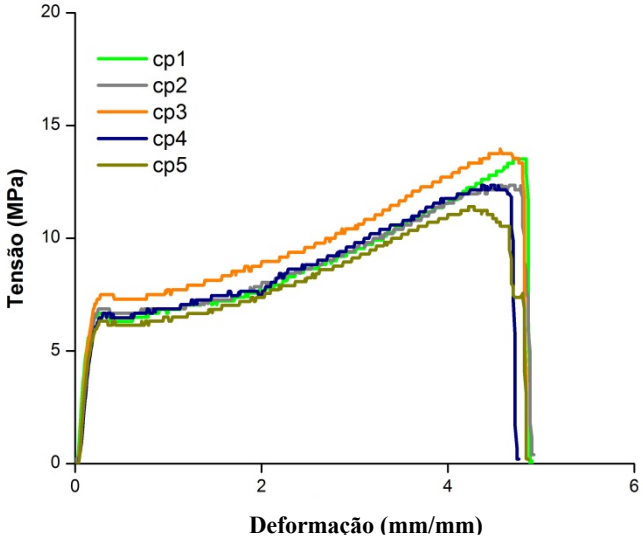
Fonte: O autor (2019)

Tabela 32 - Resultados de propriedades mecânicas da amostra NF1.0V1.0(1)UVA.

Corpo de prova	Espessura (mm)	Resistência à tração (MPa)	Alongamento (%)	Módulo de Young (MPa)
cp1	0,046	7	49	71
cp2	0,048	7	67	65
cp3	0,048	9	64	57
cp4	0,045	9	63	76
cp5	0,045	8	28	56

Fonte: O autor (2019)

Figura 33 - Curva tensão x deformação da amostra NF1.0V1.0(2)NAT.



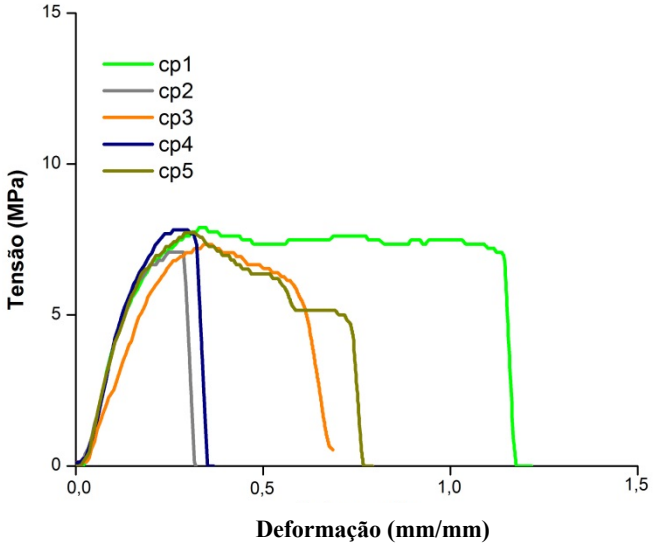
Fonte: O autor (2019)

Tabela 33- Resultados de propriedades mecânicas da amostra NF1.0V1.0(2)NAT.

Corpo de prova	Espessura (mm)	Resistência à tração (MPa)	Alongamento (%)	Módulo de Young (MPa)
cp1	0,037	14	481	68
cp2	0,034	12	472	50
cp3	0,032	14	477	63
cp4	0,034	12	458	46
cp5	0,038	11	458	58

Fonte: O autor (2019)

Figura 34 - Curva tensão x deformação da amostra NF1.0V1.0(2)UVA.



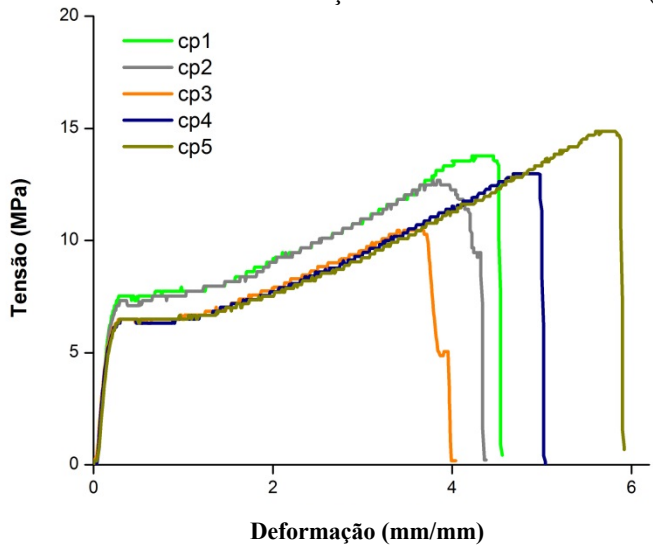
Fonte: O autor (2019)

Tabela 34 - Resultados de propriedades mecânicas da amostra NF1.0V1.0(2)UVA.

Corpo de prova	Espessura (mm)	Resistência à tração (MPa)	Alongamento (%)	Módulo de Young (MPa)
cp1	0,049	8	111	60
cp2	0,048	7	26	52
cp3	0,05	7	59	33
cp4	0,052	8	30	54
cp5	0,044	8	70	57

Fonte: O autor (2019)

Figura 35 - Curva tensão x deformação da amostra NF1.0V1.0(3)NAT.



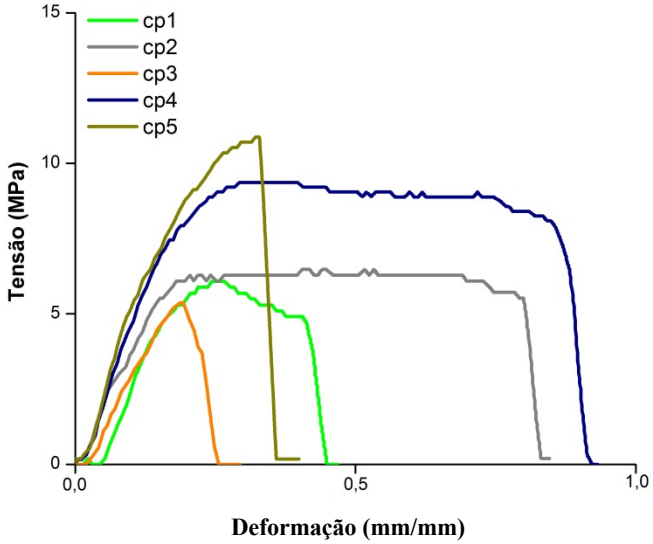
Fonte: O autor (2019)

Tabela 35- Resultados de propriedades mecânicas da amostra NF1.0V1.0(3)NAT.

Corpo de prova	Espessura (mm)	Resistência à tração (MPa)	Alongamento (%)	Módulo de Young (MPa)
cp1	0,031	14	446	56
cp2	0,031	13	411	58
cp3	0,037	10	365	51
cp4	0,038	13	494	57
cp5	0,029	20	583	61

Fonte: O autor (2019)

Figura 36- Curva tensão x deformação da amostra NF1.0V1.0(3)UVA.



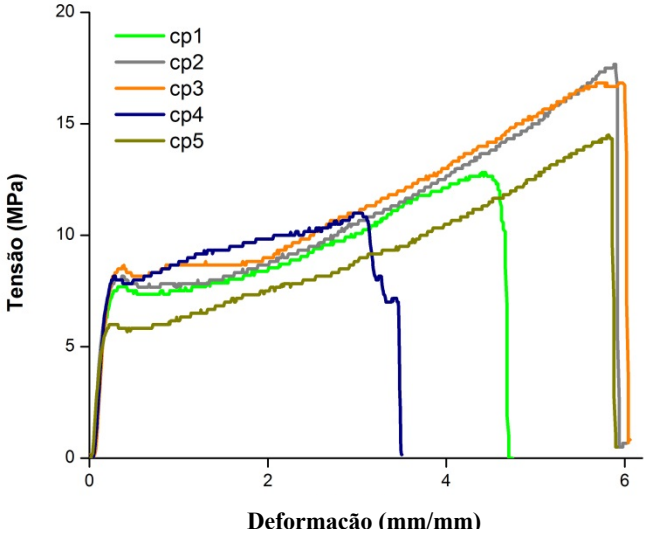
Fonte: O autor (2019)

Tabela 36 - Resultados de propriedades mecânicas da amostra NF1.0V1.0(3)UVA.

Corpo de prova	Espessura (mm)	Resistência à tração (MPa)	Alongamento (%)	Módulo de Young (MPa)
cp1	0,034	6	37	44
cp2	0,035	6	78	60
cp3	0,036	5	18	43
cp4	0,042	9	83	60
cp5	0,038	11	30	74

Fonte: O autor (2019)

Figura 37- Curva tensão x deformação da amostra NF1.0V2.0NAT.



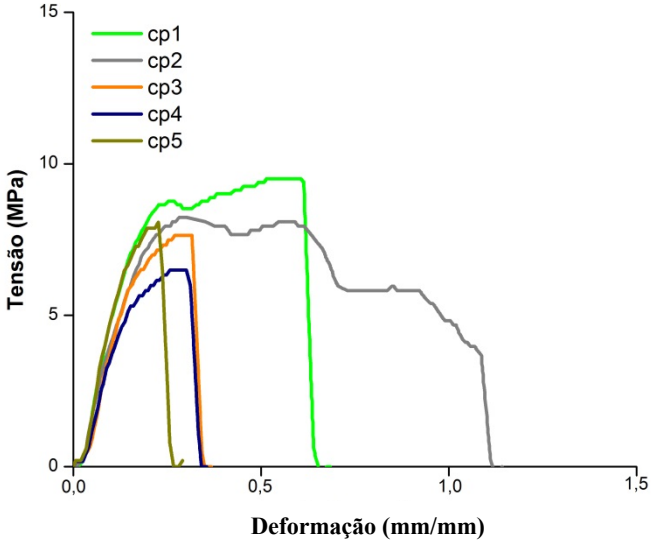
Fonte: O autor (2019)

Tabela 37 - Resultados de propriedades mecânicas da amostra NF1.0V2.0NAT.

Corpo de prova	Espessura (mm)	Resistência à tração (MPa)	Alongamento (%)	Módulo de Young (MPa)
cp1	0,039	13	452	57
cp2	0,04	18	584	66
cp3	0,04	17	593	62
cp4	0,04	11	304	61
cp5	0,04	15	582	61

Fonte: O autor (2019)

Figura 38 - Curva tensão x deformação da amostra NF1.0V2.0UVA.



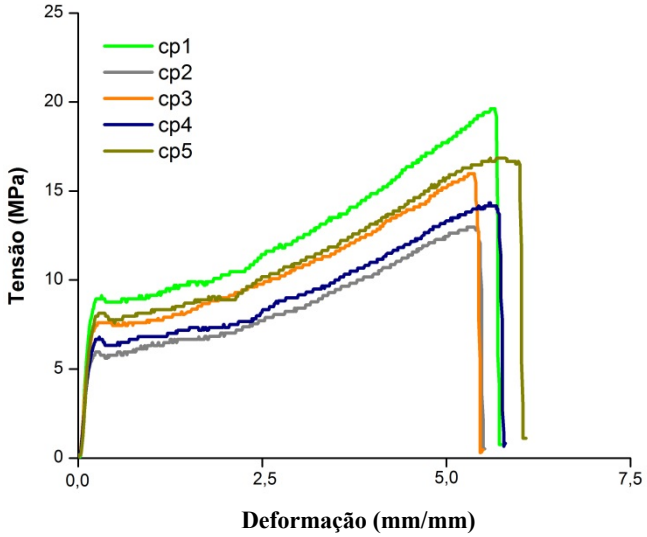
Fonte: O autor (2019)

Tabela 38- Resultados de propriedades mecânicas da amostra NF1.0V2.0UVA.

Corpo de prova	Espessura (mm)	Resistência à tração (MPa)	Alongamento (%)	Módulo de Young (MPa)
cp1	0,054	10	58	76
cp2	0,047	8	66	65
cp3	0,041	8	28	58
cp4	0,039	7	28	53
cp5	0,033	8	20	71

Fonte: O autor (2019)

Figura 39 - Curva tensão x deformação da amostra NF1.5V0.5NAT.



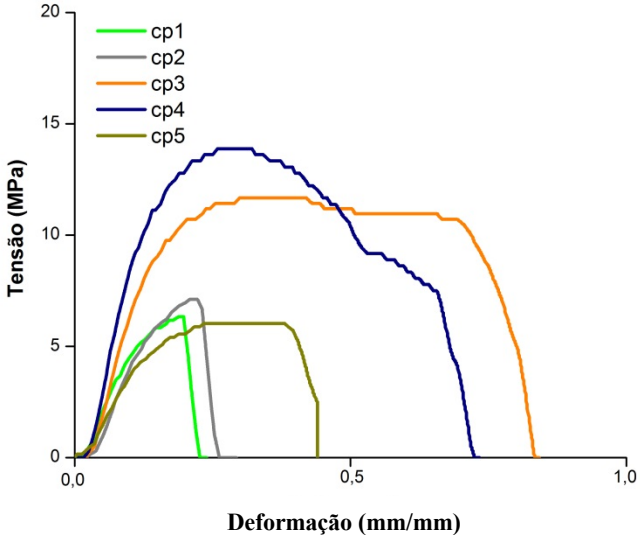
Fonte: O autor (2019)

Tabela 39 - Resultados de propriedades mecânicas da amostra NF1.5V0.5NAT.

Corpo de prova	Espessura (mm)	Resistência à tração (MPa)	Alongamento (%)	Módulo de Young (MPa)
cp1	0,043	19	574	60
cp2	0,03	13	552	58
cp3	0,043	16	550	58
cp4	0,037	14	580	50
cp5	0,037	17	600	65

Fonte: O autor (2019)

Figura 40 - Curva tensão x deformação da amostra NF1.5V0.5UVA.



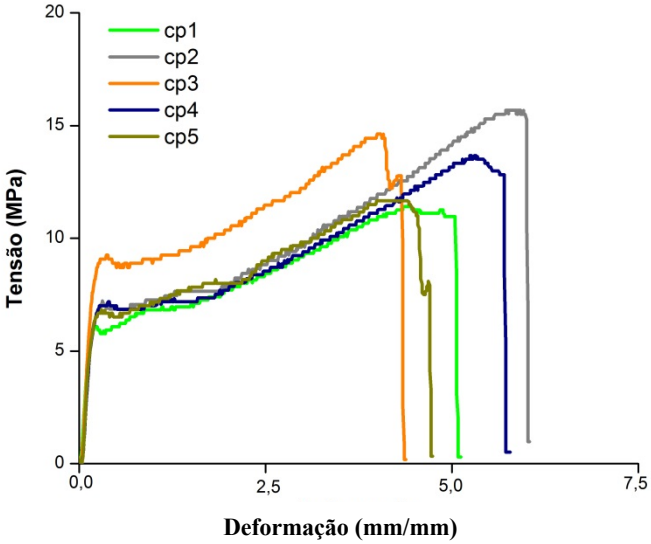
Fonte: O autor (2019)

Tabela 40 - Resultados de propriedades mecânicas da amostra NF1.5V0.5UVA.

Corpo de prova	Espessura (mm)	Resistência à tração (MPa)	Alongamento (%)	Módulo de Young (MPa)
cp1	0,040	6	18	70
cp2	0,045	7	19	66
cp3	0,039	11	73	64
cp4	0,040	8	69	63
cp5	0,042	6	37	47

Fonte: O autor (2019)

Figura 41 - Curva tensão x deformação da amostra NF1.5V1.5NAT.



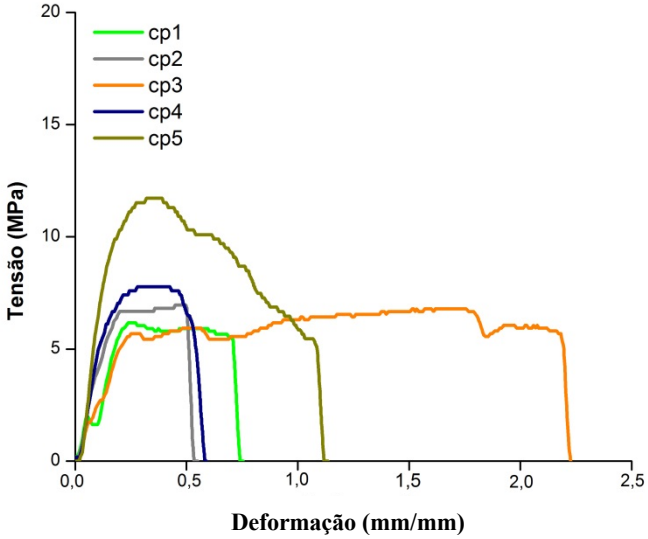
Fonte: O autor (2019)

Tabela 41 - Resultados de propriedades mecânicas da amostra NF1.5V1.5NAT.

Corpo de prova	Espessura (mm)	Resistência à tração (MPa)	Alongamento (%)	Módulo de Young (MPa)
cp1	0,045	11	502	55
cp2	0,034	16	595	55
cp3	0,036	15	429	62
cp4	0,039	14	565	55
cp5	0,040	12	449	60

Fonte: O autor (2019)

Figura 42- Curva tensão x deformação da amostra NF1.5V1.5UVA.



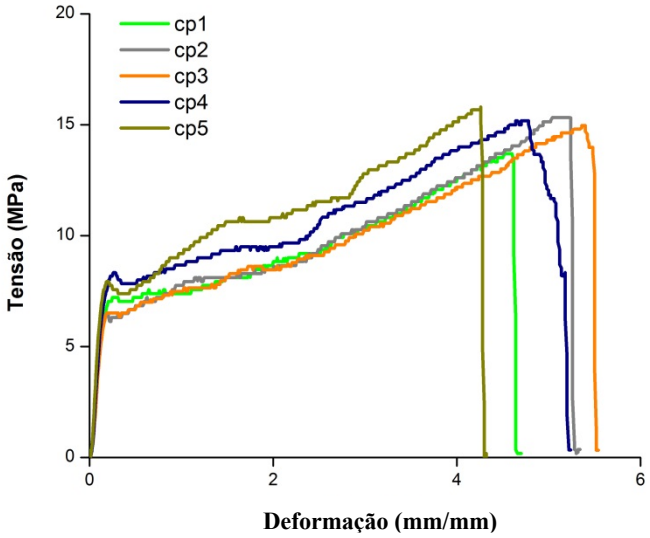
Fonte: O autor (2019)

Tabela 42 - Resultados de propriedades mecânicas da amostra NF1.5V1.5UVA.

Corpo de prova	Espessura (mm)	Resistência à tração (MPa)	Alongamento (%)	Módulo de Young (MPa)
cp1	0,053	6	70	43
cp2	0,046	7	48	58
cp3	0,054	7	176	44
cp4	0,036	8	51	63
cp5	0,033	12	105	95

Fonte: O autor (2019)

Figura 43 - Curva tensão x deformação da amostra NF2.0V1.0NAT.



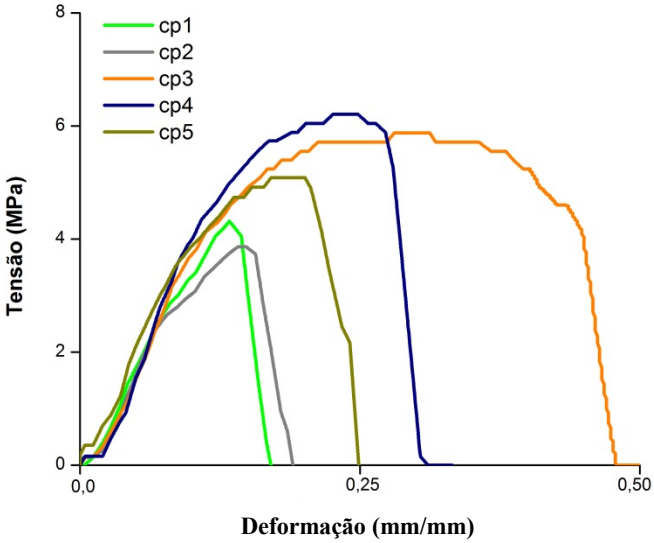
Fonte: O autor (2019)

Tabela 43 - Resultados de propriedades mecânicas da amostra NF2.0V1.0NAT.

Corpo de prova	Espessura (mm)	Resistência à tração (MPa)	Alongamento (%)	Módulo de Young (MPa)
cp1	0,037	14	459	59
cp2	0,037	15	520	64
cp3	0,041	15	533	56
cp4	0,04	15	473	65
cp5	0,037	16	424	77

Fonte: O autor (2019)

Figura 44- Curva tensão x deformação da amostra NF2.0V1.0UVA.



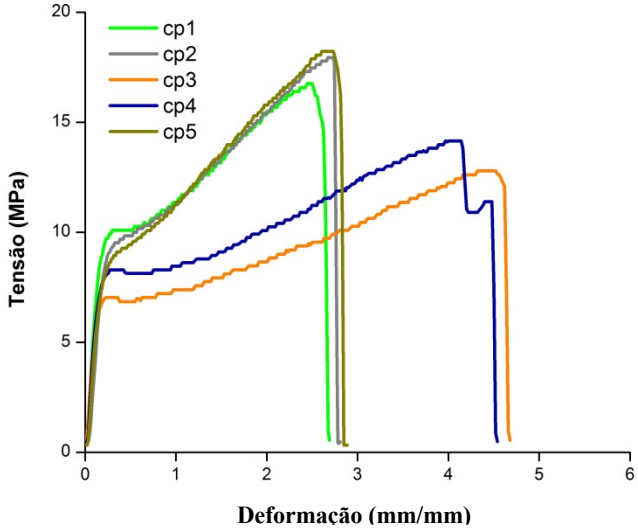
Fonte: O autor (2019)

Tabela 44- Resultados de propriedades mecânicas da amostra NF2.0V1.0UVA.

Corpo de prova	Espessura (mm)	Resistência à tração (MPa)	Alongamento (%)	Módulo de Young (MPa)
cp1	0,047	5	13	48
cp2	0,05	4	14	46
cp3	0,042	6	43	47
cp4	0,043	6	26	54
cp5	0,038	5	20	46

Fonte: O autor (2019)

Figura 45 - Curva tensão x deformação da amostra PBATNAT.

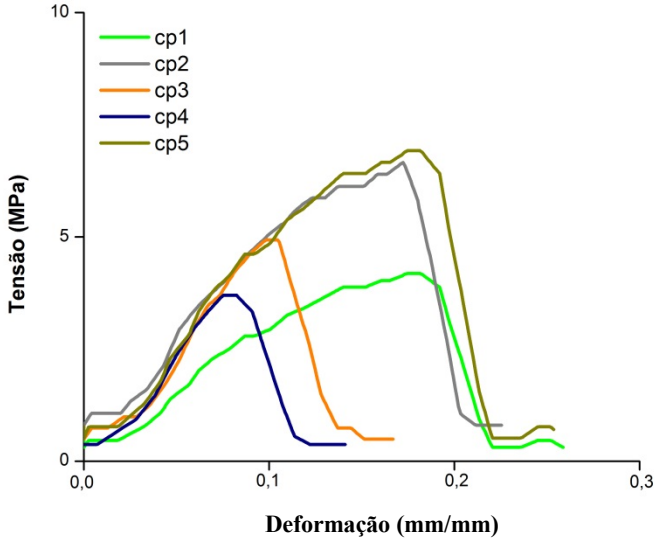


Fonte: O autor (2019)

Tabela 45- Resultados de propriedades mecânicas da amostra PBATNAT.

Corpo de prova	Espessura (mm)	Resistência à tração (MPa)	Alongamento (%)	Módulo de Young (MPa)
cp1	0,037	17	249	74
cp2	0,042	18	267	55
cp3	0,037	13	452	68
cp4	0,041	14	411	86
cp5	0,041	18	270	65

Figura 46- Curva tensão x deformação da amostra PBATUVA.



Fonte: O autor (2019)

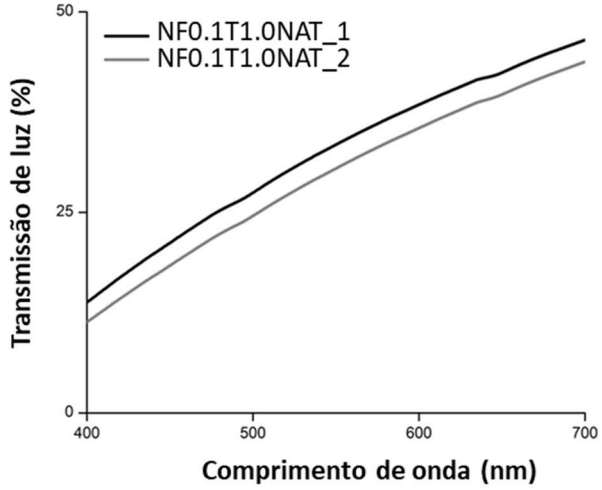
Tabela 46 - Resultados de propriedades mecânicas da amostra PBATUVA.

Corpo de prova	Espessura (mm)	Resistência à tração (MPa)	Alongamento (%)	Módulo de Young (MPa)
cp1	0,024	4	19	28
cp2	0,025	7	19	42
cp3	0,027	5	11	44
cp4	0,036	4	10	43
cp5	0,026	7	20	44

Fonte: o autor (2019)

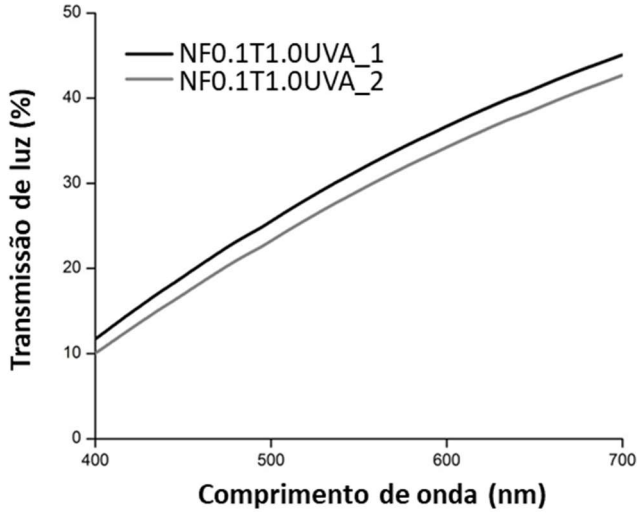
APÊNDICE G - RESULTADOS DE TRANSMISSÃO DE LUZ

Figura 1 – Resultados de transmissão de luz da amostra NF0.1T1.0NAT.



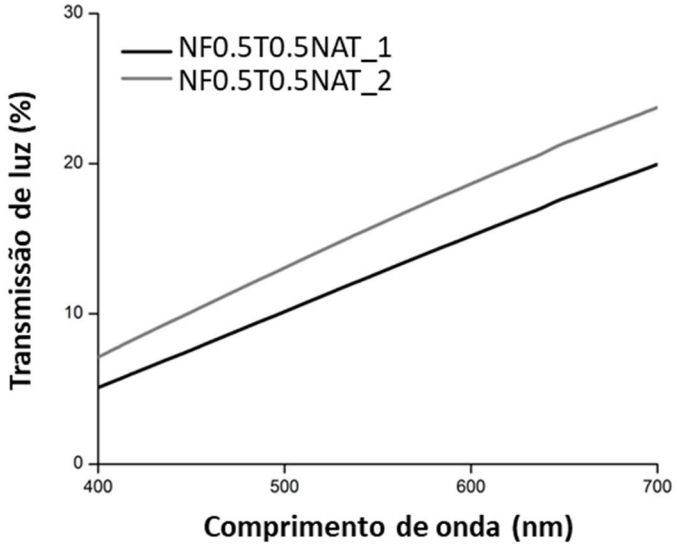
Fonte: O autor (2019)

Figura 2- Resultados de transmissão de luz da amostra NF0.1T1.0UVA.



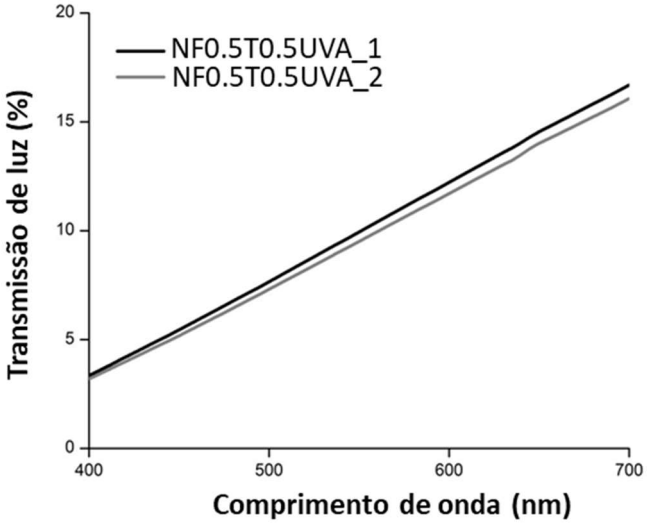
Fonte: O autor (2019)

Figura 3 - Resultados de transmissão de luz da amostra NF0.5T0.5NAT.



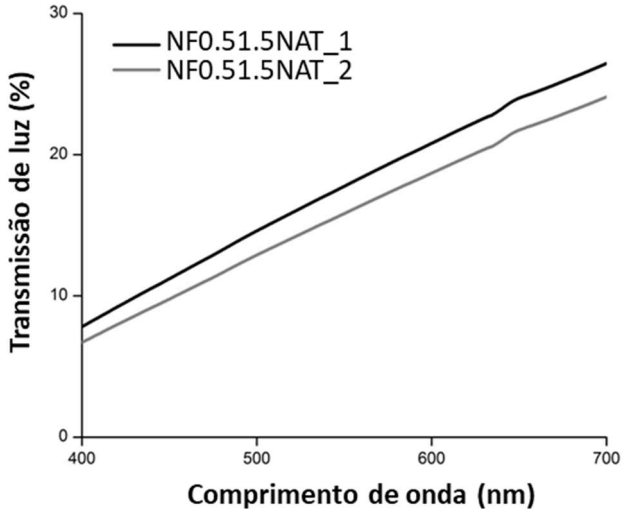
Fonte: O autor (2019)

Figura 4 - Resultados de transmissão de luz da amostra NF0.5T0.5UVA.



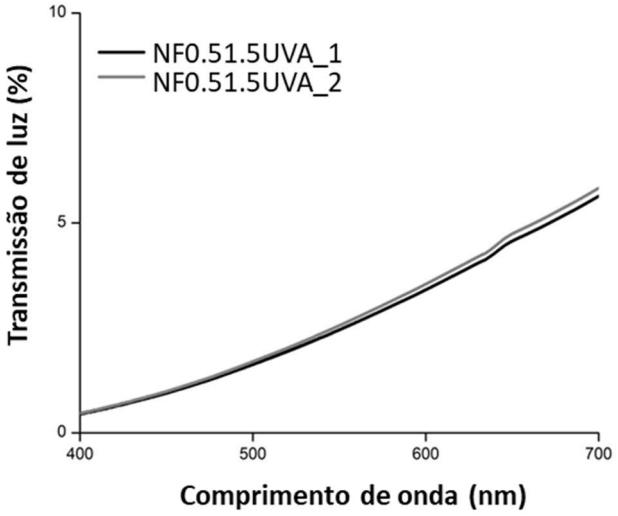
Fonte: O autor (2019)

Figura 5 - Resultados de transmissão de luz da amostra NF0.5T1.5NAT.



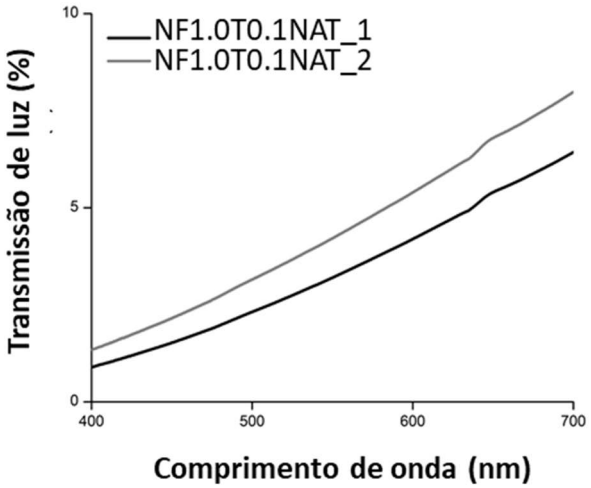
Fonte: O autor (2019)

Figura 6 - Resultados de transmissão de luz da amostra NF0.5T1.5UVA.



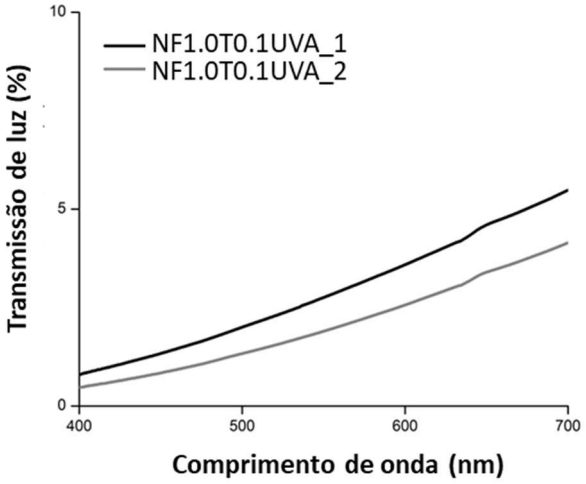
Fonte: O autor (2019)

Figura 7 - Resultados de transmissão de luz da amostra NF1.0T0.1NAT.



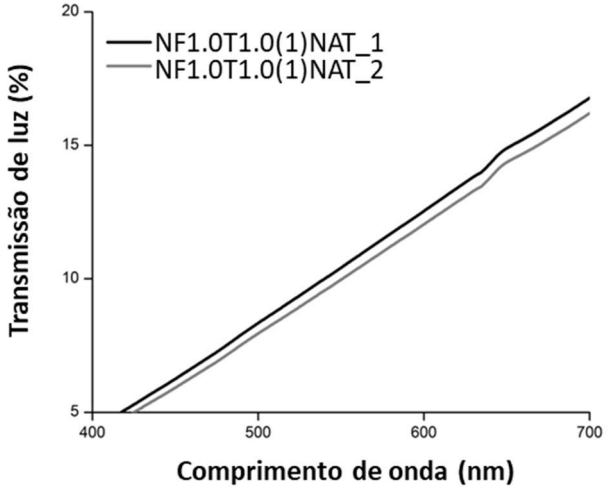
Fonte: O autor (2019)

Figura 8 - Resultados de transmissão de luz da amostra NF1.0T0.1UVA.



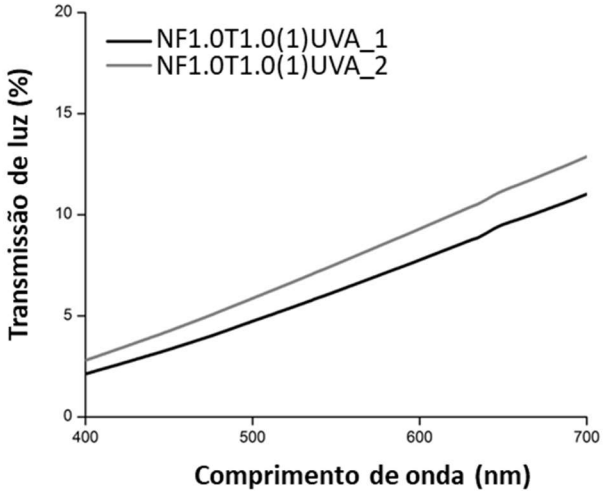
Fonte: O autor (2019)

Figura 9 - Resultados de transmissão de luz da amostra NF1.0T1.0(1)NAT.



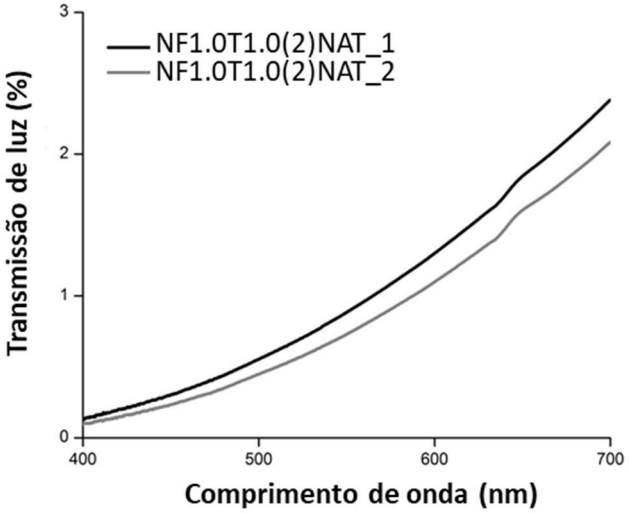
Fonte: O autor (2019)

Figura 10 - Resultados de transmissão de luz da amostra NF1.0T1.0(1)UVA.



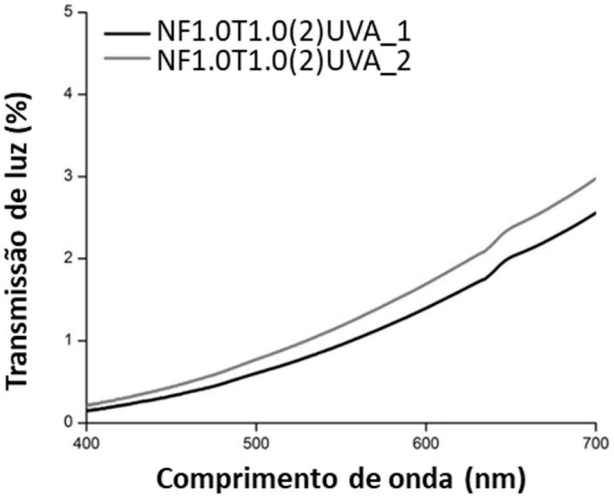
Fonte: O autor (2019)

Figura 11 - Resultados de transmissão de luz da amostra NF1.0T1.0(2)NAT.



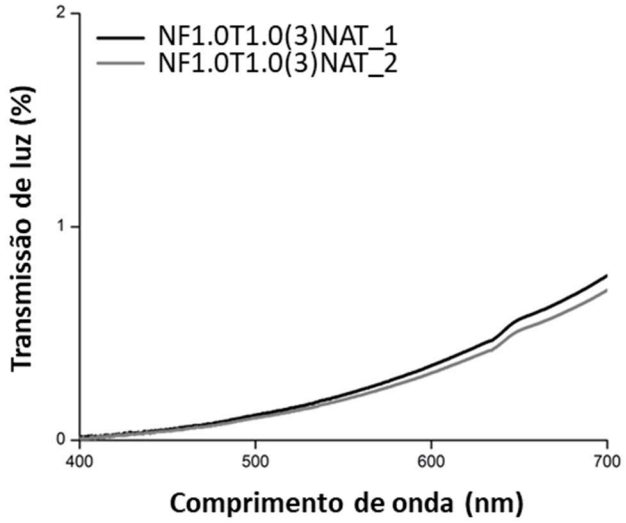
Fonte: O autor (2019)

Figura 12- Resultados de transmissão de luz da amostra NF1.0T1.0(2)UVA.



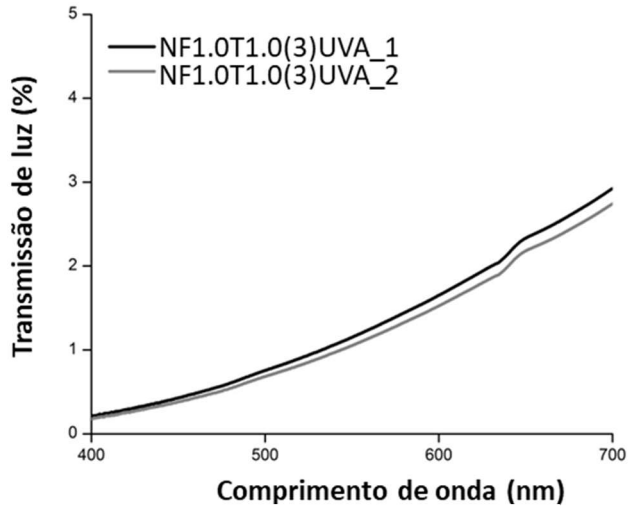
Fonte: O autor (2019)

Figura 13- Resultados de transmissão de luz da amostra NF1.0T1.0(3)NAT.



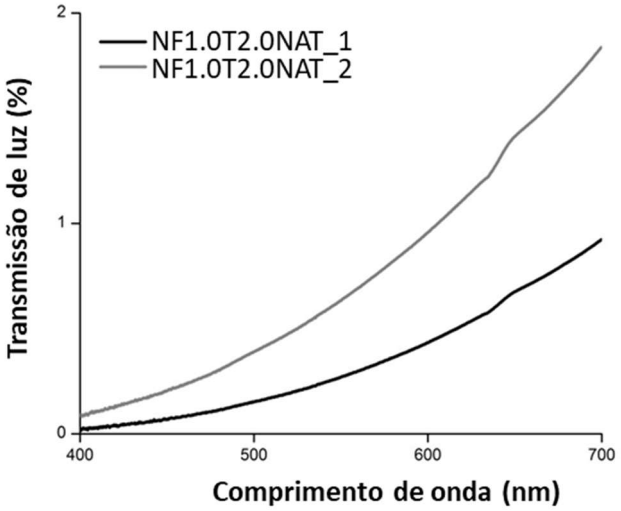
Fonte: O autor (2019)

Figura 14 - Resultados de transmissão de luz da amostra NF1.0T1.0(3)UVA.



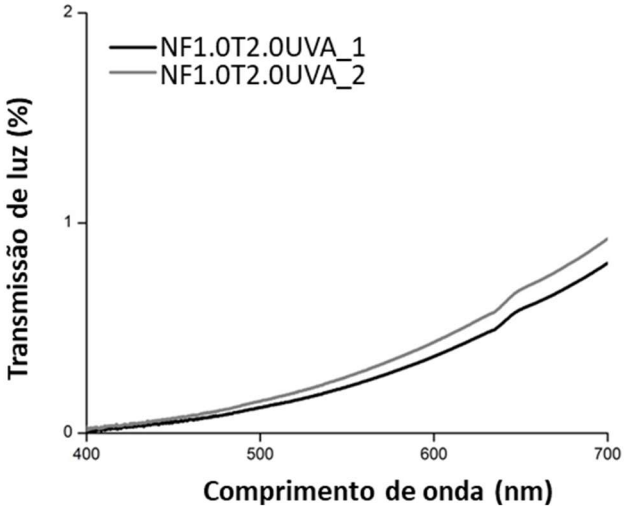
Fonte: O autor (2019)

Figura 15- Resultados de transmissão de luz da amostra NF1.0T2.0NAT.



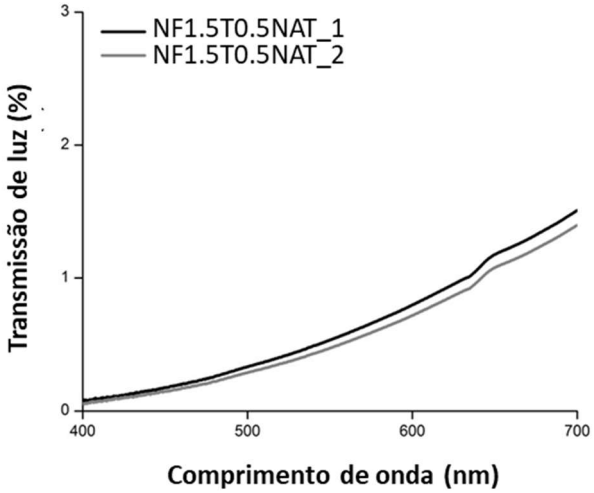
Fonte: O autor (2019)

Figura 16 - Resultados de transmissão de luz da amostra NF1.0T2.0UVA.



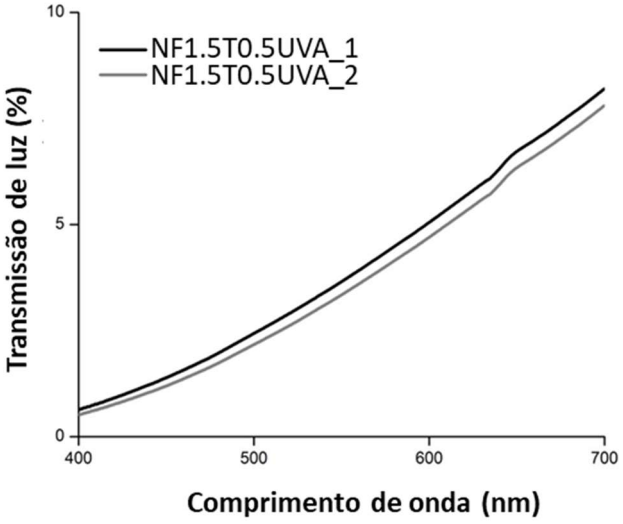
Fonte: O autor (2019)

Figura 17 - Resultados de transmissão de luz da amostra NF1.5T0.5NAT.



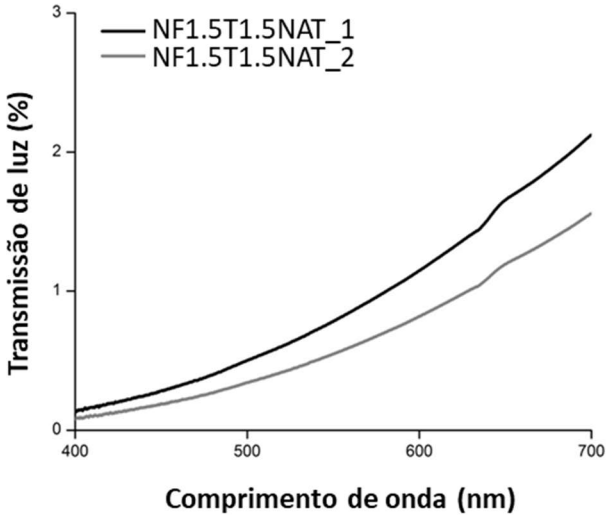
Fonte: O autor (2019)

Figura 18 - Resultados de transmissão de luz da amostra NF1.5T0.5UVA.



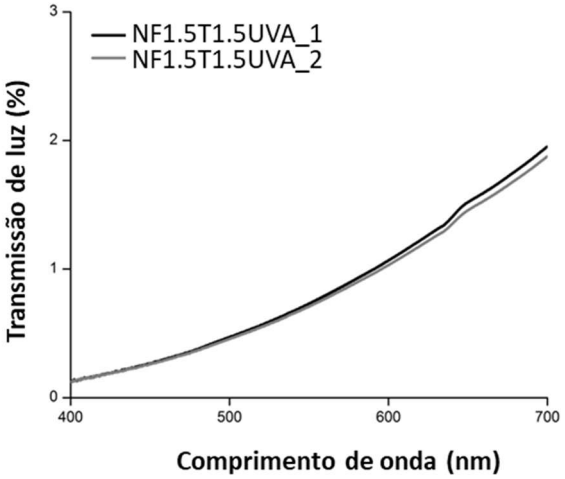
Fonte: O autor (2019)

Figura 19- Resultados de transmissão de luz da amostra NF1.5T1.5NAT.



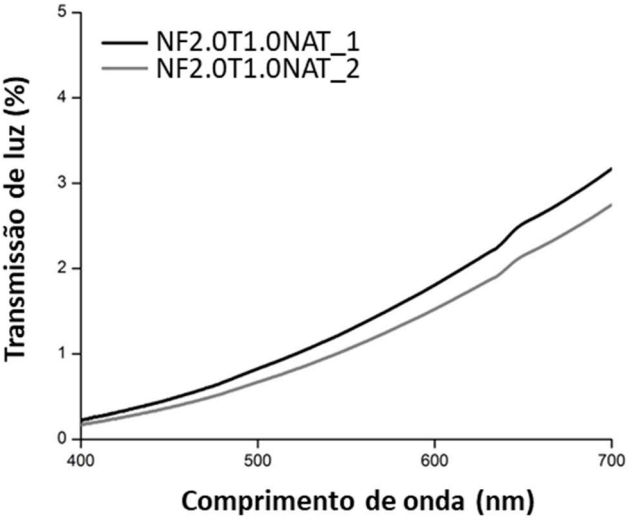
Fonte: O autor (2019)

Figura 20 – Resultados de transmissão de luz da amostra NF1.5T1.5UVA.



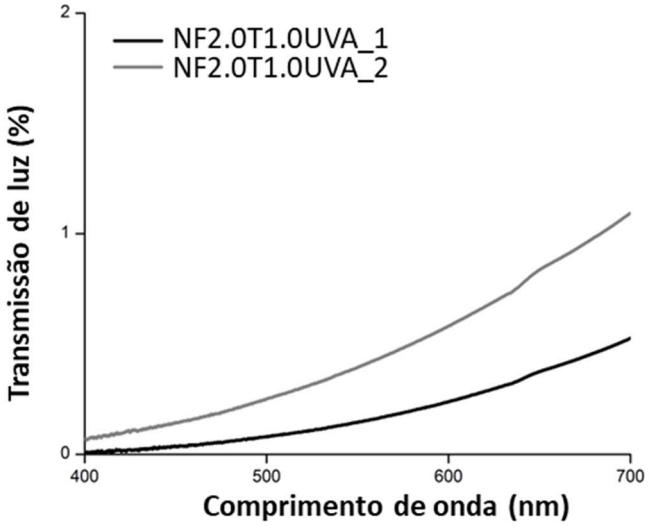
Fonte: O autor (2019)

Figura 21- Resultados de transmissão de luz da amostra NF2.0T1.0NAT.



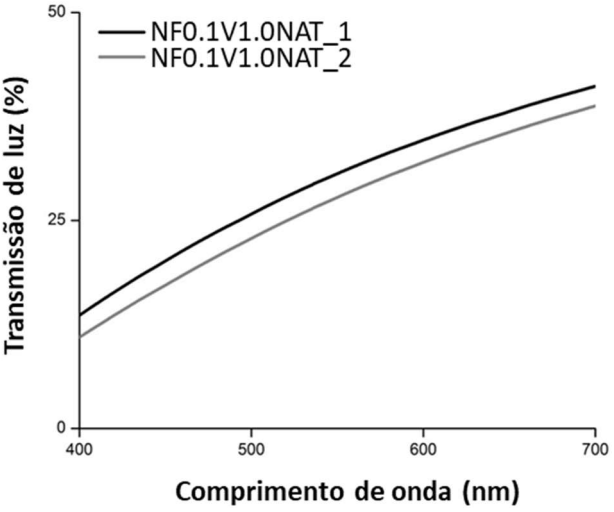
Fonte: O autor (2019)

Figura 22 - Resultados de transmissão de luz da amostra NF2.0T1.0UVA.



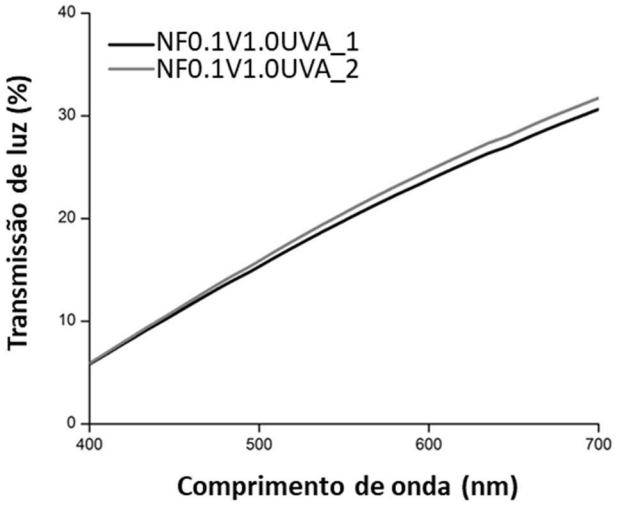
Fonte: O autor (2019)

Figura 23- Resultados de transmissão de luz da amostra NF0.1V1.0NAT.



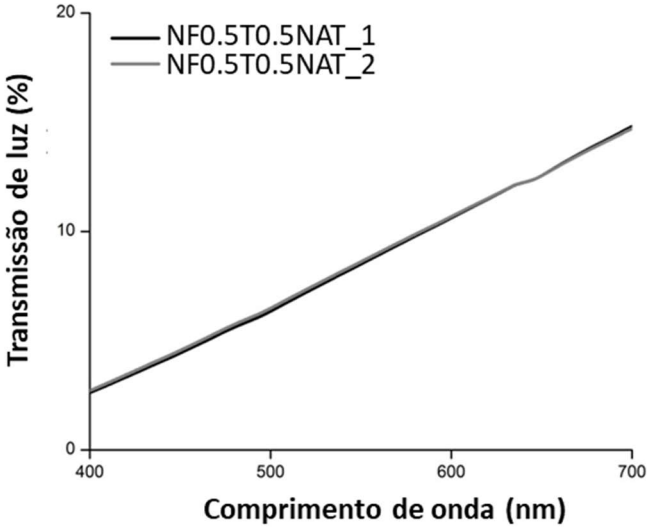
Fonte: O autor (2019)

Figura 24- Resultados de transmissão de luz da amostra NF0.1V1.0UVA.



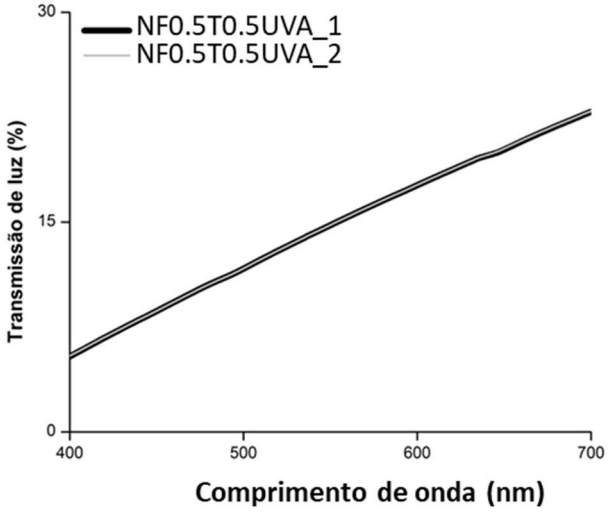
Fonte: O autor (2019)

Figura 25- Resultados de transmissão de luz da amostra NF0.5V0.5NAT.



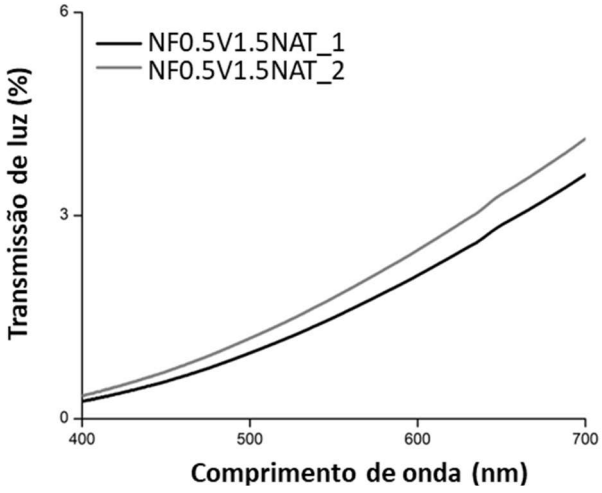
Fonte: O autor (2019)

Figura 26- Resultados de transmissão de luz da amostra NF0.5V0.5UVA.



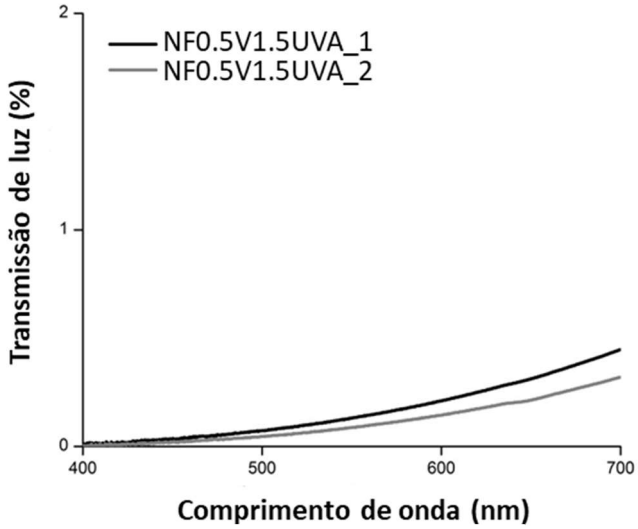
Fonte: O autor (2019)

Figura 27 - Resultados de transmissão de luz da amostra NF0.5V1.5NAT.



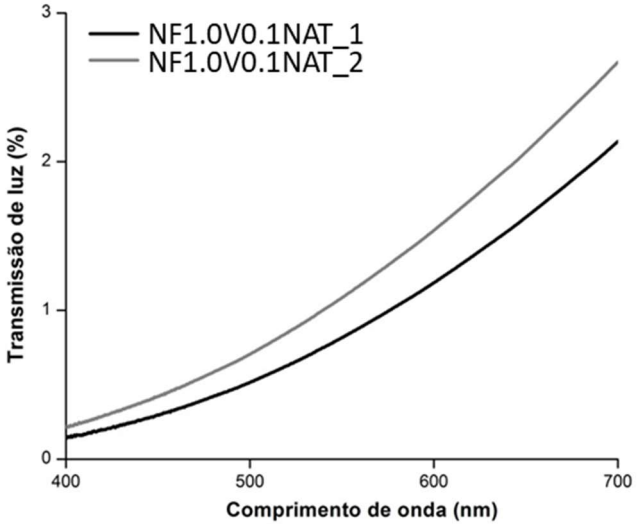
Fonte: O autor (2019)

Figura 28 - Resultados de transmissão de luz da amostra NF0.5V1.5UVA.



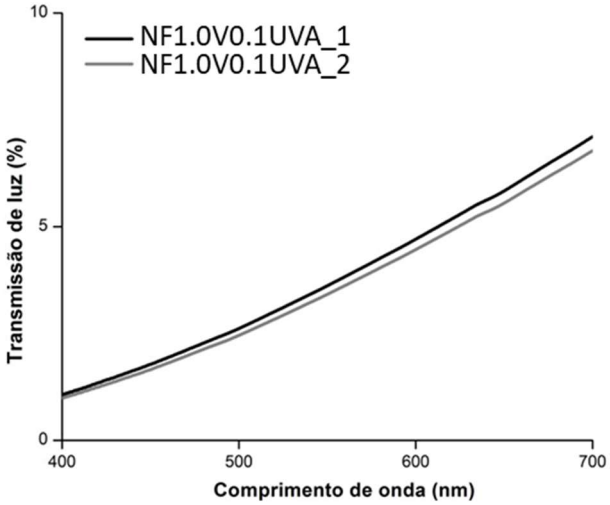
Fonte: O autor (2019)

Figura 29- Resultados de transmissão de luz da amostra NF1.0V0.1NAT.



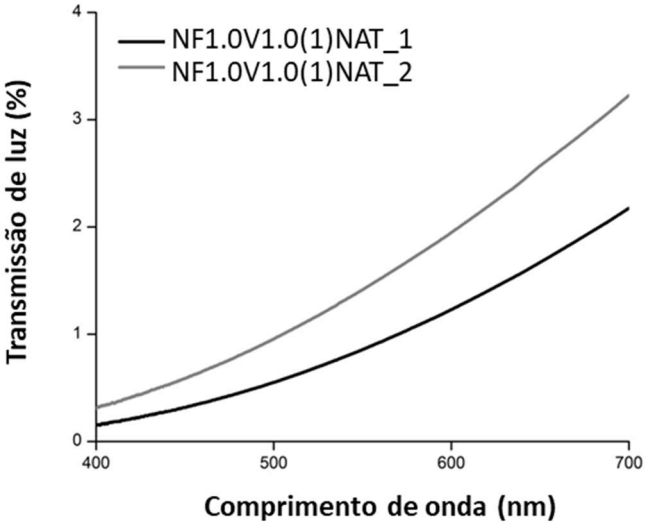
Fonte: O autor (2019)

Figura 30 - Resultados de transmissão de luz da amostra NF1.0V0.1UVA.



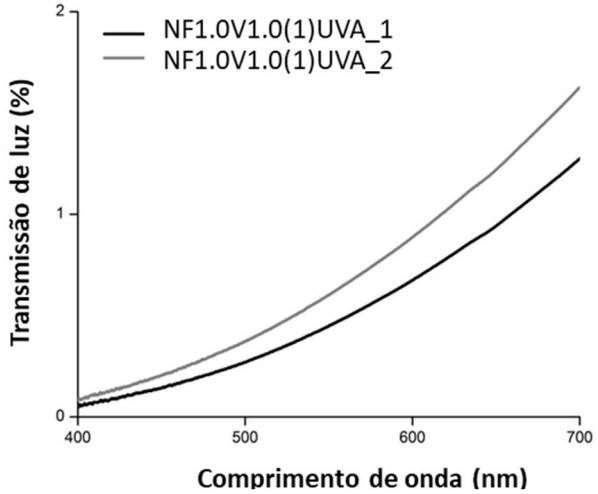
Fonte: O autor (2019)

Figura 31 - Resultados de transmissão de luz da amostra NF1.0V1.0(1)NAT.



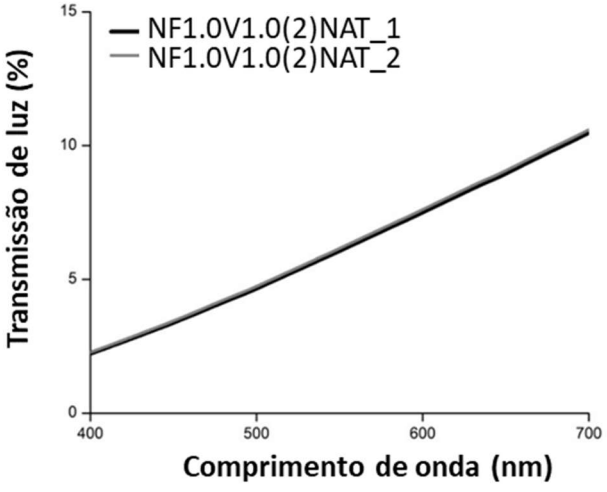
Fonte: O autor (2019)

Figura 32- Resultados de transmissão de luz da amostra NF1.0V1.0(1)UVA.



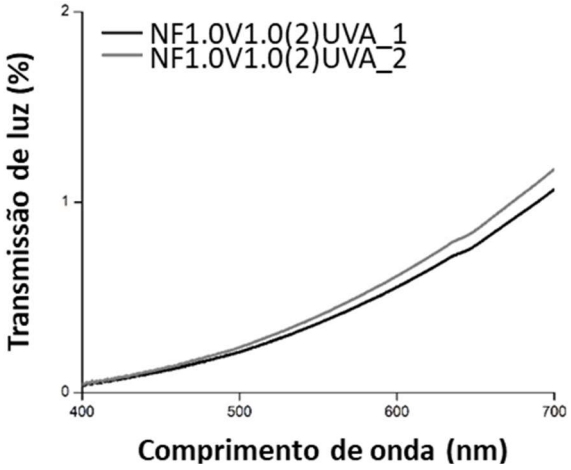
Fonte: O autor (2019)

Figura 33- Resultados de transmissão de luz da amostra NF1.0V1.0(2)NAT.



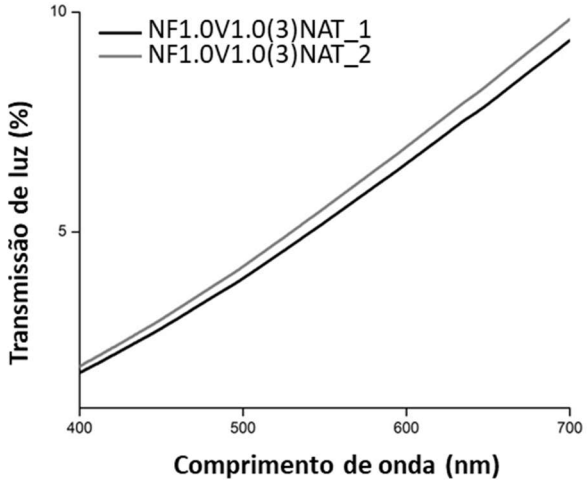
Fonte: O autor (2019)

Figura 34– Resultados de transmissão de luz da amostra NF1.0V1.0(2)UVA.



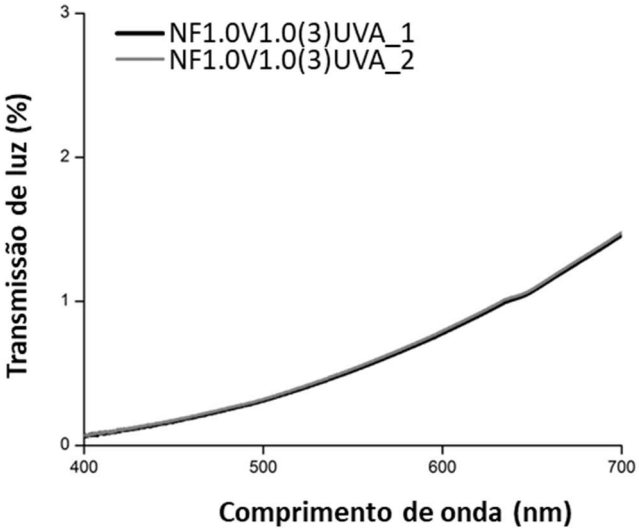
Fonte: O autor (2019)

Figura 35 - Resultados de transmissão de luz da amostra NF1.0V1.0(3)NAT.



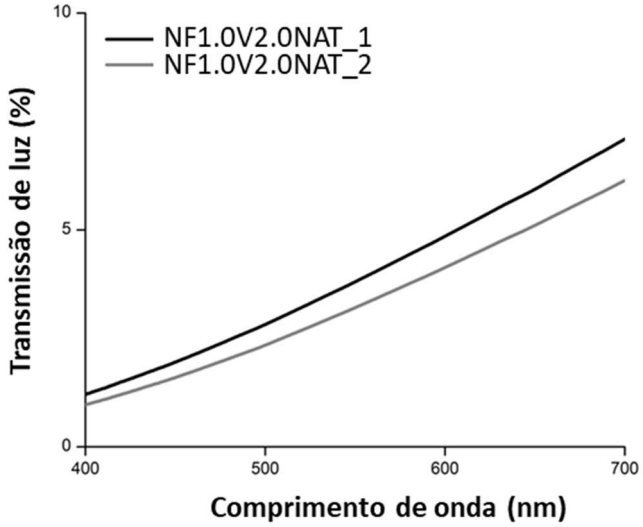
Fonte: O autor (2019)

Figura 36- Resultados de transmissão de luz da amostra NF1.0V1.0(3)UVA.



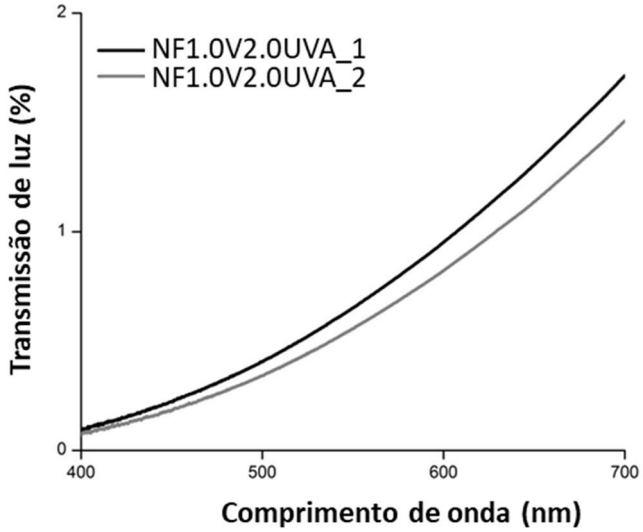
Fonte: O autor (2019)

Figura 37 - Resultados de transmissão de luz da amostra NF1.0V2.0NAT



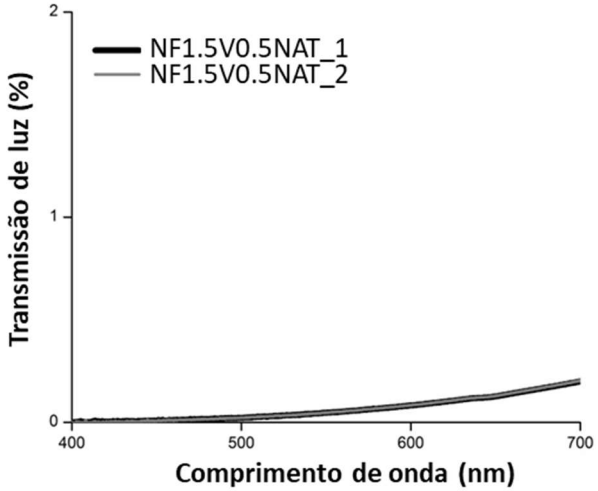
Fonte: O autor (2019)

Figura 38 - Resultados de transmissão de luz da amostra NF1.0V2.0UVA.



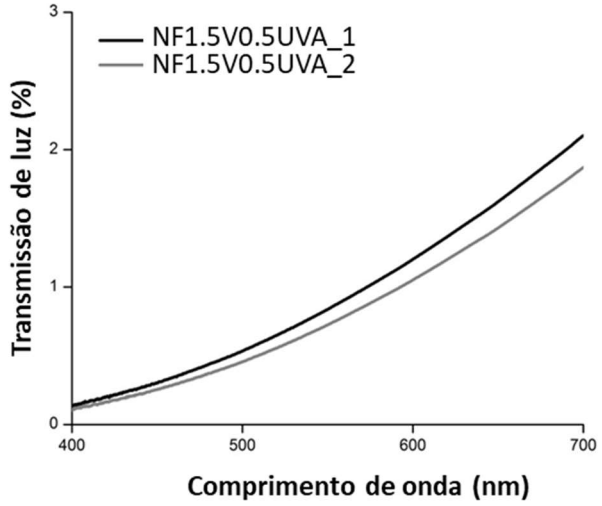
Fonte: O autor (2019)

Figura 39 - Resultados de transmissão de luz da amostra NF1.5V0.5NAT.



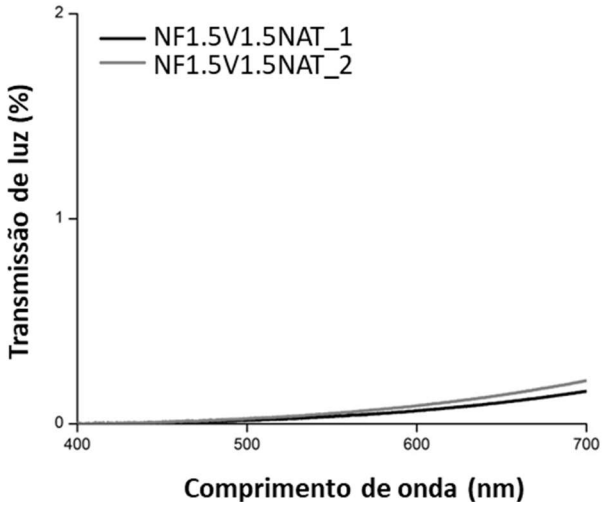
Fonte: O autor (2019)

Figura 40 - Resultados de transmissão de luz da amostra NF1.5V0.5UVA.



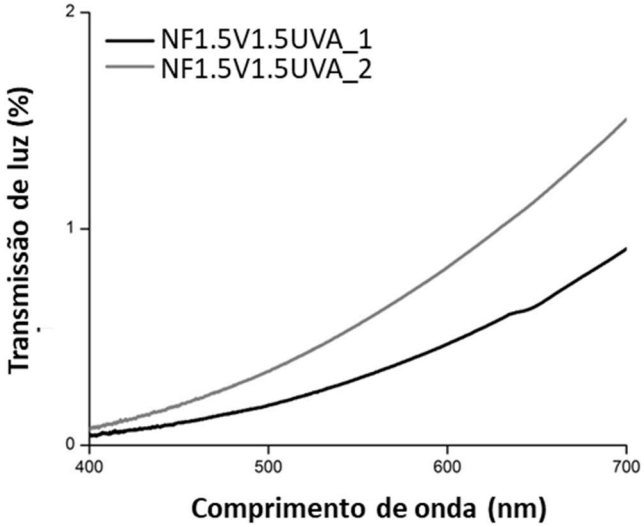
Fonte: O autor (2019)

Figura 41 - Resultados de transmissão de luz da amostra NF1.5V1.5NAT.



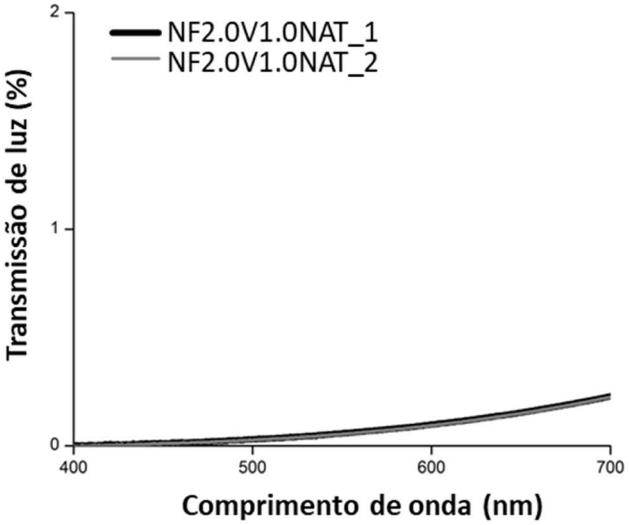
Fonte: O autor (2019)

Figura 42 - Resultados de transmissão de luz da amostra NF1.5V1.5UVA.



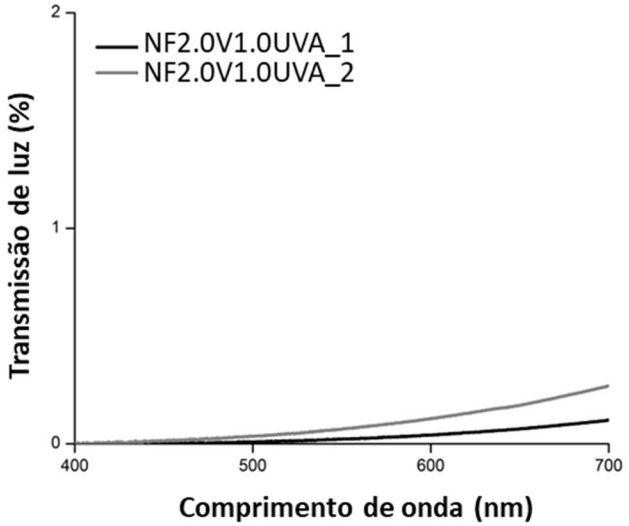
Fonte: O autor (2019)

Figura 43 - Resultados de transmissão de luz da amostra NF2.0V1.0NAT.



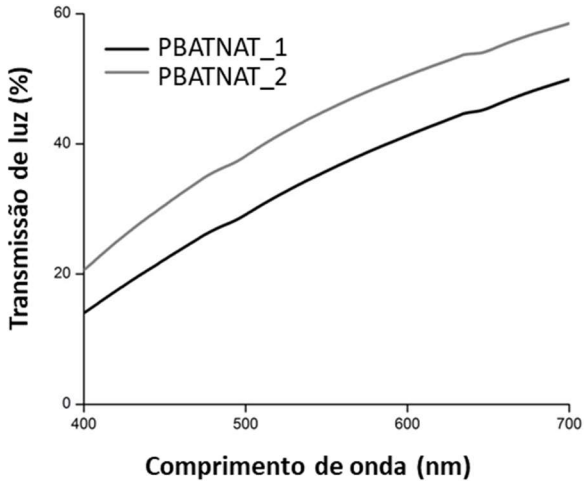
Fonte: O autor (2019)

Figura 44 - Resultados de transmissão de luz da amostra NF2.0V1.0UVA.



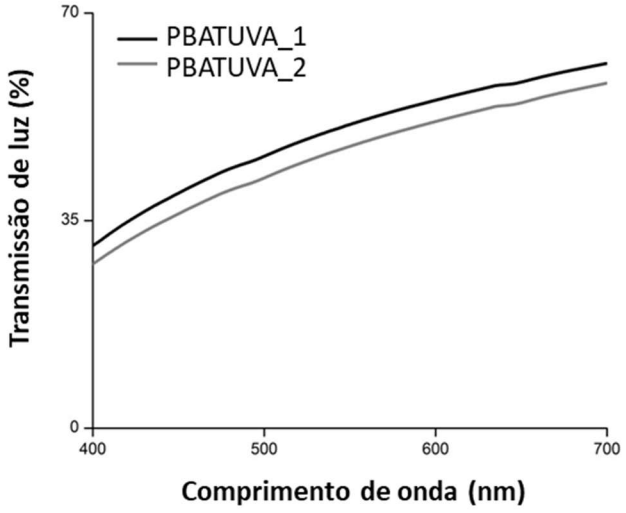
Fonte: O autor (2019)

Figura 45 - Resultados de transmissão de luz da amostra PBATNAT.



Fonte: O autor (2019)

Figura 46- Resultados de transmissão de luz da amostra PBATUVA.



Fonte: O autor (2019)

APÊNDICE H - RESULTADOS DO ENSAIO DE BIODEGRADAÇÃO EM SOLO

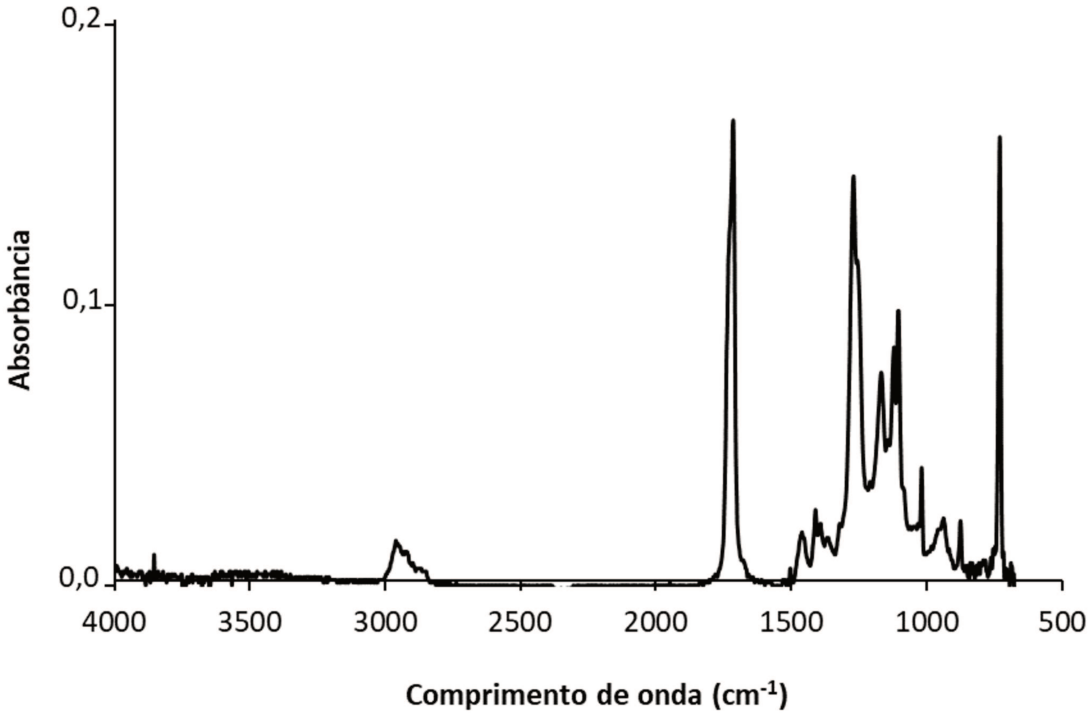
Tabela 1– Resultados de mineralização acumulada para amostras envelhecidas de PBAT (com e sem aditivos) e celulose.

Tempo (dias)	Amostras			
	PBAT	**NF1.5T1.5UVA**	**NF1.5V1.5UVA**	**celulose**
3	2,3 ± 0,0	1,1 ± 0,3	1,5 ± 0,2	4,7 ± 1,5
7	4,1 ± 0,7	1,9 ± 0,8	2,4 ± 0,1	7,4 ± 1,2
11	5,2 ± 0,7	2,2 ± 0,9	2,9 ± 0,2	9,6 ± 1,3
15	6,1 ± 0,7	2,5 ± 1,1	3,3 ± 0,2	12,1 ± 1,3
22	6,9 ± 0,7	2,7 ± 1,1	3,8 ± 0,3	16,1 ± 1,5
29	7,2 ± 0,9	2,8 ± 1,1	4,2 ± 0,1	20,4 ± 1,8
36	7,3 ± 1,0	2,8 ± 1,1	4,3 ± 0,2	24,6 ± 1,6
43	8,6 ± 0,5	3,4 ± 0,6	5,6 ± 0,1	29,8 ± 0,6
50	10,0 ± 0,5	4,1 ± 0,7	7,0 ± 0,1	34,0 ± 0,2
57	10,5 ± 0,5	4,3 ± 0,9	7,4 ± 0,2	38,5 ± 2,8
64	11,7 ± 0,2	4,7 ± 1,5	8,1 ± 0,6	41,8 ± 3,0
71	12,2 ± 0,2	4,9 ± 1,8	8,9 ± 0,6	44,6 ± 2,6
77	12,7 ± 0,3	5,4 ± 1,8	9,6 ± 1,1	47,9 ± 2,0
84	12,9 ± 0,4	5,8 ± 1,9	10,1 ± 1,1	50,3 ± 1,8
91	12,9 ± 0,3	6,1 ± 1,8	10,6 ± 1,4	52,4 ± 2,5
98	13,2 ± 0,1	6,4 ± 1,6	10,9 ± 1,8	54,2 ± 2,8
105	13,4 ± 0,2	6,7 ± 1,7	11,5 ± 2,2	55,9 ± 3,2
112	13,9 ± 0,6	7,4 ± 2,1	12,0 ± 3,0	57,4 ± 3,5
119	14,2 ± 1,1	7,7 ± 2,5	12,1 ± 3,0	58,9 ± 3,7
126	14,4 ± 1,3	8,2 ± 3,2	12,6 ± 3,0	60,5 ± 3,7
133	15,2 ± 1,8	8,4 ± 3,5	12,8 ± 3,0	61,5 ± 3,0
140	15,6 ± 2,0	9,0 ± 4,3	13,2 ± 3,3	63,1 ± 3,3
147	16,1 ± 2,6	10,0 ± 4,3	13,8 ± 3,2	64,3 ± 3,5
154	16,6 ± 3,3	10,8 ± 4,7	14,2 ± 3,7	65,3 ± 4,3
161	16,7 ± 3,5	11,8 ± 4,7	14,5 ± 4,1	66,4 ± 5,2
168	16,9 ± 3,8	12,4 ± 4,8	15,1 ± 4,5	67,3 ± 5,7
175	17,4 ± 4,0	13,3 ± 5,0	15,3 ± 4,7	68,1 ± 6,2
182	18,0 ± 4,2	14,1 ± 5,4	15,8 ± 4,7	68,6 ± 6,6

Fonte: O autor (2019)

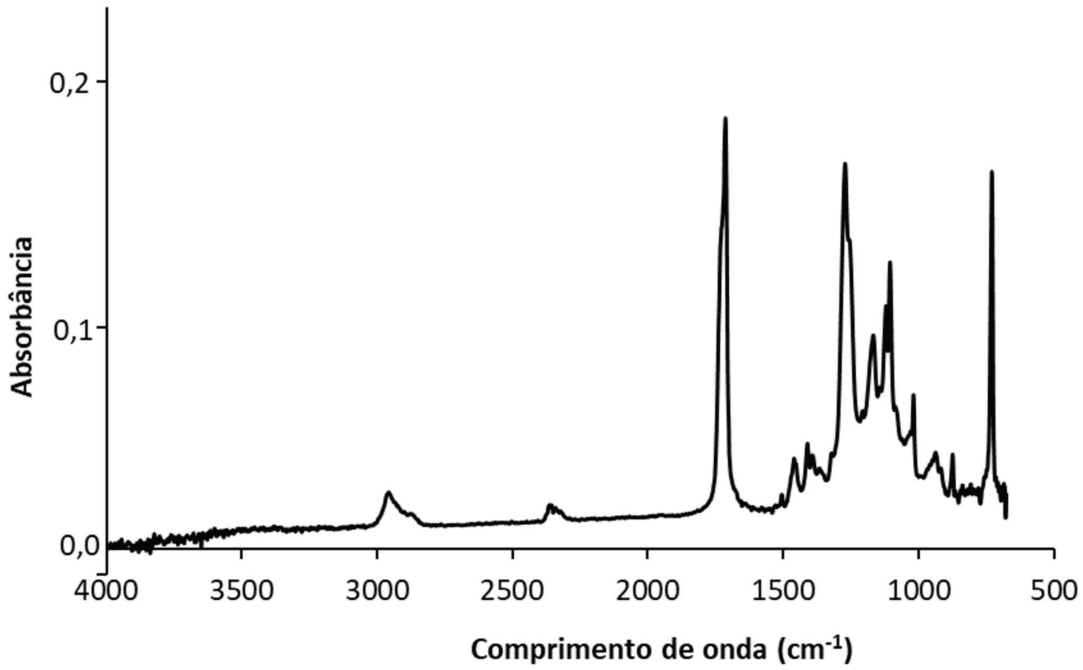
APÊNDICE I - ESPECTROS DE FTIR

Figura 1 – Espectro da amostra PBATNAT.



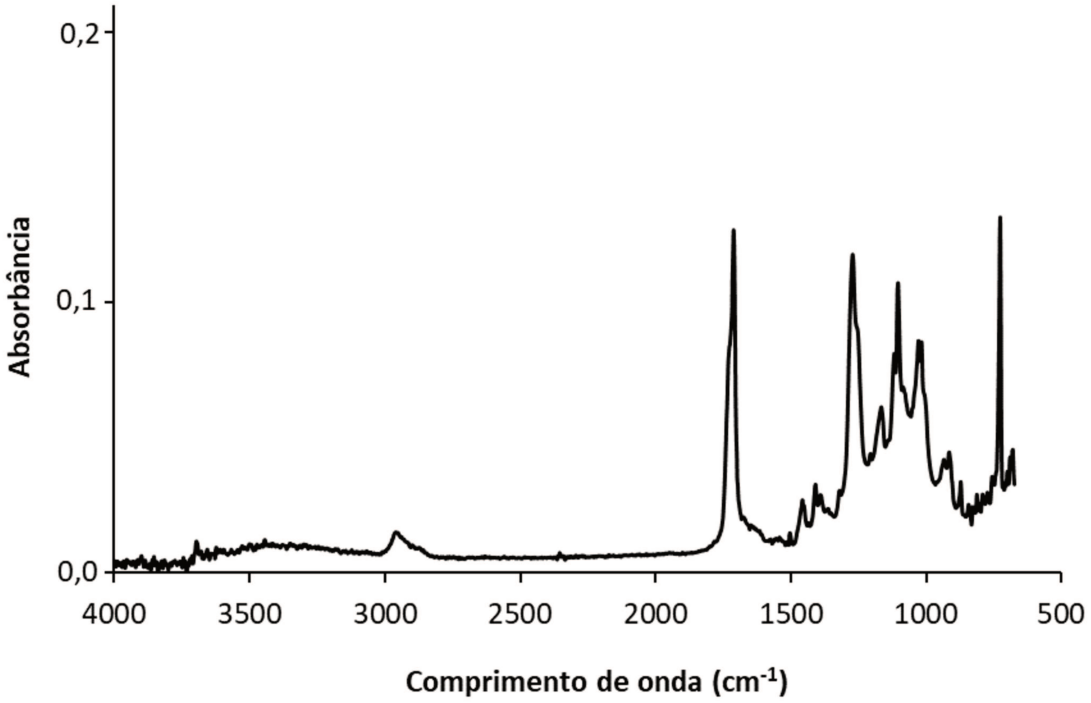
Fonte: O autor (2019)

Figura 2 – Espectro da amostra PBATUVA.



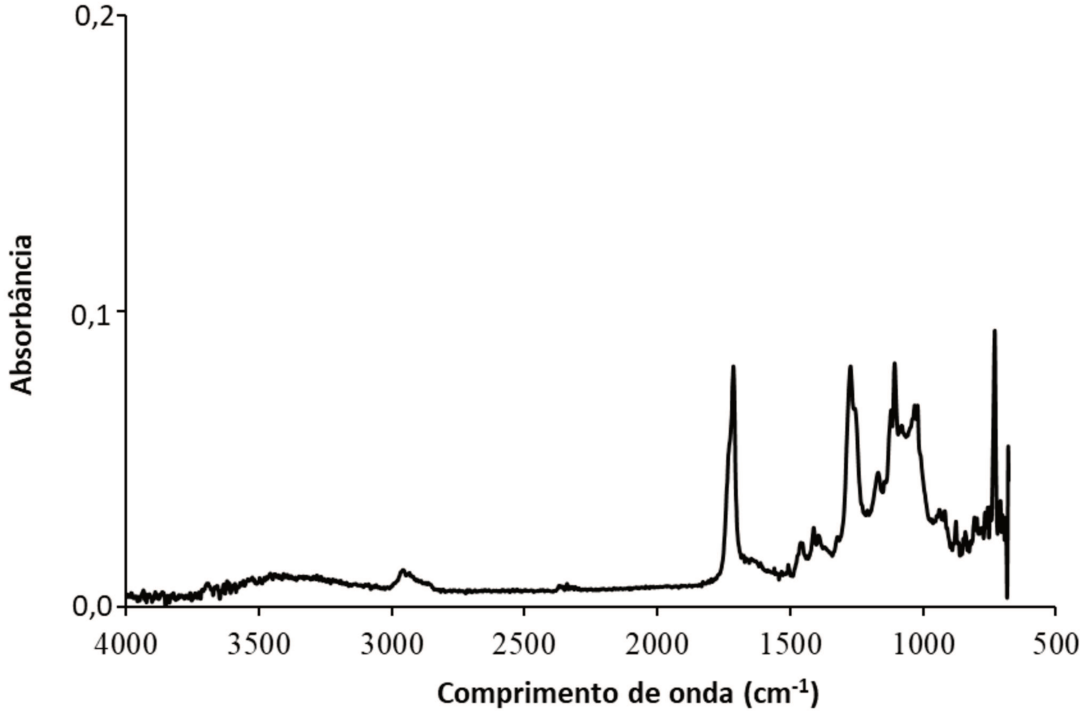
Fonte: O autor (2019)

Figura 3 - Espectro da amostra PBATUVA_solo15d.



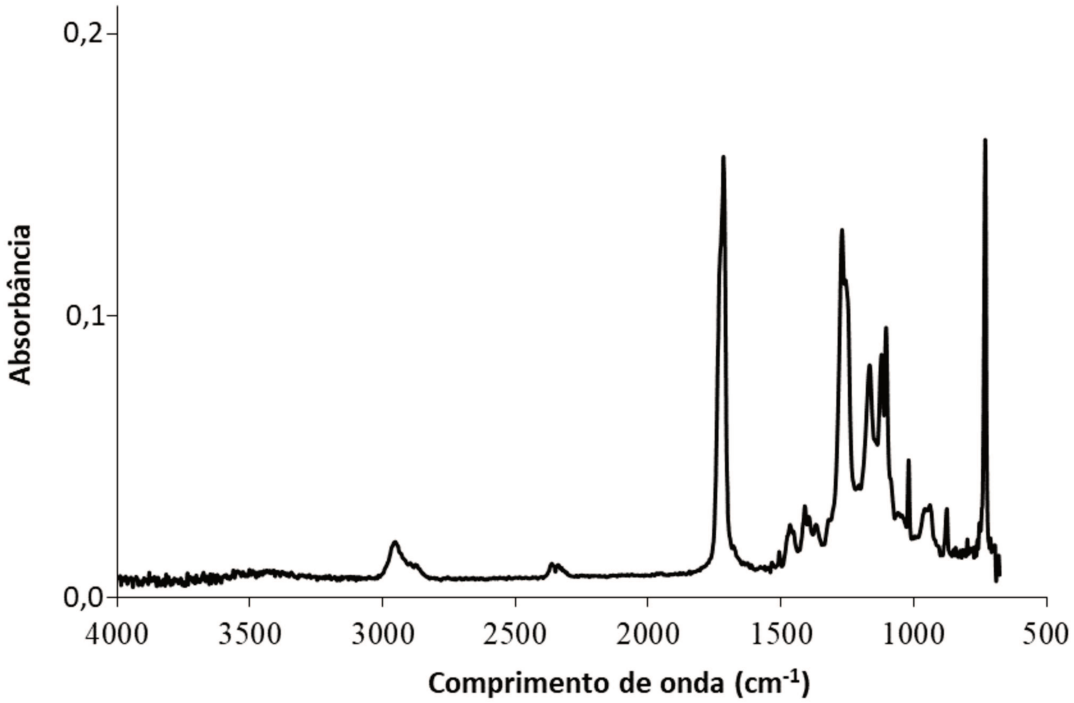
Fonte: O autor (2019)

Figura 4 – Espectro da amostra PBATUVA_solo4m.



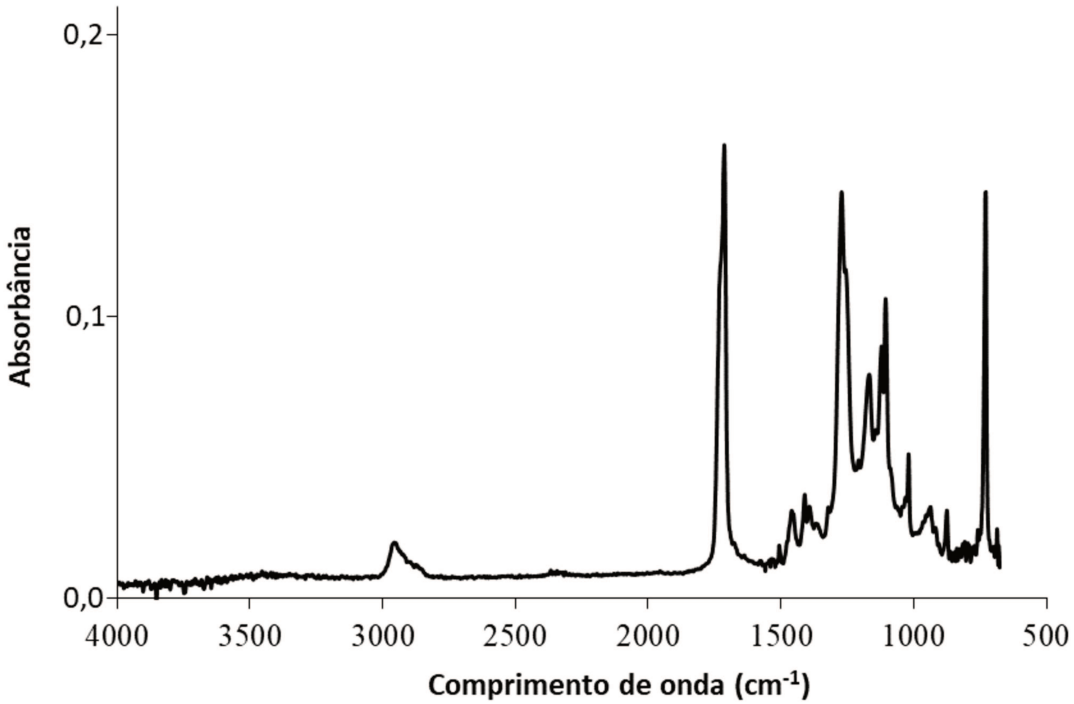
Fonte: O autor (2019)

Figura 5 – Espectro da amostra NF1.5T1.5NAT.



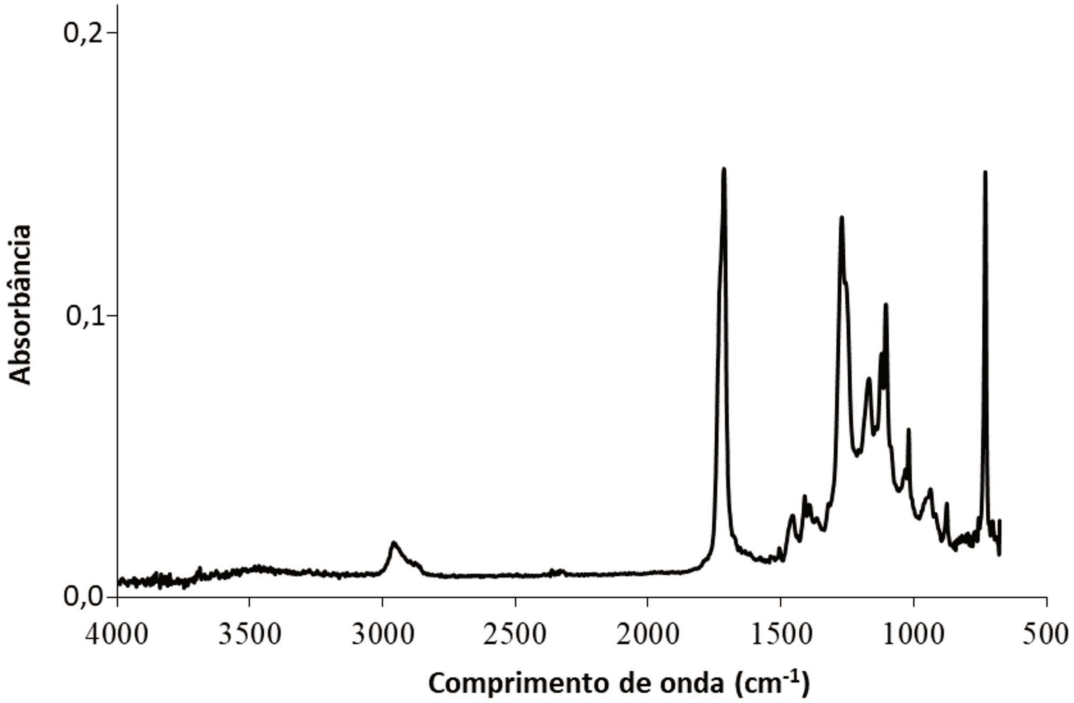
Fonte: O autor (2019)

Figura 6 – Espectro da amostra NF1.5T1.5UVA.



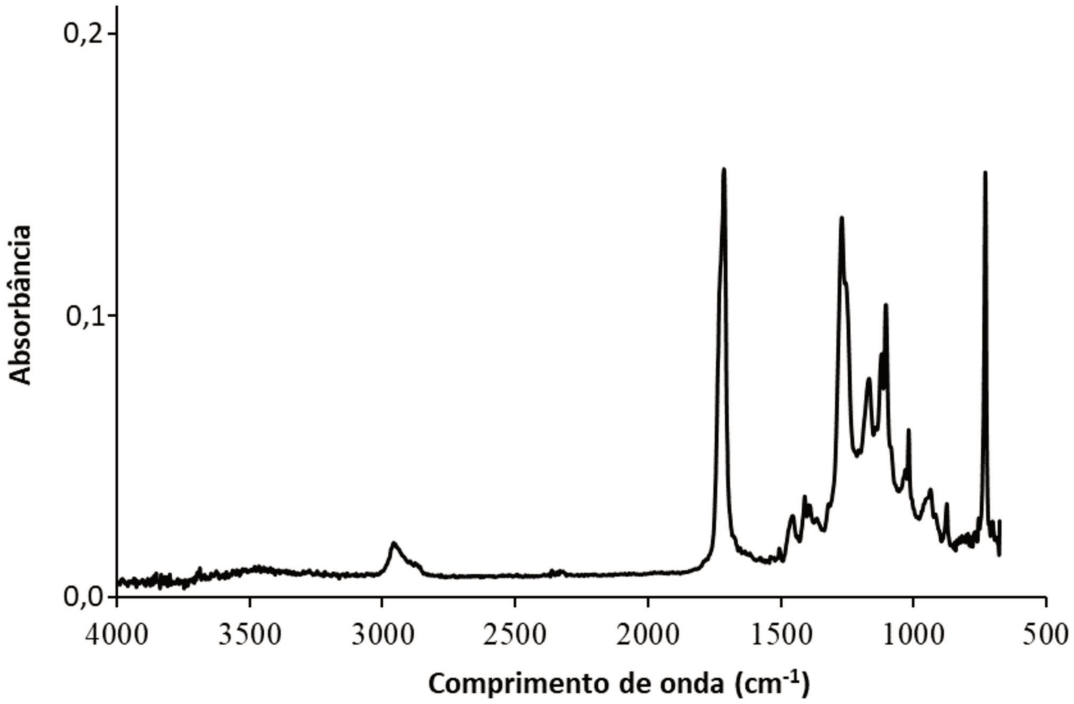
Fonte: O autor (2019)

Figura 7 – Espectro da amostra NF1.5T1.5UVA_solo15d.



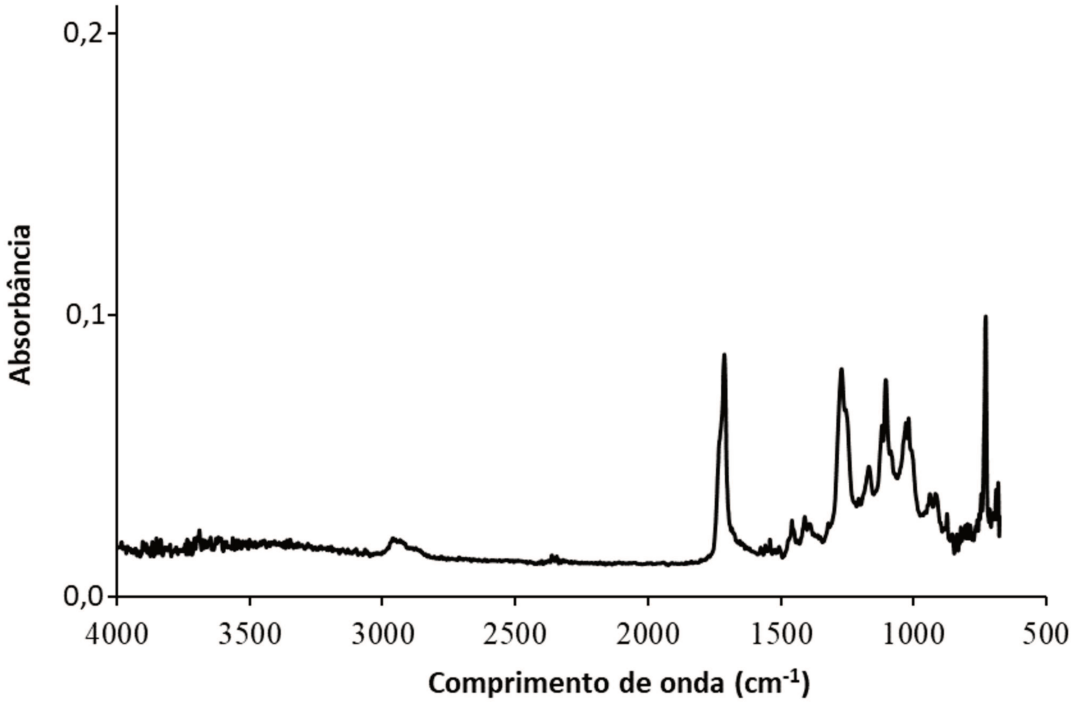
Fonte: O autor (2019)

Figura 8 – Espectro da amostra NF1.5T1.5_solo4m.



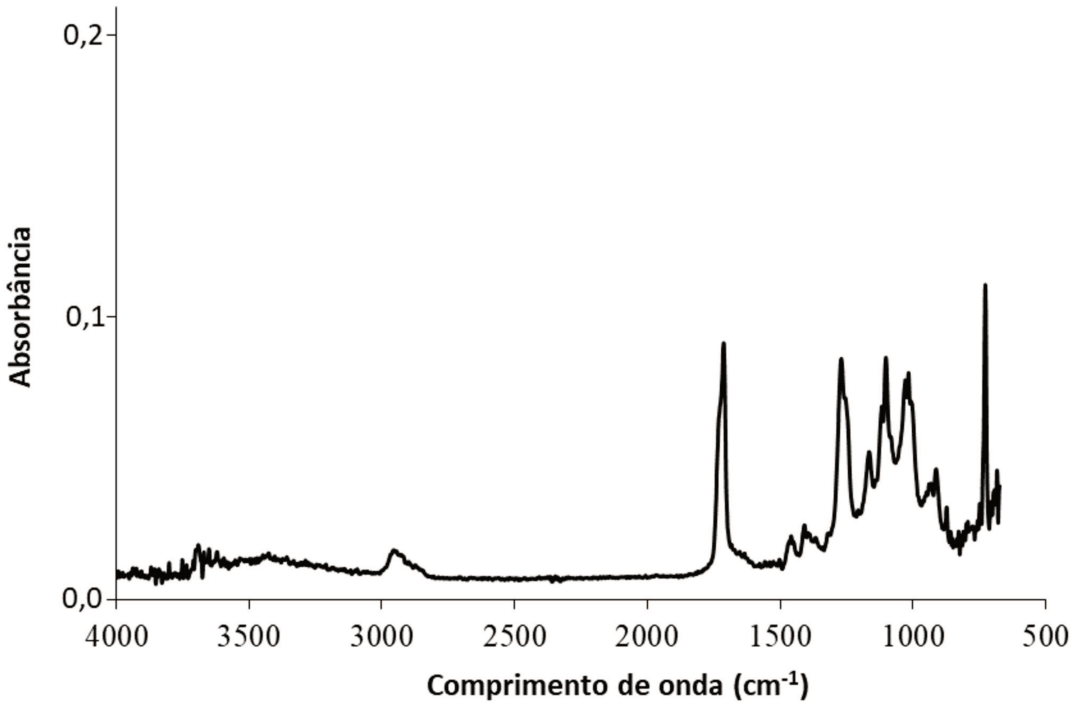
Fonte: O autor (2019)

Figura 9 – Espectro da amostra NF1.5T1.5UVA_solo8m.



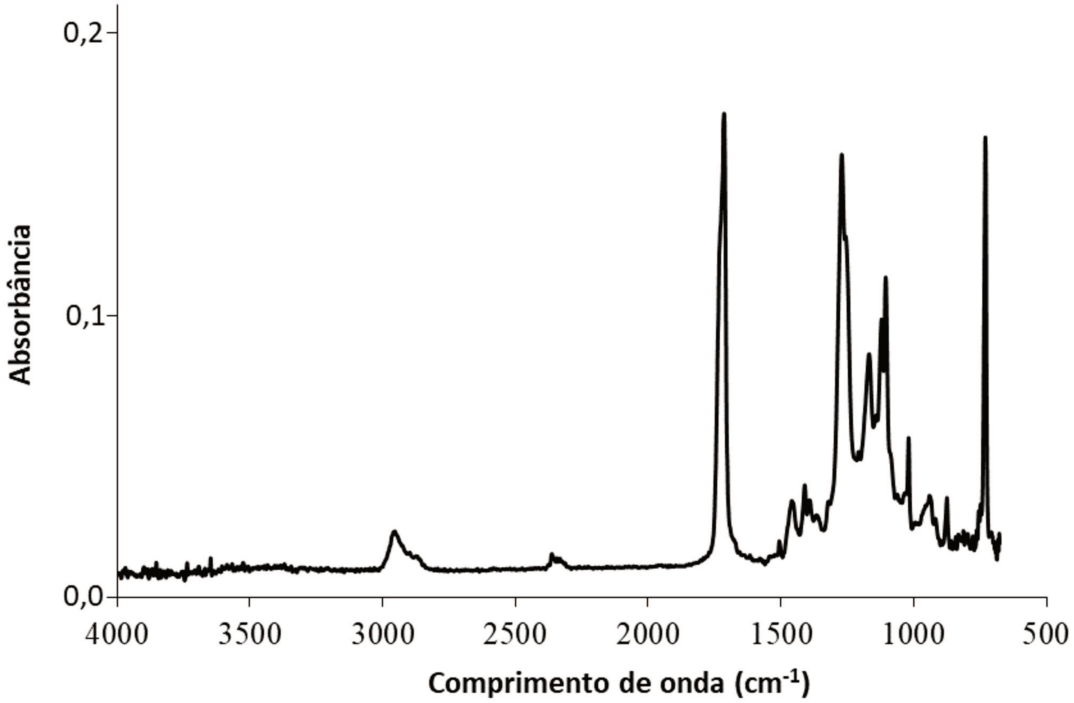
Fonte: O autor (2019)

Figura 10 – Espectro da amostra NF1.5T1.5UVA_solo12m.



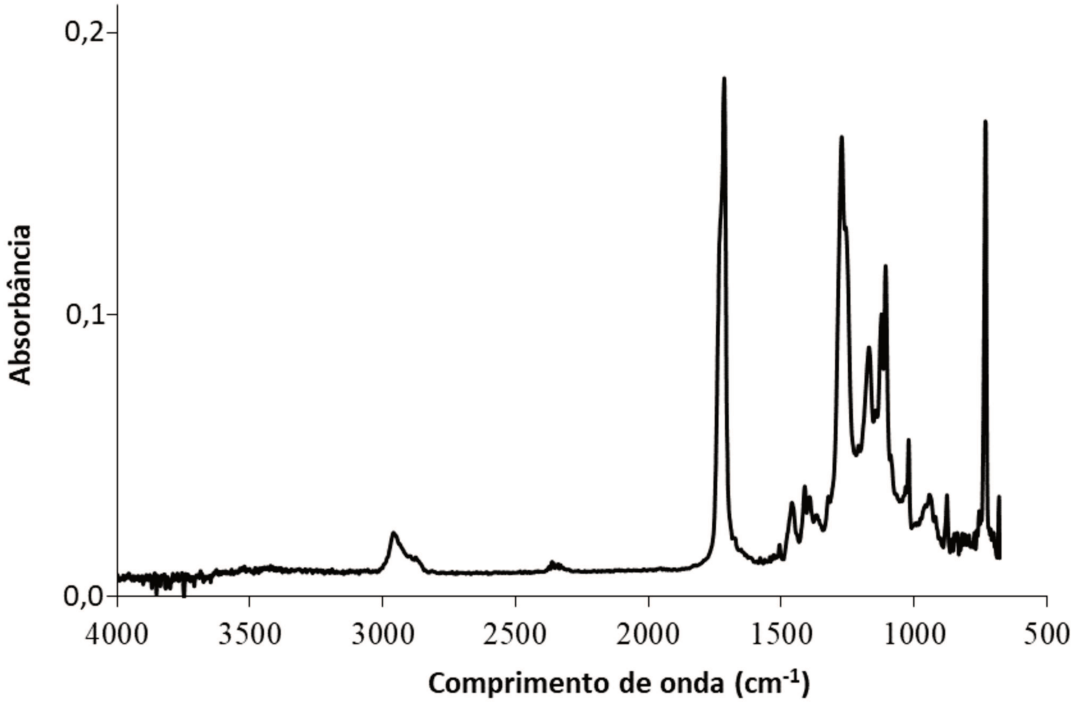
Fonte: O autor (2019)

Figura 11 – Espectro da amostra NF1.5T1.5NAT.



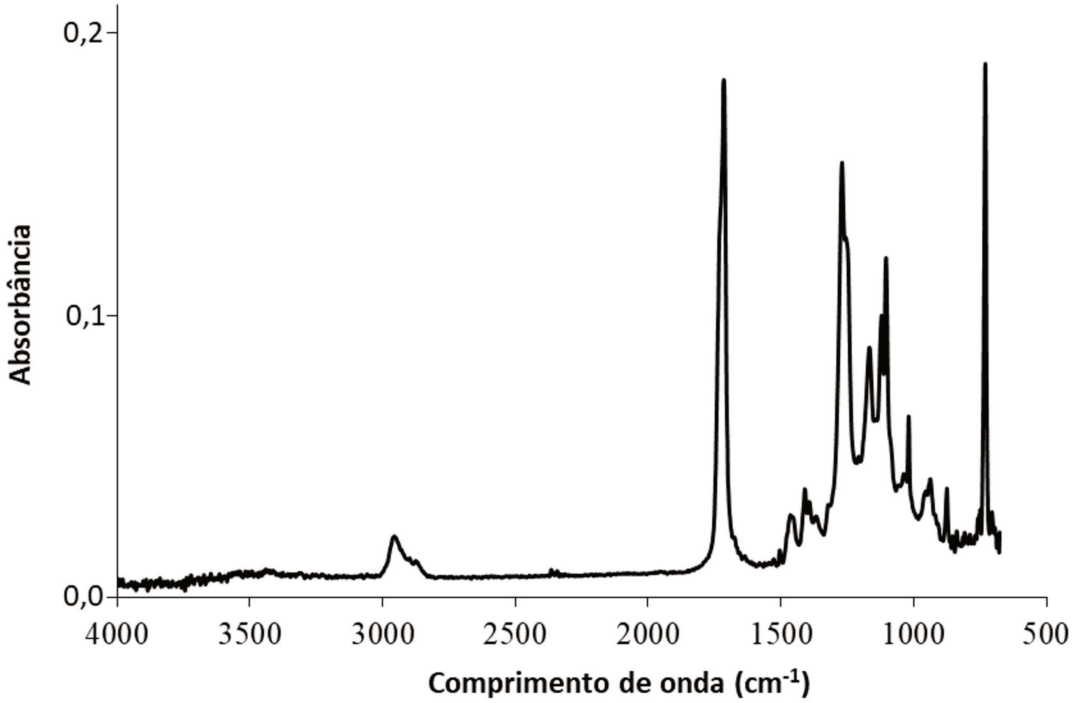
Fonte: O autor (2019)

Figura 12– Espectro da amostra NF1.5V1.5UVA.



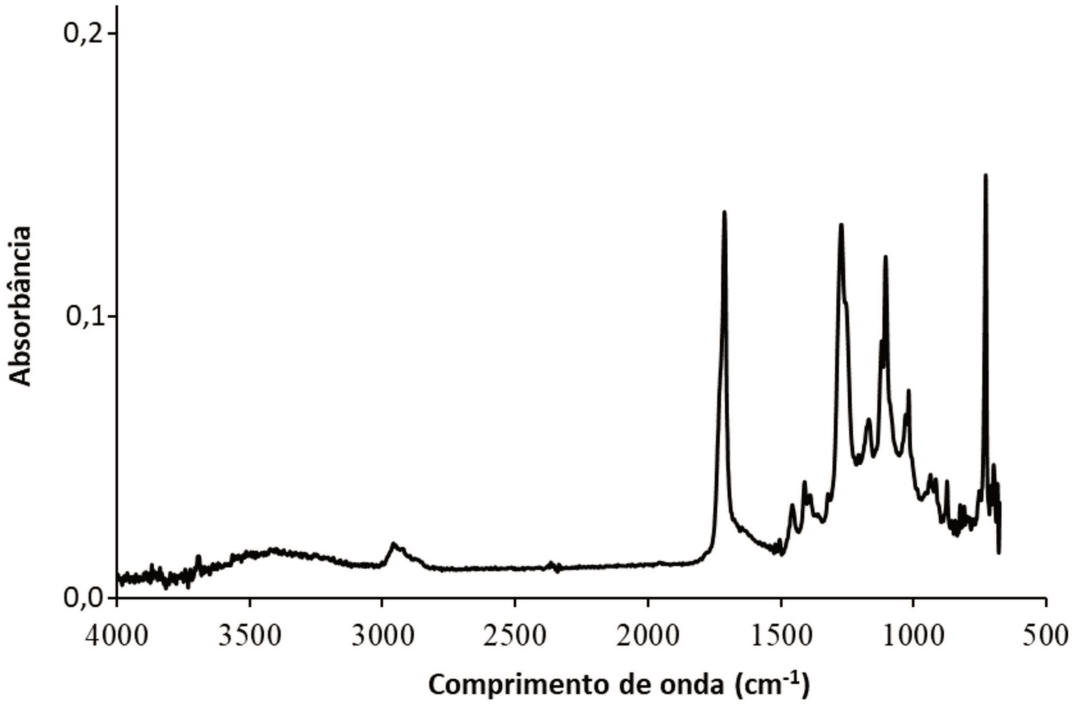
Fonte: O autor (2019)

Figura 13 - Espectro da amostra NF1.5V1.5UVA_solo15d.



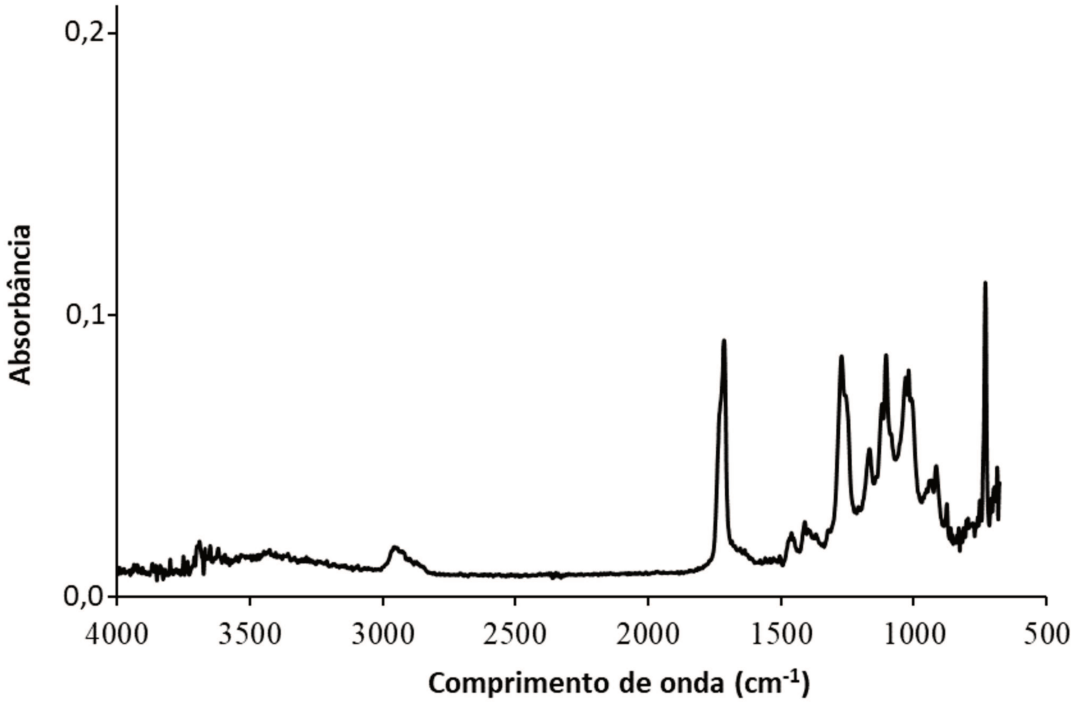
Fonte: O autor (2019)

Figura 14 – Espectro da amostra NF1.5V1.5UVA_solo4m.



Fonte: O autor (2019)

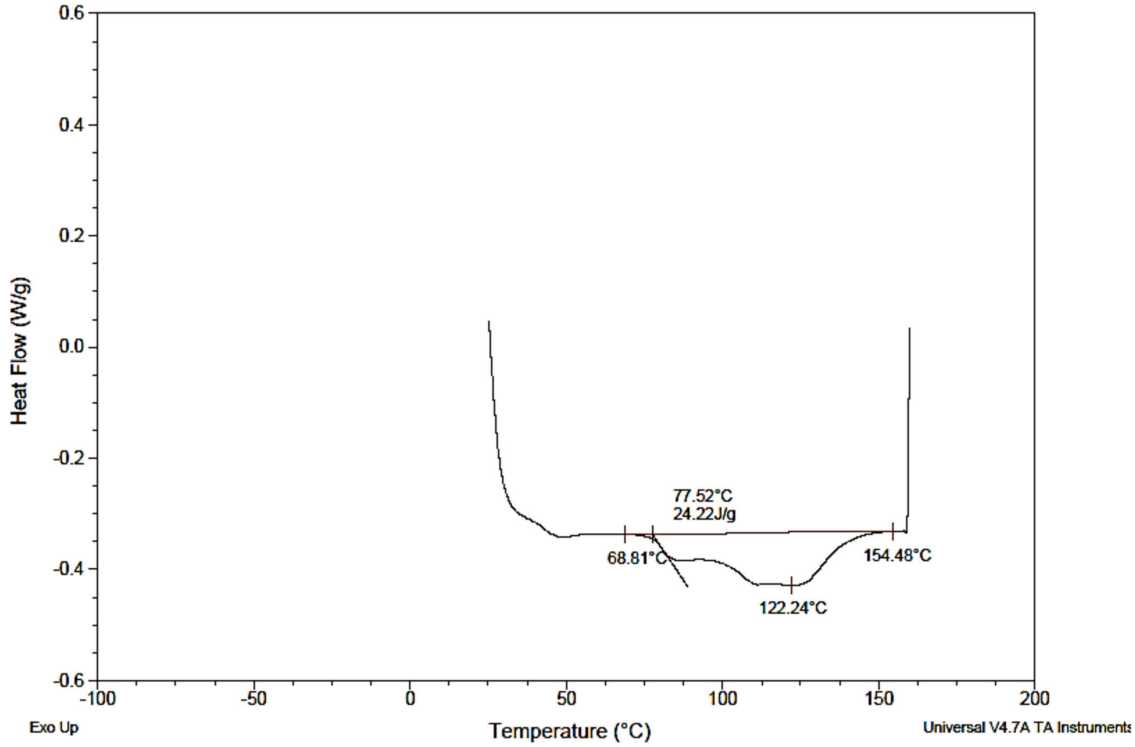
Figura 15- Espectro da amostra NF1.5V1.5UVA_solo8m.



Fonte: O autor (2019)

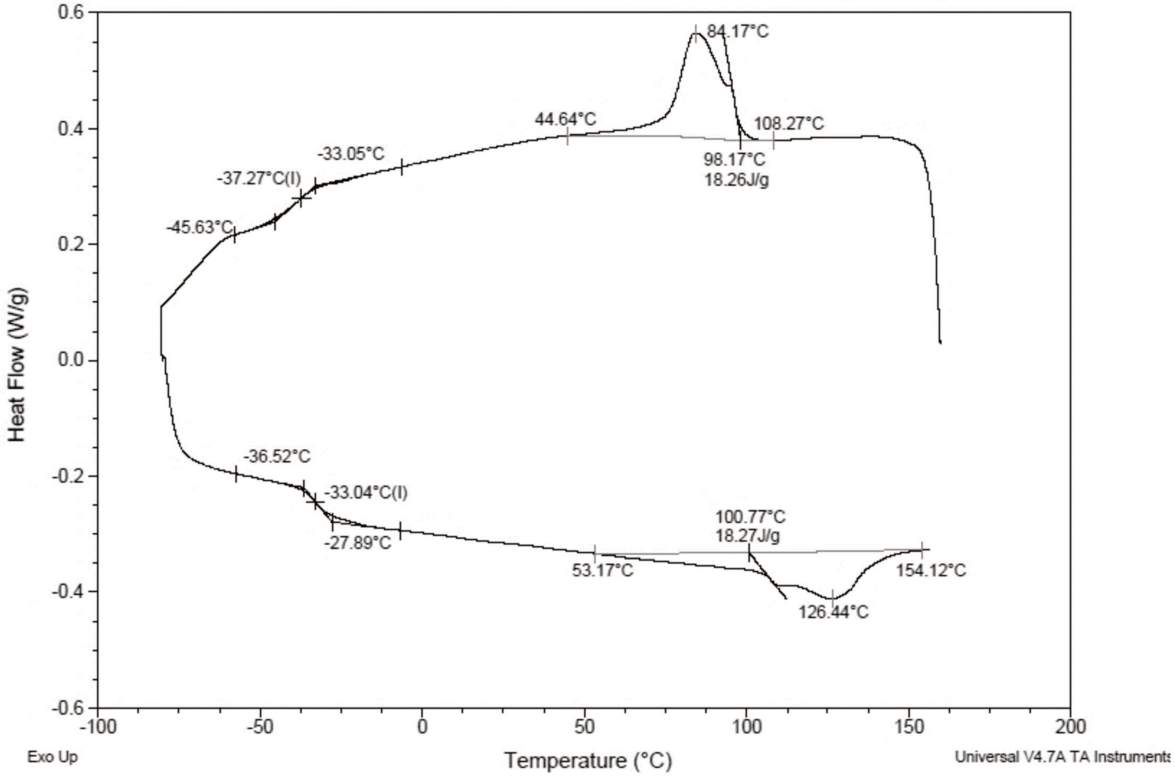
APÊNDICE J - CURVAS DE DSC

Figura 1– Curva de DSC da amostra PBATNAT, no primeiro aquecimento.



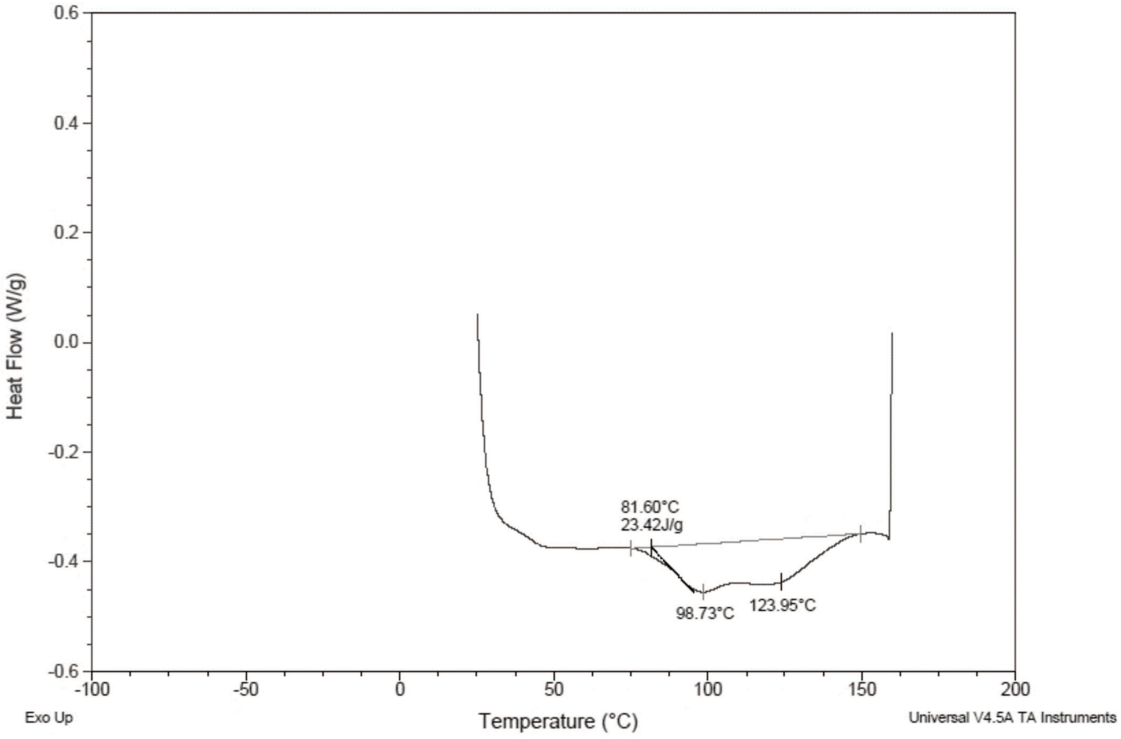
Fonte: O autor (2019)

Figura 2– Curva de DSC da amostra PBATNAT no resfriamento e segundo aquecimento.



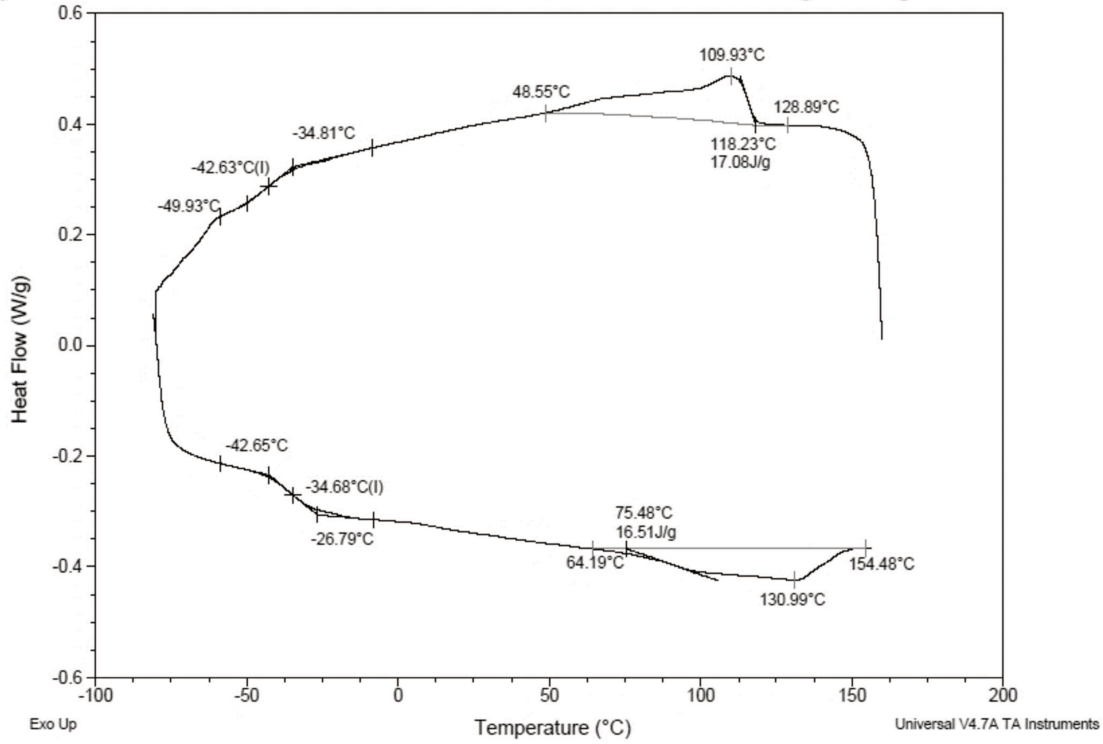
Fonte: O autor (2019)

Figura 3 - Curva de DSC da amostra PBATUVA, no primeiro aquecimento.



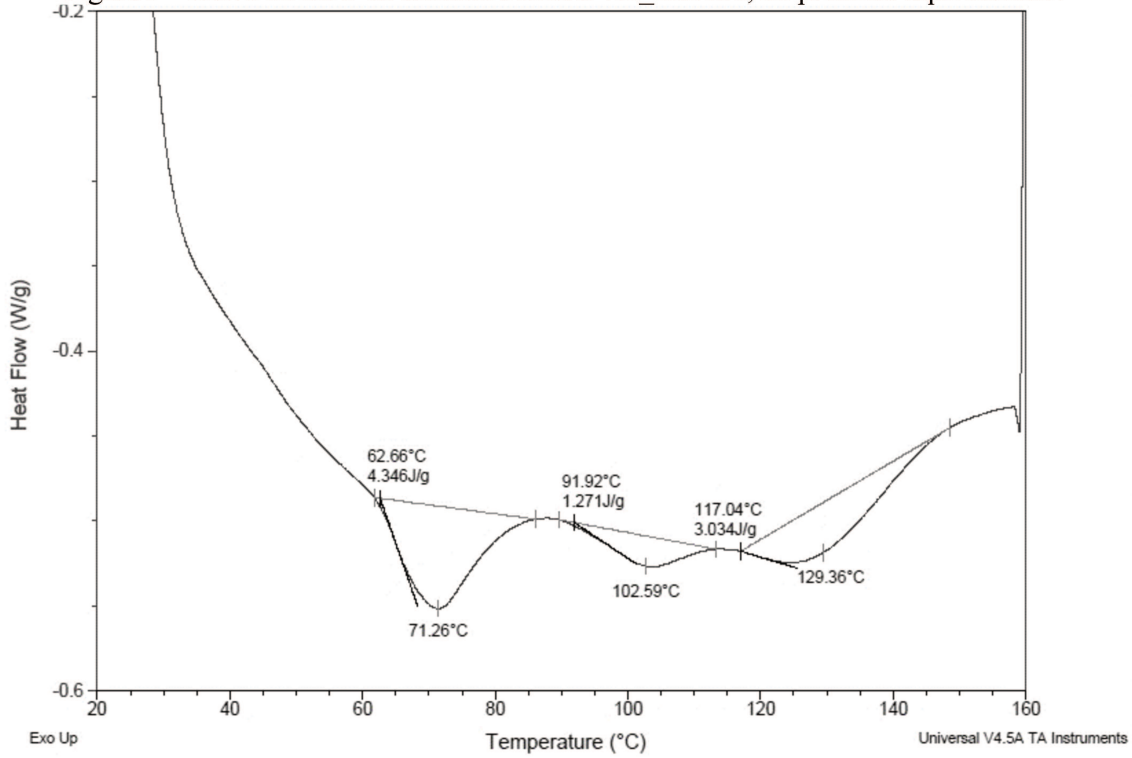
Fonte: O autor (2019)

Figura 4 - Curva de DSC da amostra PBATUVA, no resfriamento e segundo aquecimento.



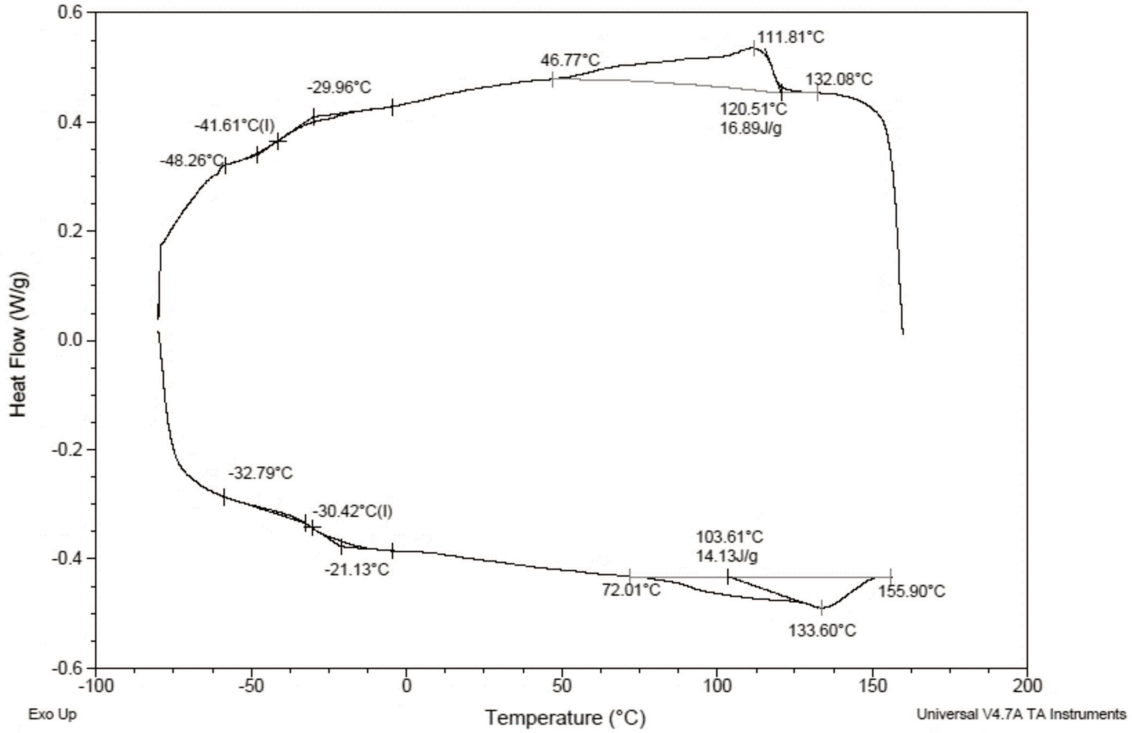
Fonte: O autor (2019)

Figura 5 - Curva de DSC da amostra PBATUVA_solo15d, no primeiro aquecimento.



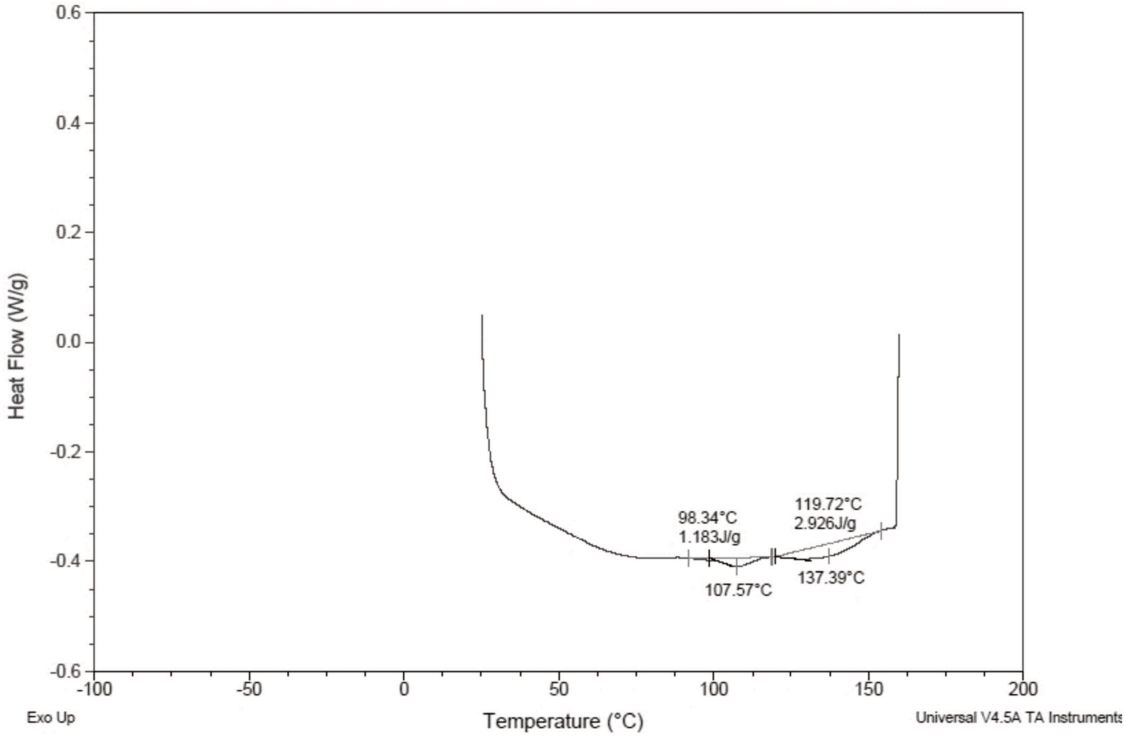
Fonte: O autor (2019)

Figura 6- Curva de DSC da amostra PBATUVA_solo15d, no resfriamento e segundo aquecimento.



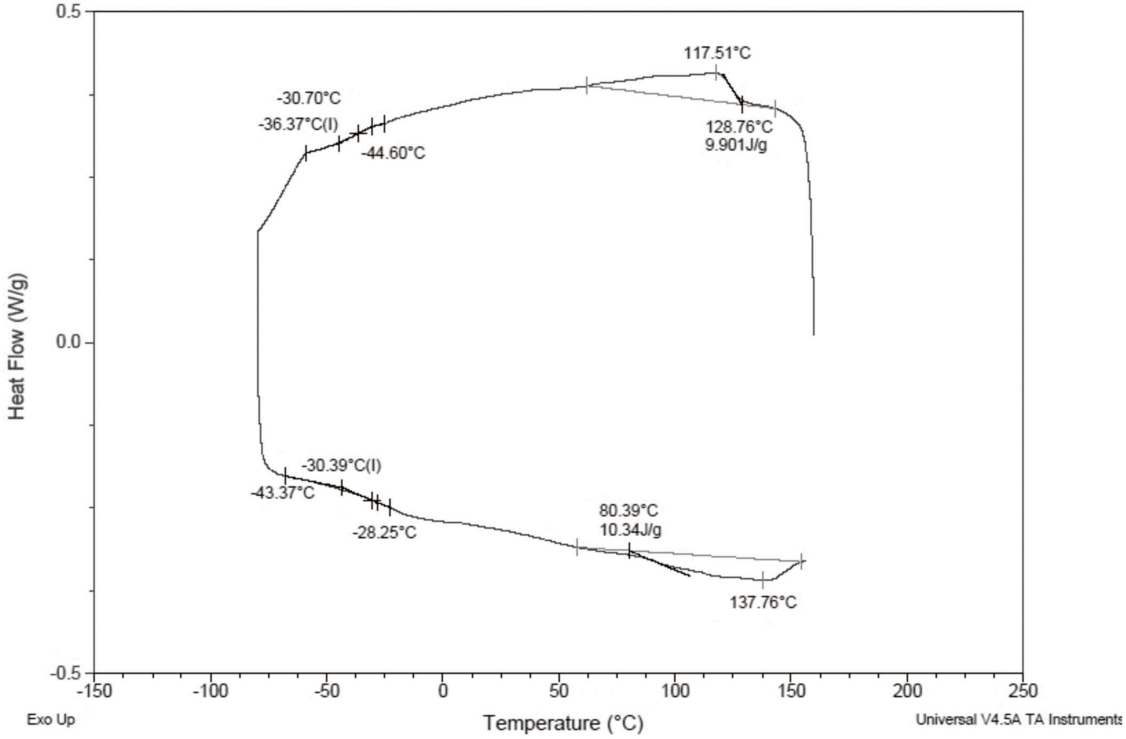
Fonte: O autor (2019)

Figura 7 - Curva de DSC da amostra PBATUVA_solo4m, no primeiro aquecimento.



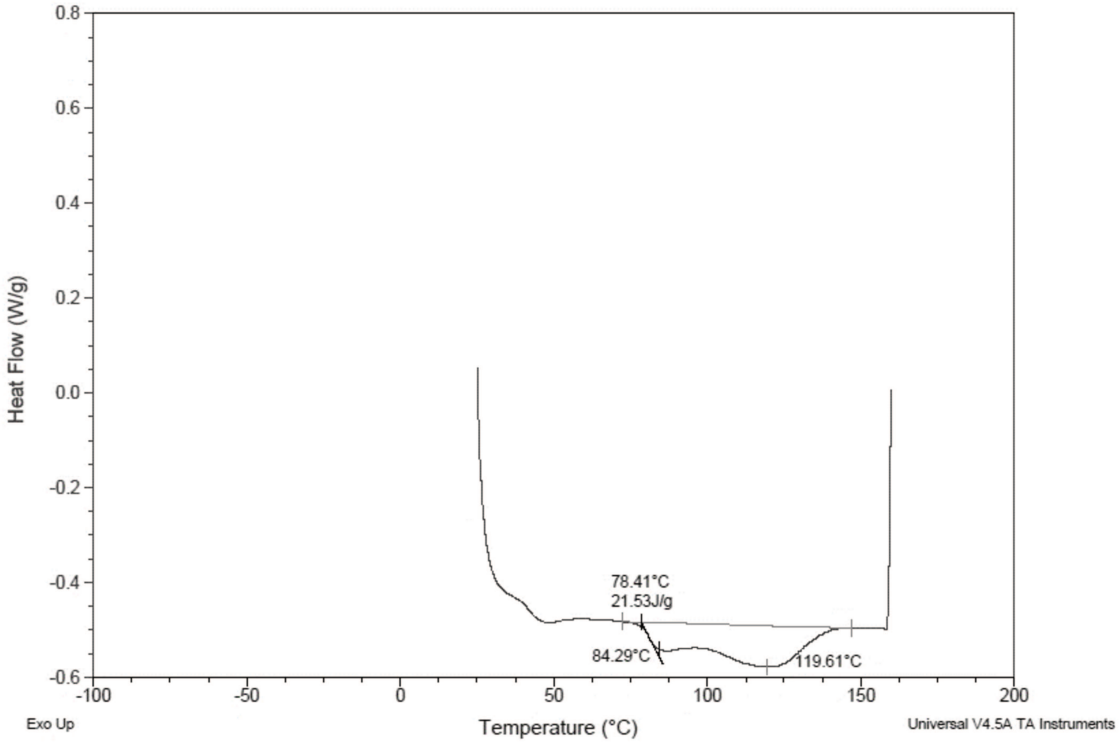
Fonte: O autor (2019)

Figura 8- Curva de DSC da amostra PBATUVA_solo4m, no resfriamento e segundo aquecimento.



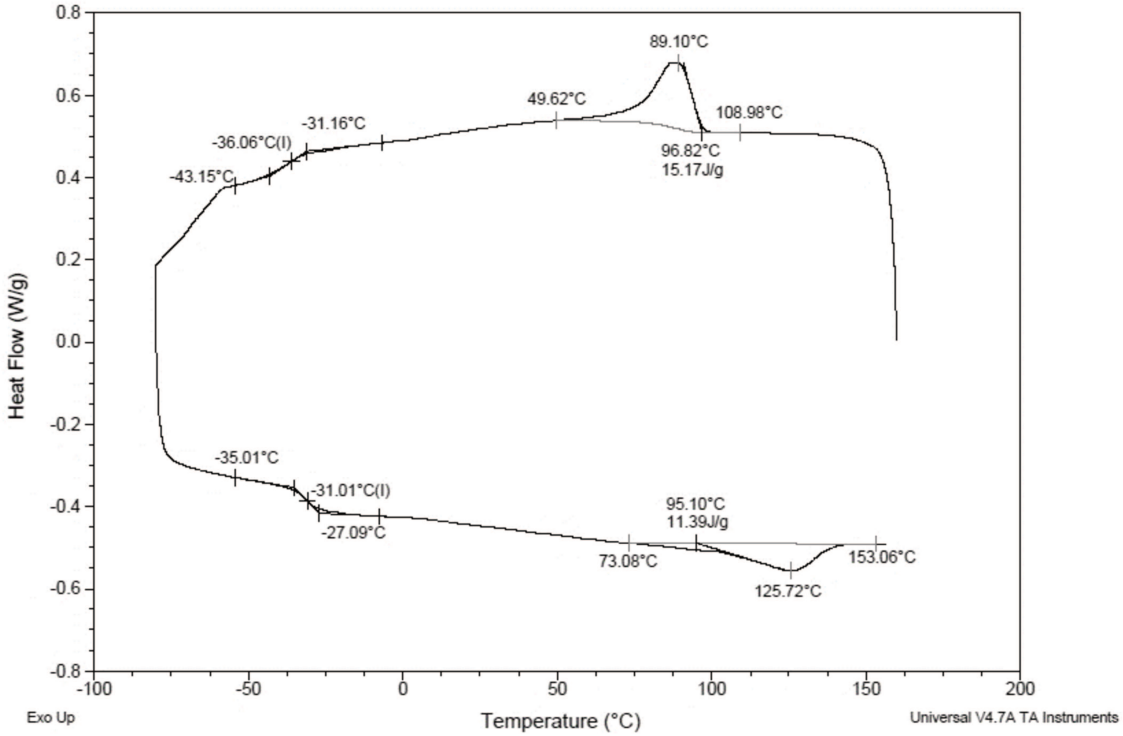
Fonte: O autor (2019)

Figura 9- Curva de DSC da amostra NF1.5T1.5NAT, no primeiro aquecimento.



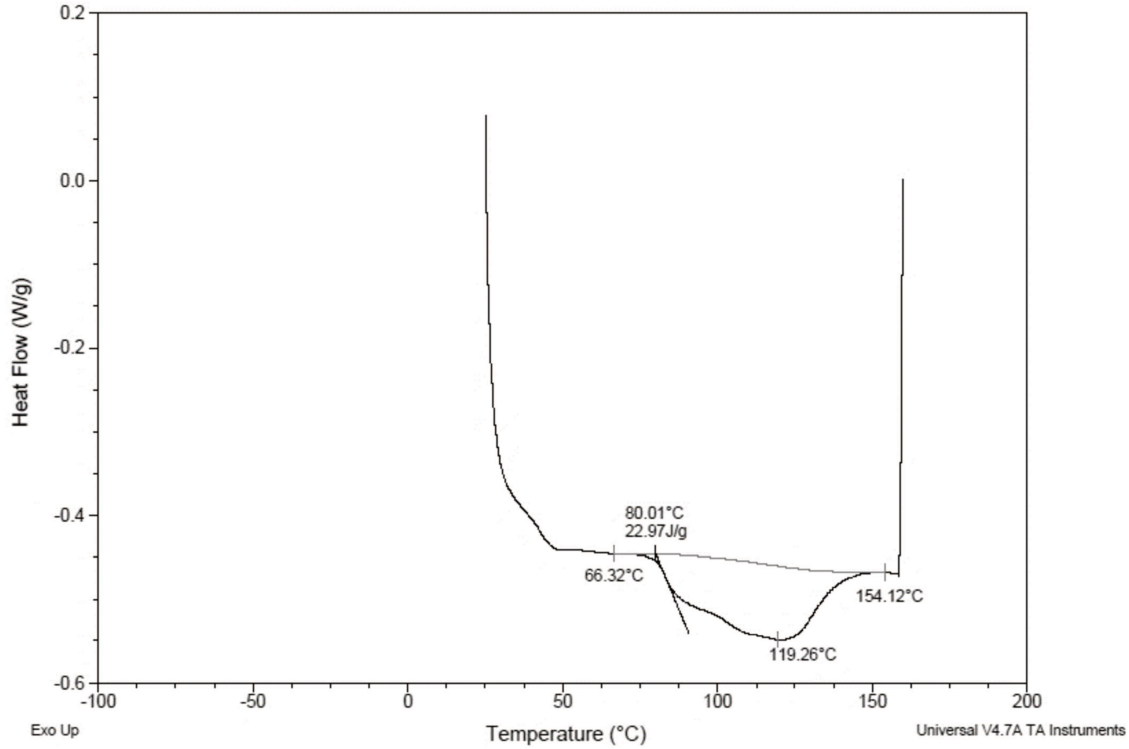
Fonte: O autor (2019)

Figura 10- Curva de DSC da amostra NF1.5T1.5NAT, no resfriamento e segundo aquecimento.



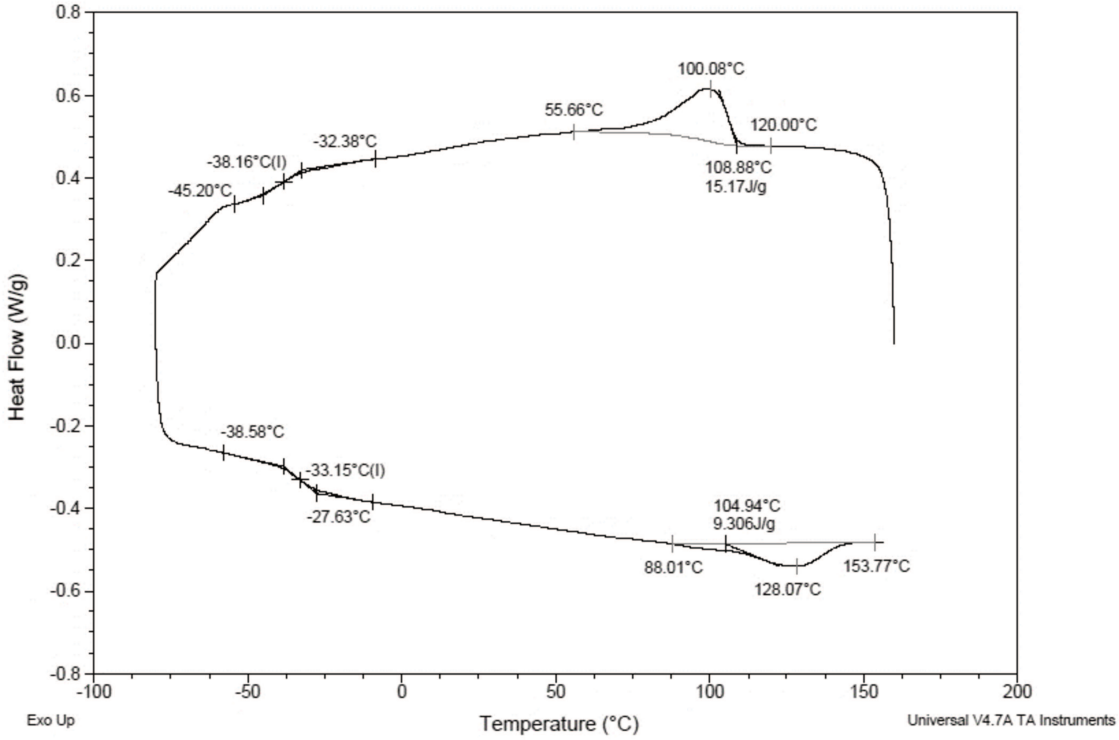
Fonte: O autor (2019)

Figura 11 - Curva de DSC da amostra NF1.5T1.5UVA, no primeiro aquecimento.



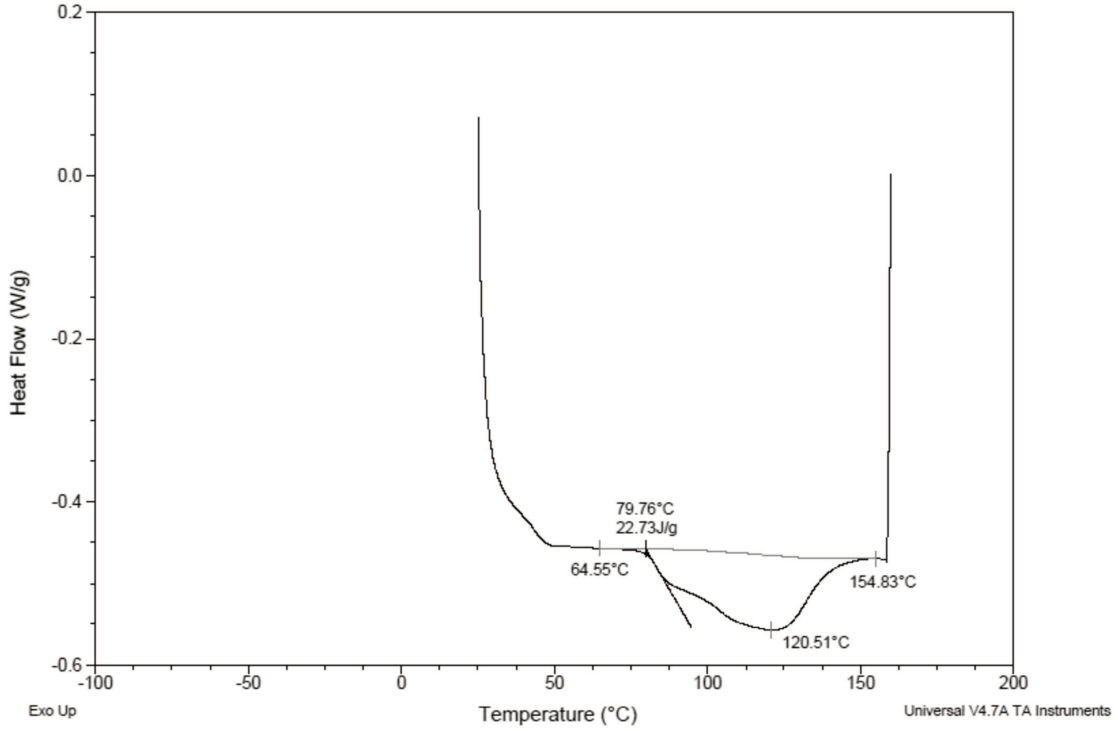
Fonte: O autor (2019)

Figura 12- Curva de DSC da amostra NF1.5T1.5UVA, no resfriamento e segundo aquecimento.



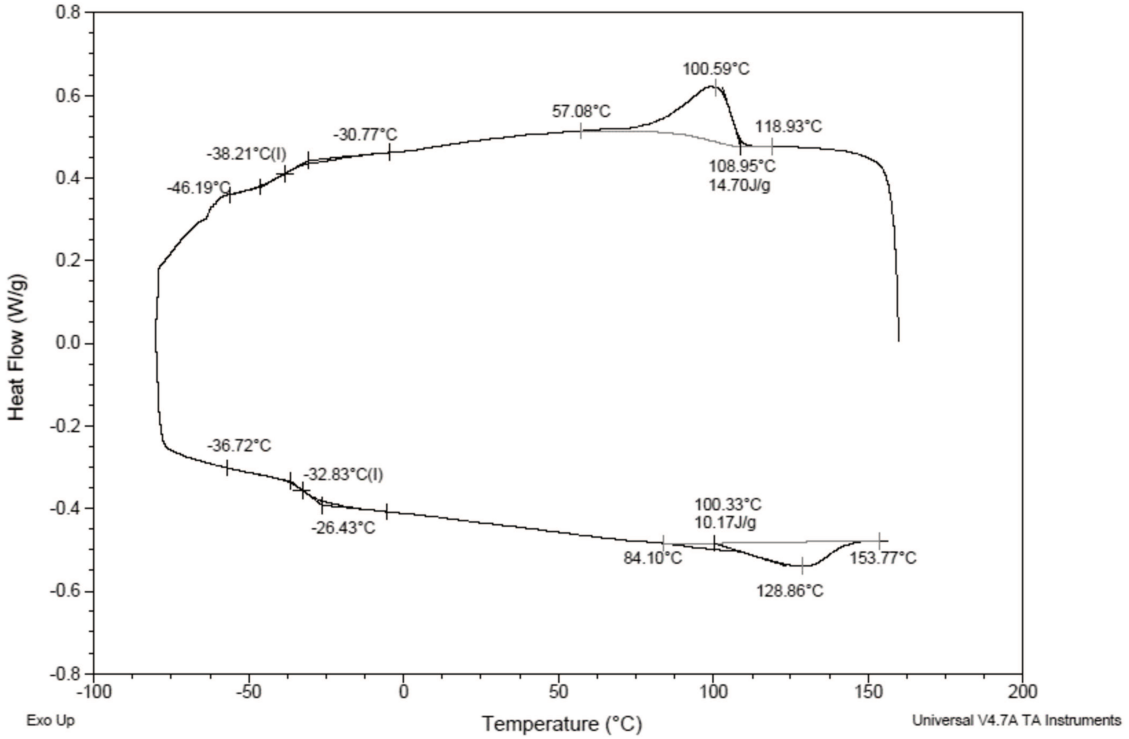
Fonte: O autor (2019)

Figura 13 - Curva de DSC da amostra NF1.5T1.5UVA_solo15d, no primeiro aquecimento.



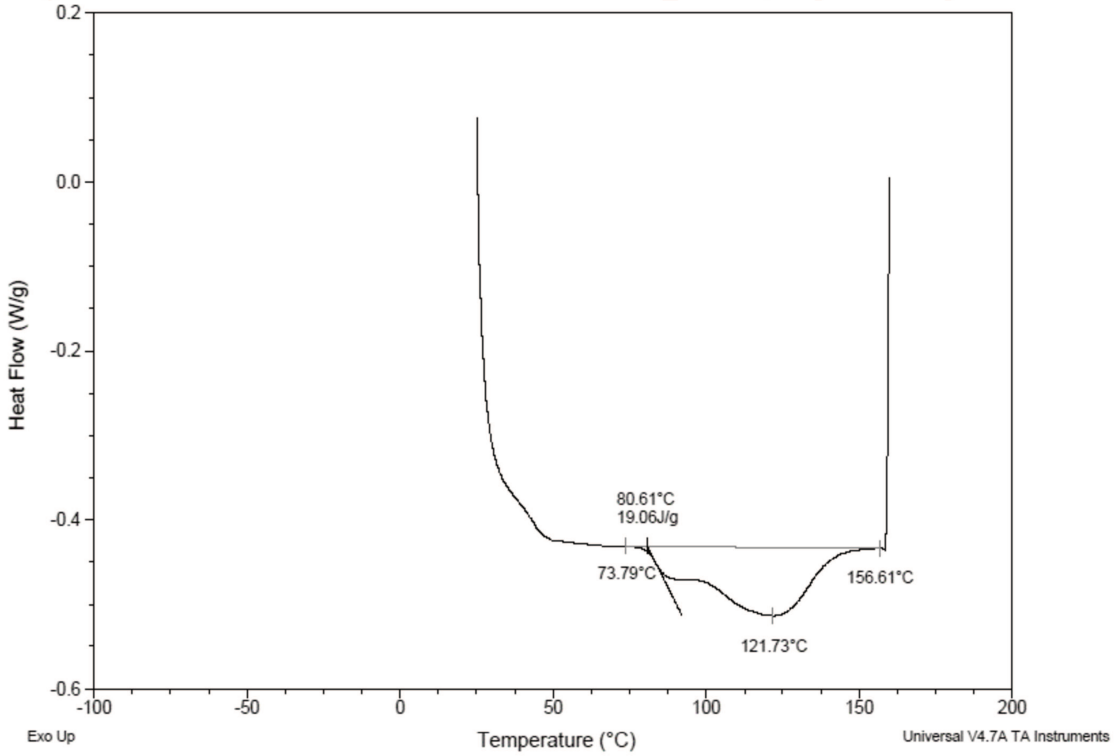
Fonte: O autor (2019)

Figura 14 - Curva de DSC da amostra NF1.5T1.5UVA_solo15d, no resfriamento e segundo aquecimento.



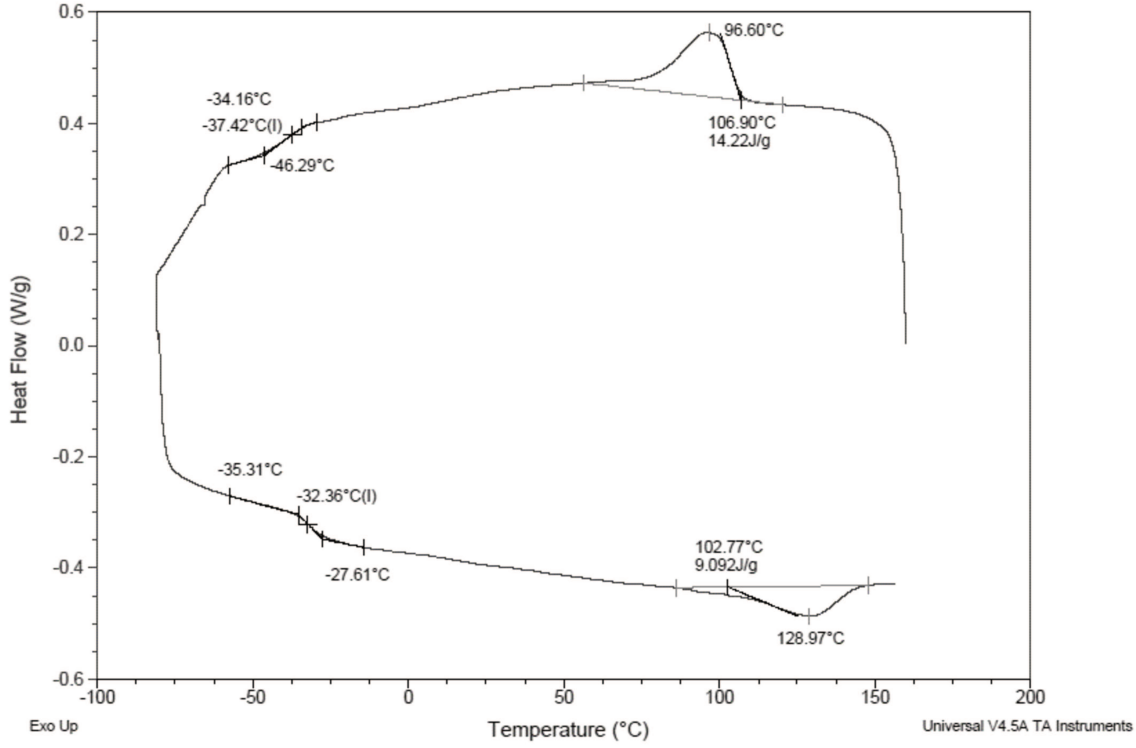
Fonte: O autor (2019)

Figura 15 - Curva de DSC da amostra NF1.5T1.5UVA_solo4m, no primeiro aquecimento.



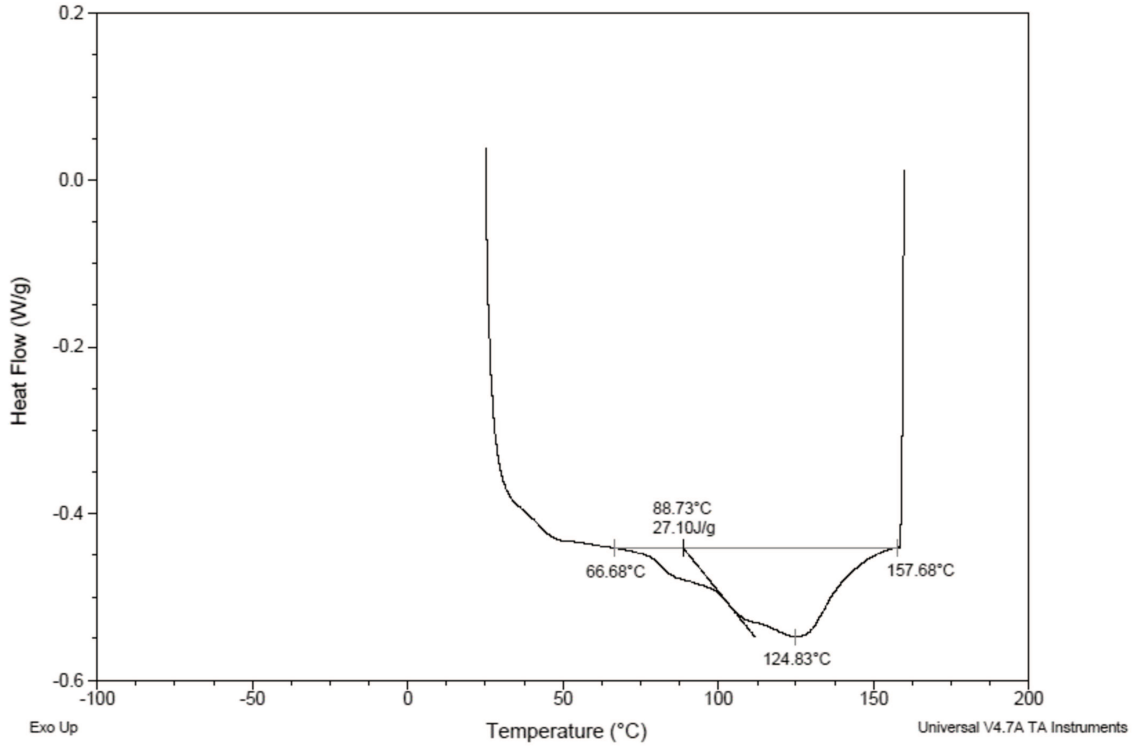
Fonte: O autor (2019)

Figura 16 - Curva de DSC da amostra NF1.5T1.5UVA_solo4m, no resfriamento e segundo aquecimento.



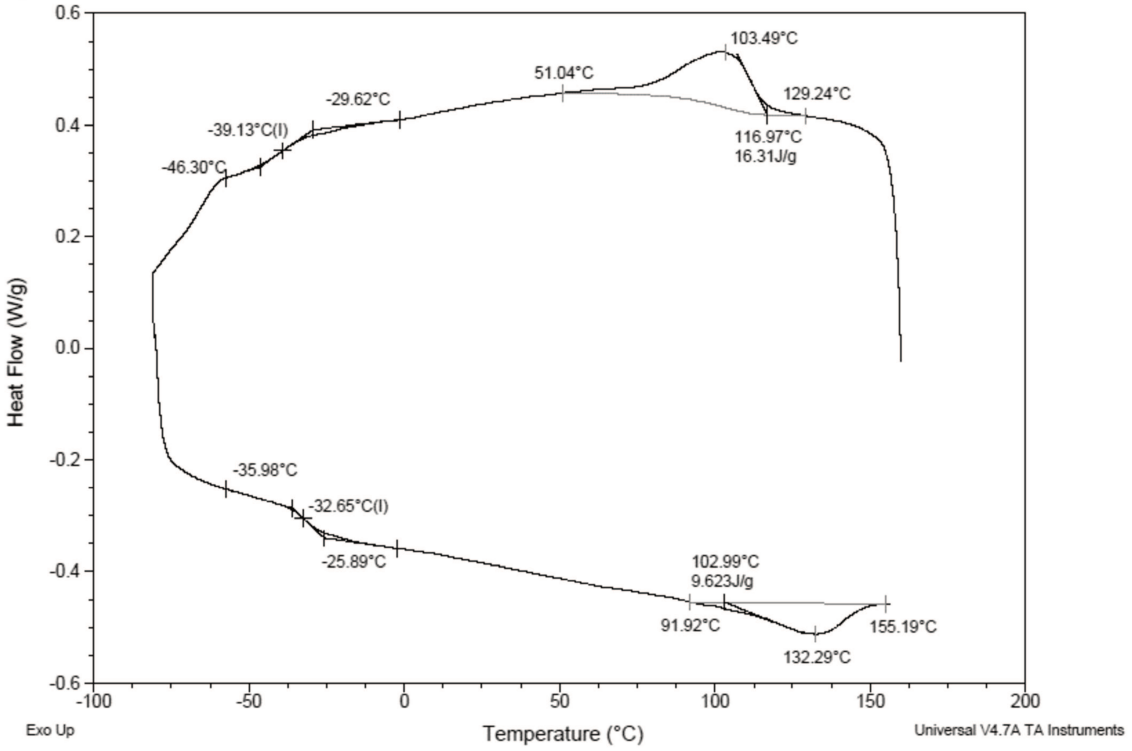
Fonte: O autor (2019)

Figura 17- Curva de DSC da amostra NF1.5T1.5UVA_solo8m, no primeiro aquecimento.



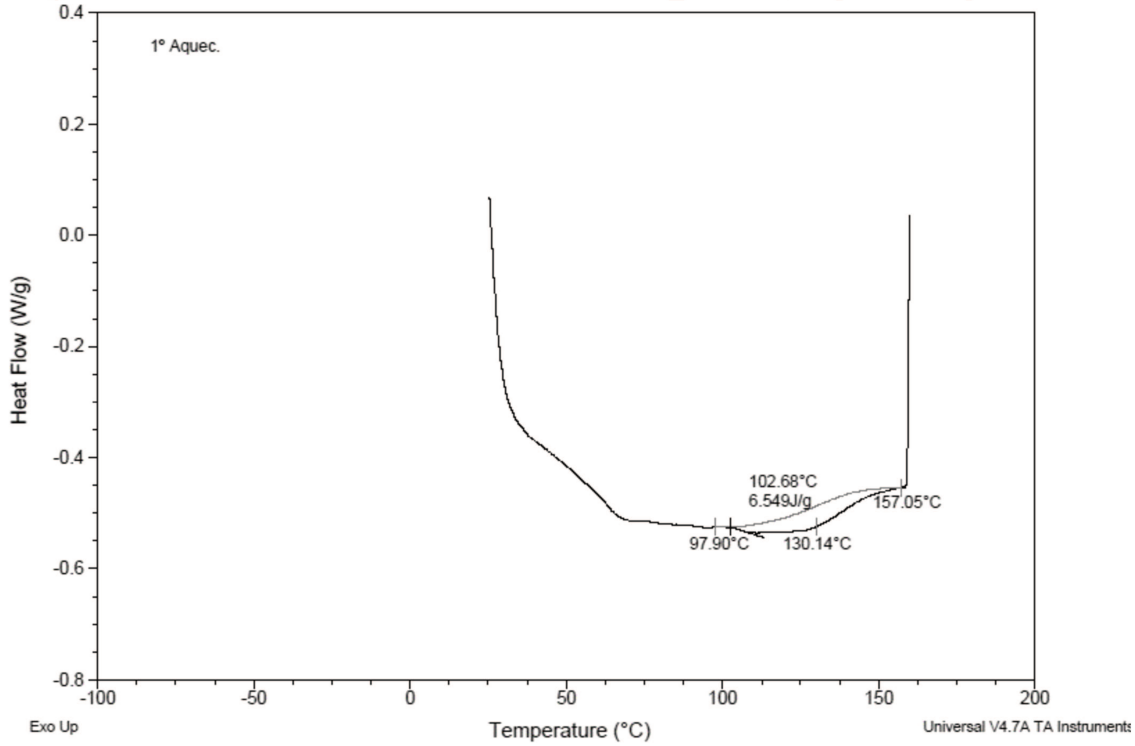
Fonte: O autor (2019)

Figura 18- Curva de DSC da amostra NF1.5T1.5UVA_solo8m, no resfriamento e segundo aquecimento.



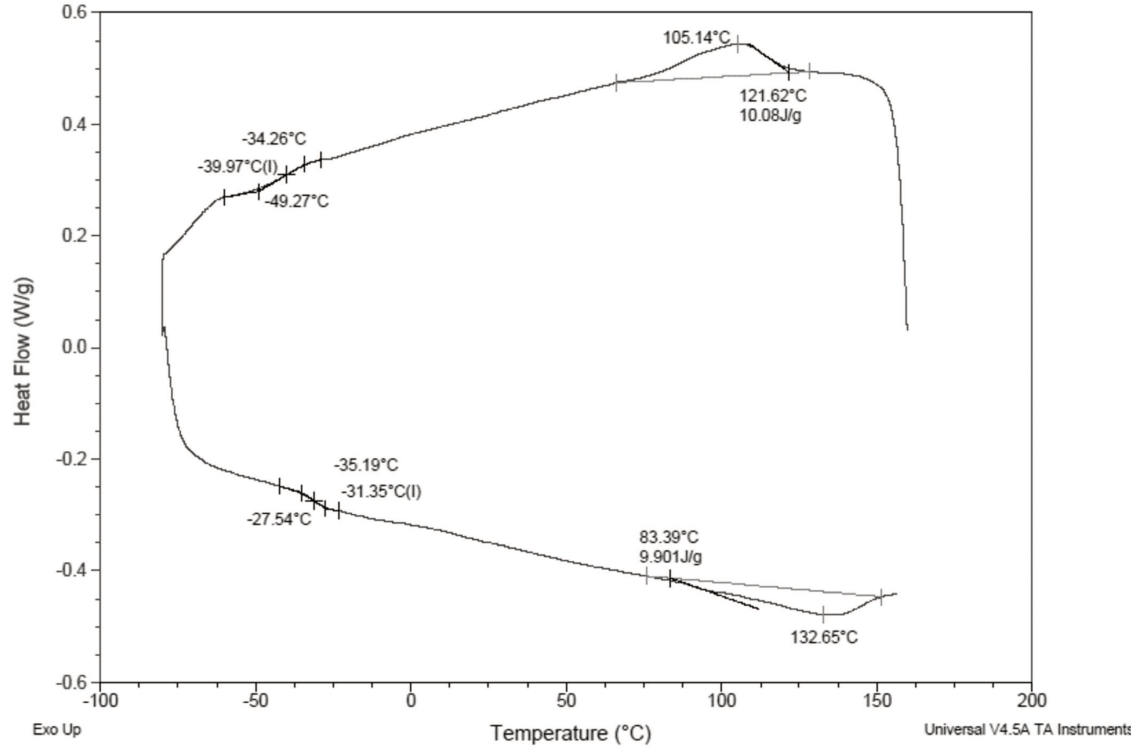
Fonte: O autor (2019)

Figura 19 - Curva de DSC da amostra NF1.5T1.5UVA_solo12m, no primeiro aquecimento.



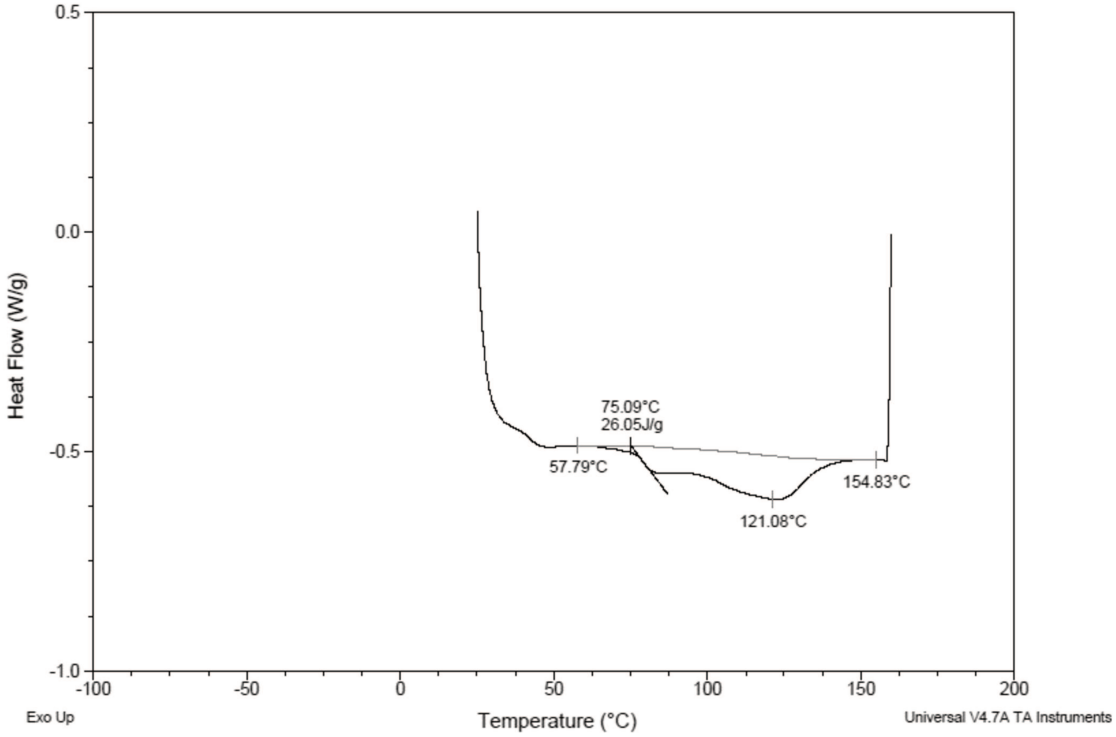
Fonte: O autor (2019)

Figura 20 - Curva de DSC da amostra NF1.5T1.5UVA_solo12m, no resfriamento e segundo aquecimento.



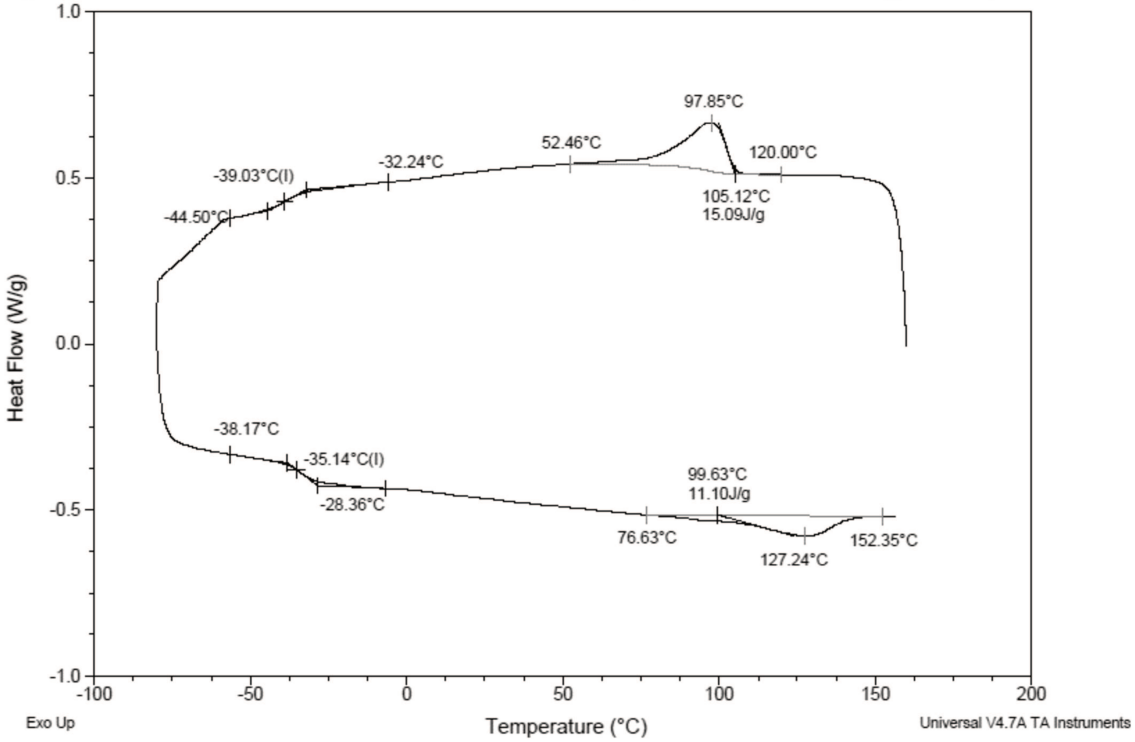
Fonte: O autor (2019)

Figura 21 - Curva de DSC da amostra NF1.5V1.5NAT, no primeiro aquecimento.



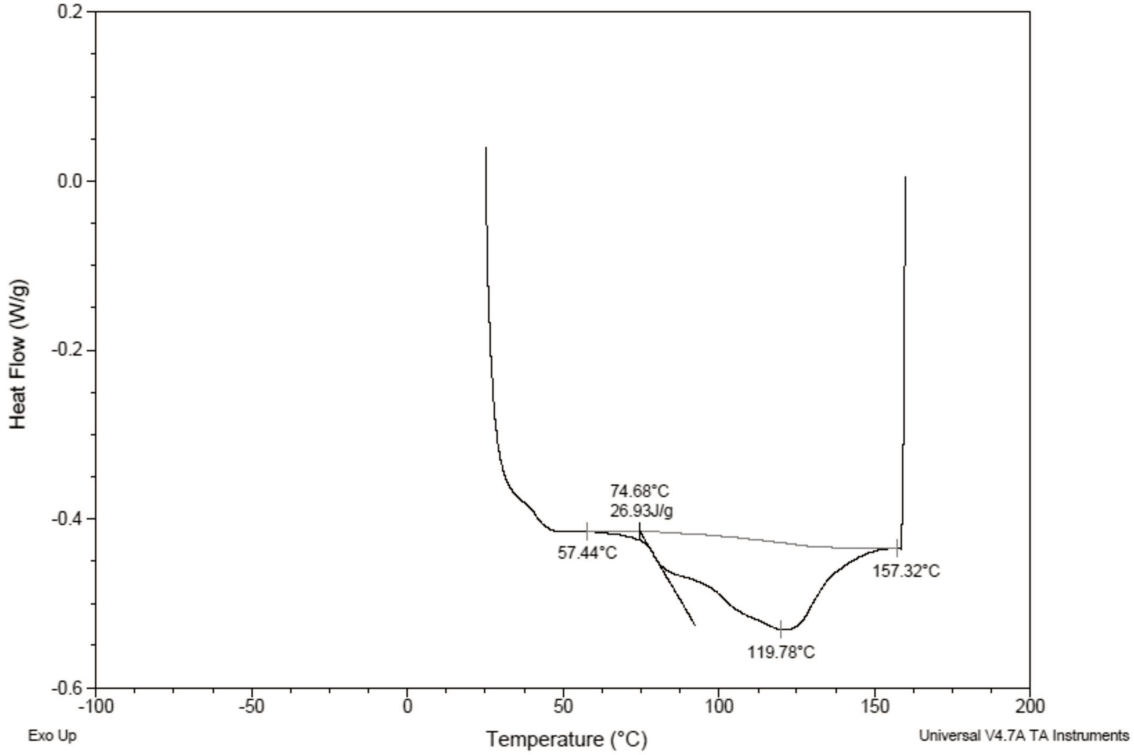
Fonte: O autor (2019)

Figura 22- Curva de DSC da amostra NF1.5V1.5NAT, no resfriamento e segundo aquecimento.



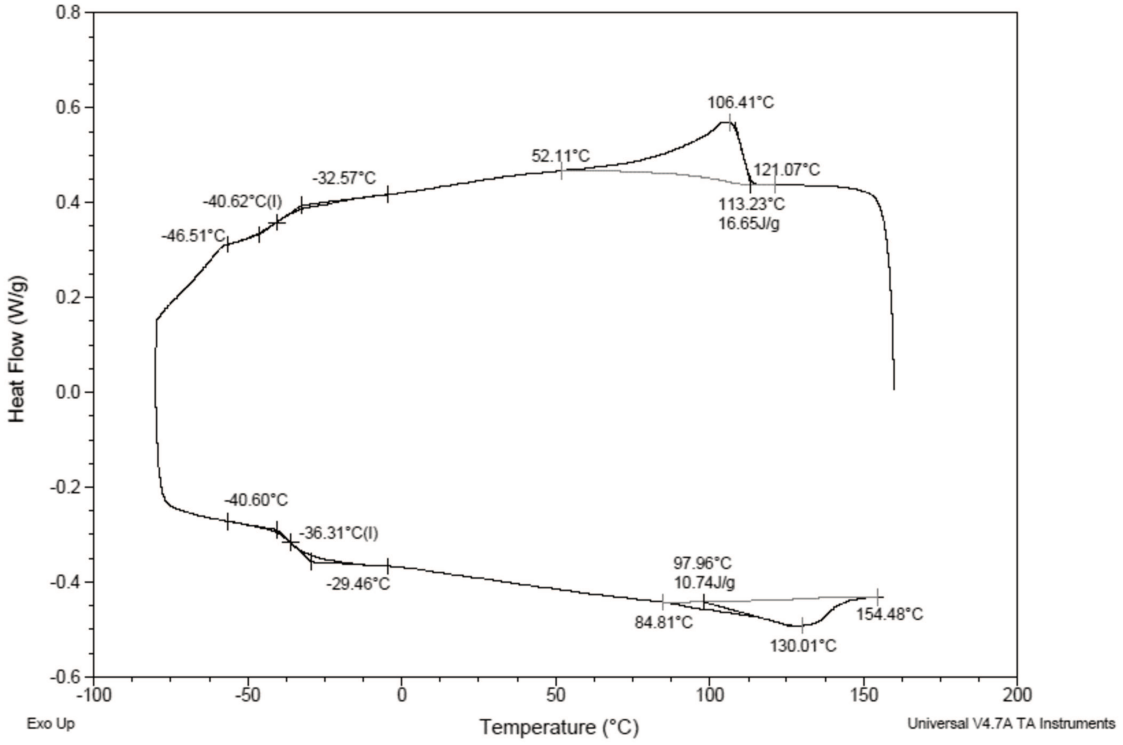
Fonte: O autor (2019)

Figura 23- Curva de DSC da amostra NF1.5V1.5UVA, no primeiro aquecimento.



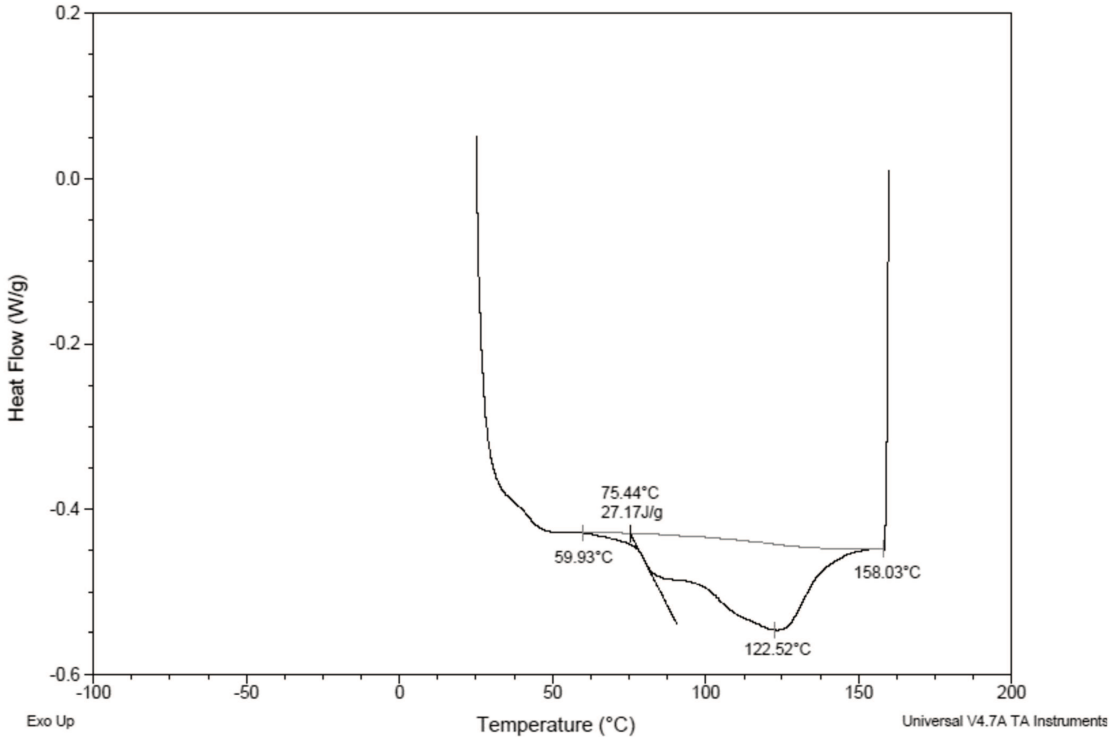
Fonte: O autor (2019)

Figura 24- Curva de DSC da amostra NF1.5V1.5UVA, no resfriamento e segundo aquecimento.



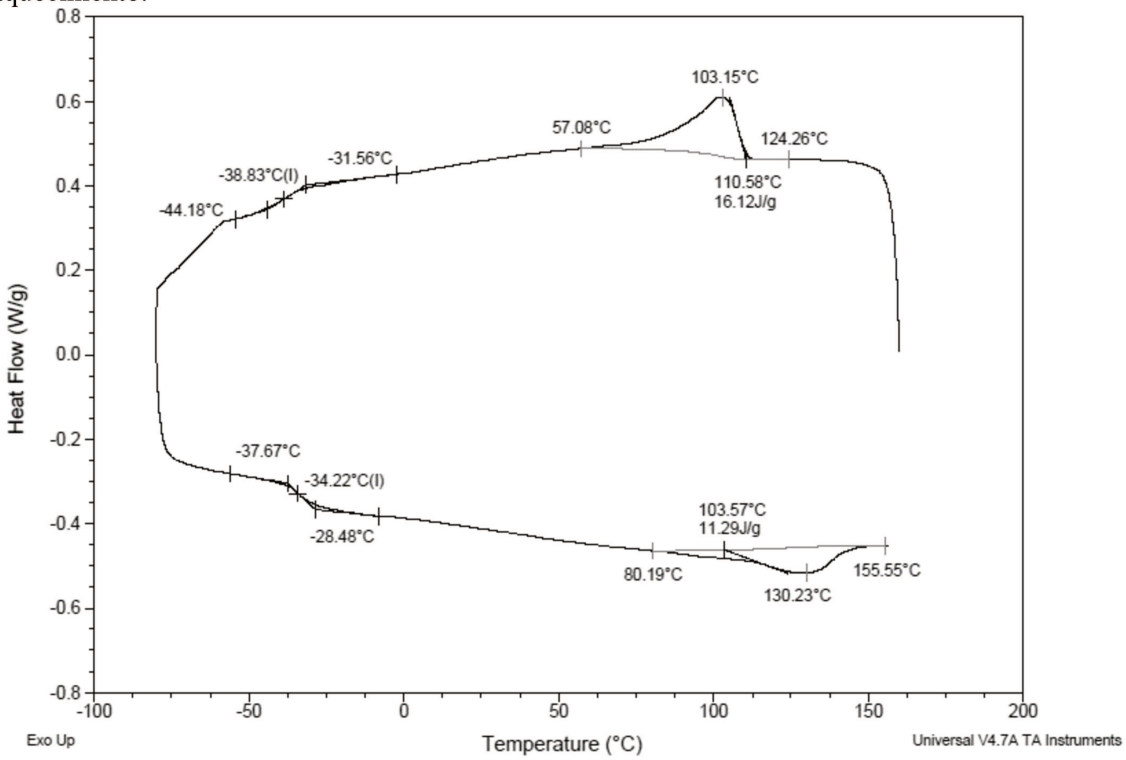
Fonte: O autor (2019)

Figura 25- Curva de DSC da amostra NF1.5V1.5UVA_solo15d, no primeiro aquecimento.



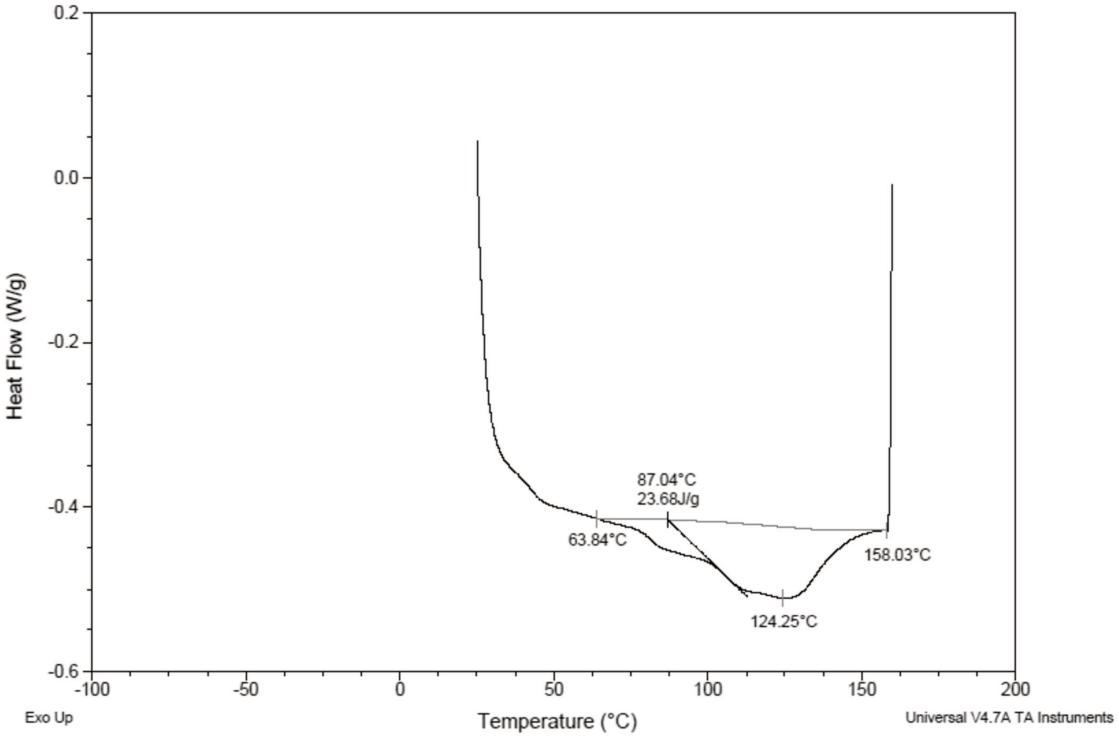
Fonte: O autor (2019)

Figura 26 - Curva de DSC da amostra NF1.5V1.5UVA_solo15d, no resfriamento e segundo aquecimento.



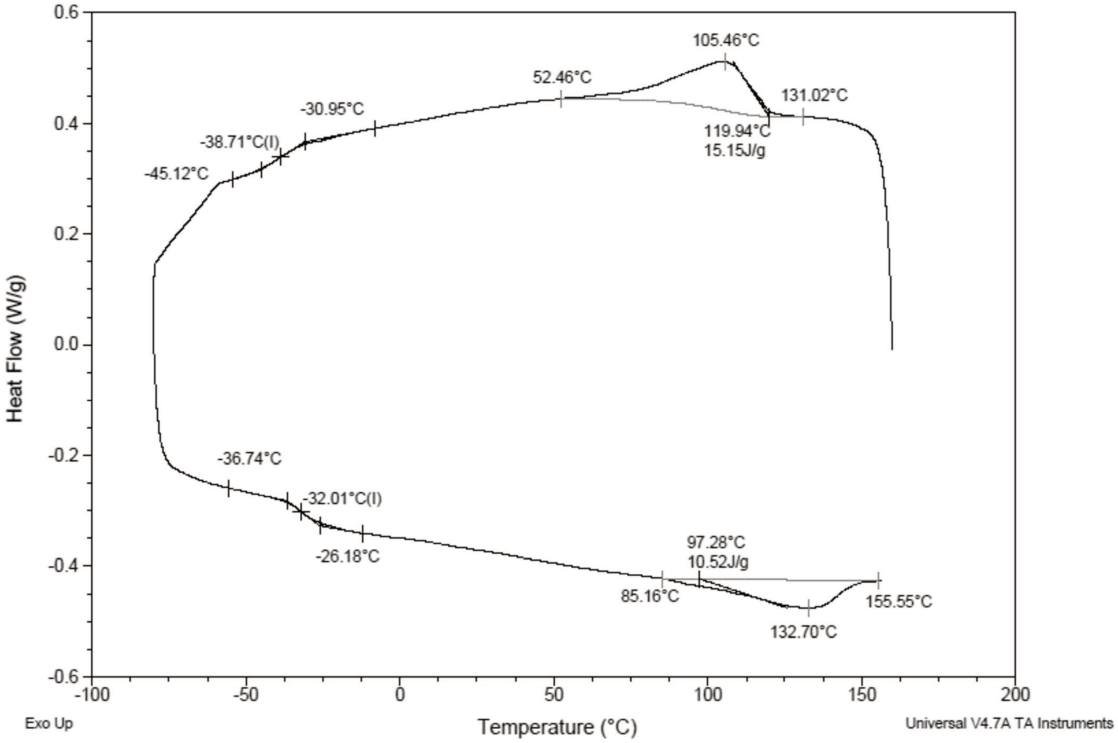
Fonte: O autor (2019)

Figura 27- Curva de DSC da amostra NF1.5V1.5UVA_solo4m, no primeiro aquecimento.



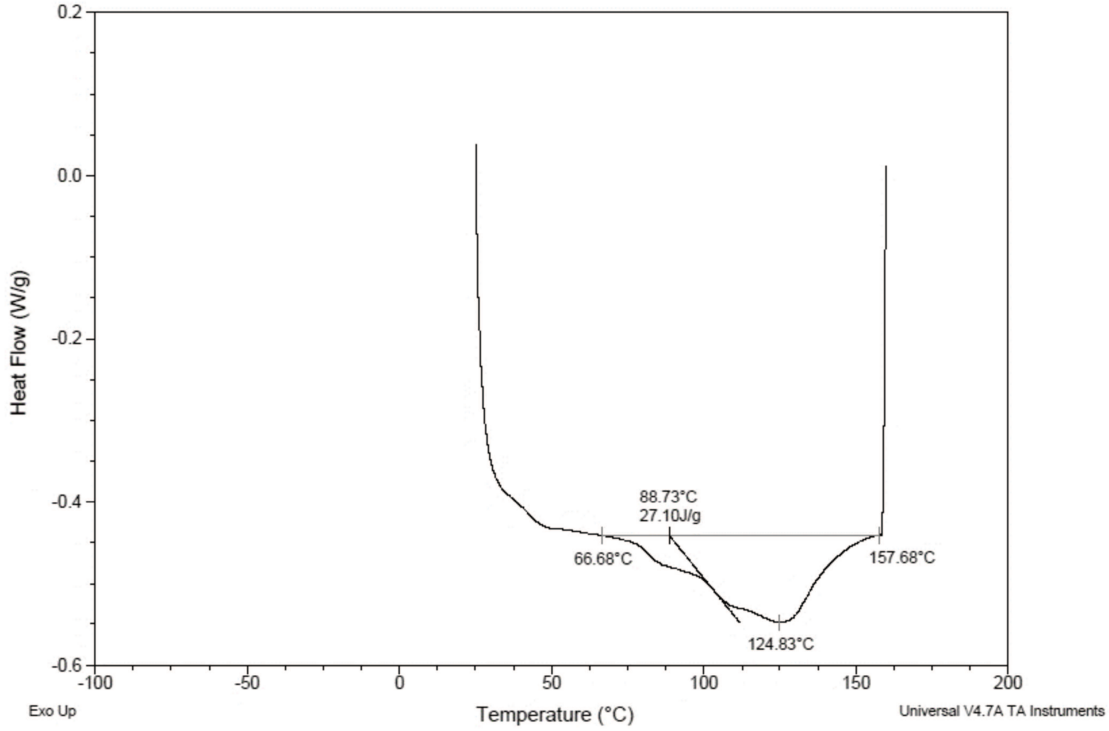
Fonte: O autor (2019)

Figura 28- Curva de DSC da amostra NF1.5V1.5UVA_solo4m, no resfriamento e segundo aquecimento.



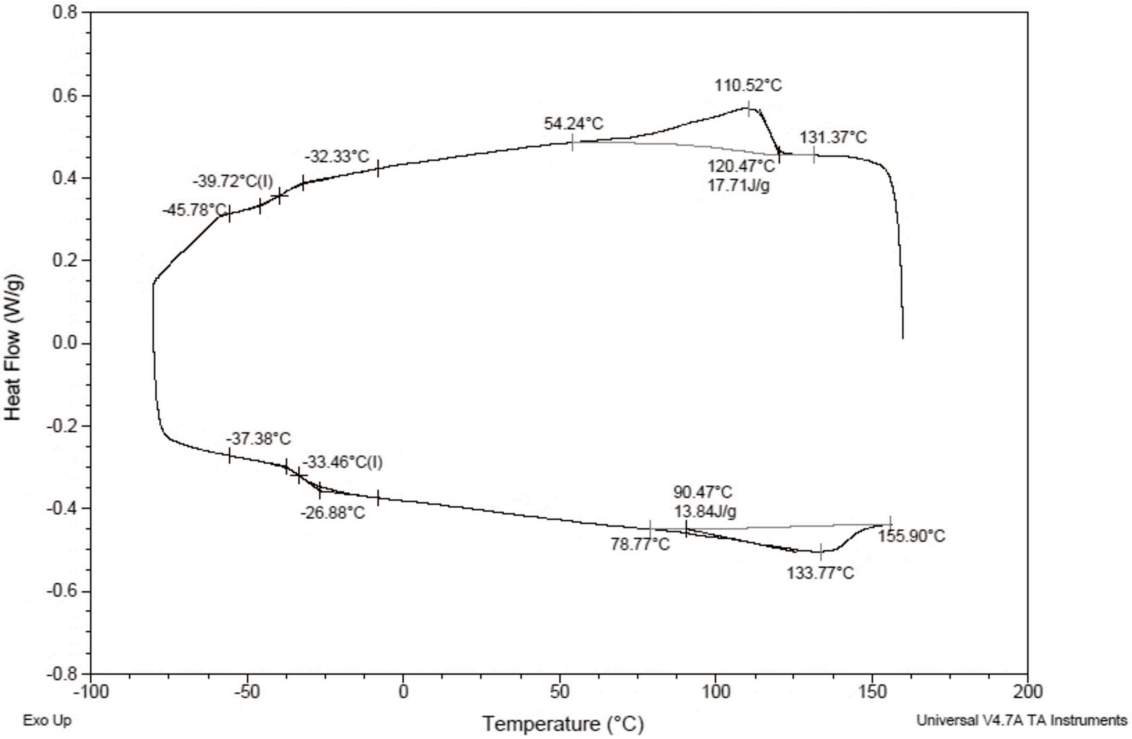
Fonte: O autor (2019)

Figura 29 - Curva de DSC da amostra NF1.5V1.5UVA_solo8m, no primeiro aquecimento.



Fonte: O autor (2019)

Figura 30- Curva de DSC da amostra NF1.5V1.5UVA_solo8m, no resfriamento e segundo aquecimento.



Fonte: O autor (2019)

APÊNDICE K - RESULTADOS DOS BIOENSAIOS

Tabela 1 - Resultados do bioensaio com *Lactuca sativa* para amostras de solubilizado de solo.

Amostras	Germinação (%)		Comprimento de radícula (mm)		Comprimento de hipocótilo (mm)	
	NAT_sol	UVA_bio_sol	NAT_sol	UVA_bio_sol	NAT_sol	UVA_bio_sol
CN	92 ± 3	96 ± 2	33,69 ± 9,08	22,51 ± 10,40	18,73 ± 4,23	16,93 ± 5,72
CP	0 ± 0*	42 ± 24*	NM	0,56 ± 0,22*	NM	NM
SOLO	94 ± 4	93 ± 8	40,56 ± 8,94*	22,19 ± 7,51	20,37 ± 3,91*	22,71 ± 4,63*
PBAT	93 ± 3	90 ± 4	41,05 ± 10,66*	22,29 ± 7,43	20,46 ± 4,18*	23,60 ± 5,48*
NF1.5T1.5	89 ± 4	88 ± 3	38,27 ± 10,94*	23,46 ± 7,60	22,41 ± 7,92*	22,76 ± 5,86*
NF1.5V1.5	91 ± 3	90 ± 5	42,84 ± 11,24*	21,10 ± 8,48	20,45 ± 4,89*	22,35 ± 6,18*

* estatisticamente significativo (Kruskal-Wallis; $p<0,05$; comparações múltiplas pelo teste de Dunn); NM-não monitorado. CN: controle negativo; CP: controle positivo; NAT_sol: solubilizados preparados com solo puro e misturas de solo com amostras naturais antes do ensaio de biodegradação; UVA_bio_sol: solubilizados preparados com solo puro e misturas de solo com amostras envelhecidas após o ensaio de biodegradação. Fonte: O autor (2019).

Tabela 2- Resultados de Índice Mitótico-IM (%) células meristemáticas de *Allium cepa* para amostras de solubilizado de solo.

Amostras	**IM**	
	NAT_sol	**UVA_bio_sol**
CN	20 ± 9	15 ± 3
CP	19 ± 7	16 ± 3
SOLO	20 ± 5	16 ± 2
PBAT	19 ± 7	15 ± 2
NF1.5T1.5	25 ± 8	17 ± 3
NF1.5V1.5	17 ± 7	15 ± 1

CN: controle negativo; CP: controle positivo; NAT_sol: solubilizados preparados com solo puro e misturas de solo com amostras naturais antes do ensaio de biodegradação; UVA_bio_sol: solubilizados preparados com solo puro e misturas de solo com amostras envelhecidas após o ensaio de biodegradação. Fonte: O autor (2019).

Tabela 3– Frequência de alterações (%) e Índice de Alterações Cromossômicas e Nucleares-IACN (%) em células meristemáticas de *Allium cepa* para amostras de solubilizados de solo preparadas antes do ensaio de biodegradação.

Alterações	**Amostras**					
	CN	**CP**	**SOLO**	**PBAT NAT_sol**	**NF1.5T1.5 NAT_sol**	**NF1.5V1.5 NAT_sol**
Atraso	0,02 ± 0,10	0,06 ± 0,10	0,04 ± 0,10	0,04 ± 0,10	0,02 ± 0,10	0,02 ± 0,10
Aderência	0,10 ± 0,10	0,20 ± 0,30	0,10 ± 0,10	0,10 ± 0,10	0,02 ± 0,10	0,10 ± 0,10
C-metáfase	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,02 ± 0,10	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
Perda	0,10 ± 0,10	0,50 ± 0,30	0,02 ± 0,10	0,00 ± 0,00	0,02 ± 0,1	0,00 ± 0,00
Ponte	0,20 ± 0,20	0,30 ± 0,40	0,04 ± 0,10	0,10 ± 0,10	0,10 ± 0,10	0,10 ± 0,10
Quebra	0,00 ± 0,00	0,10 ± 0,20	0,02 ± 0,10	0,02 ± 0,10	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
Poliploidia	0,00 ± 0,00	0,20 ± 0,30	0,02 ± 0,10	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,02 ± 0,10
Ponte e quebra	0,00 ± 0,00	0,02 ± 0,10	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
IACN	**0,30 ± 0,10**	**1,50 ± 0,80***	**0,20 ± 0,20**	**0,20 ± 0,20**	**0,10 ± 0,20**	**0,20 ± 0,20**

***** estatisticamente significativo (Kruskal-Wallis, $p<0,05$; comparações múltiplas pelo teste de Dunn). CN: controle negativo; CP: controle positivo; SOLO: solubilizado do solo; PBATNAT_sol: solubilizado da mistura de solo com amostra PBATNAT; NF1.5T1.5NAT_sol: solubilizado da mistura de solo com amostra NF1.5T1.5NAT; NF1.5V1.5NAT_sol: solubilizado da mistura de solo com amostra NF1.5V1.5NAT. Fonte: O autor (2019).

Tabela 4- Frequência de alterações (%) e Índice de Alterações Cromossômicas e Nucleares-IACN (%) em células meristemáticas de *Allium cepa* para amostras de solubilizados de solo preparadas após o ensaio de biodegradação.

Alterações	**Amostras**					
	CN	**CP**	**SOLO**	**PBAT UVA_bio_sol**	**NF1.5T1.5 UVA_bio_sol**	**NF1.5V1.5 UVA_bio_sol**
Atraso	0,02 ± 0,10	0,20 ± 0,08	0,02 ± 0,10	0,02 ± 0,10	0,10 ± 0,10	0,02 ± 0,10
Aderência	0,20 ± 0,10	0,10 ± 0,10	0,20 ± 0,10	0,30 ± 0,20	0,20 ± 0,10	0,30 ± 0,20
C-metáfase	0,10 ± 0,10	0,00 ± 0,00	0,04 ± 0,10	0,10 ± 0,10	0,10 ± 0,10	0,02 ± 0,10
Perda	0,10 ± 0,10	0,24 ± 0,20	0,06 ± 0,10	0,10 ± 0,10	0,04 ± 0,10	0,00 ± 0,00
Ponte	0,10 ± 0,20	0,26 ± 0,20	0,20 ± 0,20	0,30 ± 0,20	0,20 ± 0,10	0,20 ± 0,20
Quebra	0,00 ± 0,00	1,08 ± 0,60	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
Ponte e quebra	0,00 ± 0,00	0,10 ± 0,10	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
IACN	**0,50 ± 0,20**	**1,86 ± 0,73***	**0,48 ± 0,16**	**0,80 ± 0,30**	**0,70 ± 0,20**	**0,60 ± 0,20**

*****estatisticamente significativo (Kruskal-Wallis, $p<0,05$; comparações múltiplas pelo teste de Dunn). CN: controle negativo; CP: controle positivo; SOLO: solubilizado do solo; PBATUVA_bio_sol: solubilizado da mistura de solo com amostra PBATUVA4 após ensaio de biodegradação; NF1.5T1.5UVA_bio_sol: solubilizado da mistura de solo com amostra NF1.5T1.5UVA após o ensaio de biodegradação; NF1.5V1.5UVA_bio_sol: solubilizado da mistura de solo com amostra NF1.5V1.5UVA após o ensaio de biodegradação. Fonte: O autor (2019).

Tabela 5 – Frequência de micronúcleos (%) nas regiões meristemática e F1 de raízes de *Allium cepa* para amostras de solubilizado de solo.

Amostras	**Frequência de micronúcleos – região meristemática**		**Frequência de micronúcleos – região F1**	
	NAT_sol	**UVA_bio_sol**	**NAT_sol**	**UVA_bio_sol**
CN	0,10 ± 0,30	0,06 ± 0,10	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
CP	2,40 ± 1,30*	3,18 ± 1,19*	1,30 ± 0,58*	1,22 ± 0,62*
SOLO	0,02 ± 0,10	0,08 ± 0,14	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
PBAT	0,04 ± 0,10	0,14 ± 0,14	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
NF1.5T1.5	0,02 ± 0,10	0,10 ± 0,14	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
NF1.5V1.5	0,02 ± 0,10	0,10 ± 0,10	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00

*estatisticamente significativo (Kruskal-Wallis, $p<0,05$; comparações múltiplas pelo teste de Dunn); CN: controle negativo; CP: controle positivo; NAT_sol: solubilizados preparados com solo puro e misturas de solo com amostras naturais antes do ensaio de biodegradação; UVA_bio_sol: solubilizados preparados com solo puro e misturas de solo com amostras envelhecidas após o ensaio de biodegradação. Fonte: O autor (2019).

Tabela 6- Resultados de viabilidade celular obtidos pelo teste do MTT em células HepG2/C3A para diferentes concentrações de solubilizados de solo em meio de cultura.

SOLO	**Viabilidade celular (%)**		**NF1.5T1.5**	**Viabilidade celular (%)**	
Concentração (µL/mL de meio de cultura)	**NAT_sol**	**UVA_ bio_sol**	**Concentração (µL/mL de meio de cultura)**	**NAT_sol**	**UVA_ bio_sol**
CN	100 ± 0	100 ± 0	CN	100 ± 0	100 ± 0
CP	0,42 ± 0,08	0,16 ± 0,26	CP	0,5 ± 0,1	0,3 ± 0,2
100	95 ± 8	100 ± 0	100	93 ± 12	98 ± 3
250	87 ± 8	97 ± 4	250	93 ± 10	98 ± 2
500	67 ±11	88 ± 11	500	90 ± 15	94 ± 11
750	62 ± 7	82 ± 17	750	88 ± 13	87 ± 18
1000	55 ± 9	65 ± 24	1000	40 ± 12	67± 11
PBAT	**Viabilidade celular (%)**		**NF1.5V1.5**	**Viabilidade celular (%)**	
Concentração (µL/mL de meio de cultura)	**NAT_sol**	**UVA_ bio_sol**	**Concentração (µL/mL de meio de cultura)**	**NAT_sol**	**UVA_ bio_sol**
CN	100 ± 0	100 ± 0	CN	100 ± 0	100 ± 0
CP	0,9 ± 0,4	0,03 ± 0,03	CP	0,7 ± 0,4	0,14 ± 0,03
100	89 ± 10	100 ± 0	100	99 ± 1	100 ± 1
250	87 ± 6	98 ± 1	250	97 ± 6	100 ± 0
500	71 ± 14	86 ± 8	500	87 ± 17	100 ± 0
750	61 ± 6	75 ± 8	750	76 ± 10	87 ± 13
1000	54 ± 13	60 ± 6	1000	44 ± 8	73 ± 13

CN: controle negativo; CP: controle positivo; NAT_sol: solubilizados preparados com solo puro e misturas de solo com amostras naturais antes do ensaio de biodegradação; UVA_bio_sol: solubilizados preparados com solo puro e misturas de solo com amostras envelhecidas após o ensaio de biodegradação. Fonte: O autor (2019).

Tabela 7 – Resultados de viabilidade celular (%) pela avaliação com azul de tripan em células HepG2/C3A para amostras de solubilizado de solo.

Amostras	**Viabilidade celular (%)**	
	NAT_sol	**UVA_bio_sol**
CN	88 ± 4	94 ± 4
CP	85 ± 4	92 ± 3
SOLO	91 ± 5	95 ± 2
PBAT	90 ± 2	95 ± 3
NF1.5T1.5	90 ± 4	94 ± 2
NF1.5V1.5	91 ± 2	97 ± 1

* CN: controle negativo; CP: controle positivo; NAT_sol: solubilizados preparados com solo puro e misturas de solo com amostras naturais antes do ensaio de biodegradação; UVA_bio_sol: solubilizados preparados com solo puro e misturas de solo com amostras envelhecidas após o ensaio de biodegradação. Fonte: O autor (2019).

Tabela 8 - Resultados de intensidade de DNA na cauda (%) e momento da cauda de Olive pelo ensaio do cometa em células HepG2/C3A para amostras de solubilizado de solo.

Amostras	Intensidade de DNA na cauda		Momento da cauda de Olive	
	NAT_sol	UVA_bio_sol	NAT_sol	UVA_bio_sol
CN	6,32 ± 2,08	5,80 ± 2,45	0,43 ± 0,17	0,55 ± 0,21
CP	20,30 ± 3,26*	13,19 ± 2,42**	2,62 ± 0,72*	1,60 ± 0,37*
SOLO	5,70 ± 1,23	2,32 ± 1,09	0,43 ± 0,08	0,19 ± 0,10
PBAT	6,22 ± 2,33	6,80 ± 2,77	0, 45 ± 0,14	0,56 ± 0,30
NF1.5T1.5	5,62 ± 1,04	7,22 ± 2,71	0,46 ± 0,11	0,68 ± 0,23
NF1.5V1.5	5,65 ± 1,36	6,97 ± 2,05	0,43 ± 0,09	0,62 ± 0,16

*estatisticamente significativo (Kruskal-Wallis, $p<0,05$; comparações múltiplas pelo teste de Dunn); **estatisticamente significativo (ANOVA-um critério; $p<0,05$; comparações múltiplas pelo teste de Dunnett); CN: controle negativo; CP: controle positivo; NAT_sol: solubilizados preparados com solo puro e misturas de solo com amostras naturais antes do ensaio de biodegradação; UVA_bio_sol: solubilizados preparados com solo puro e misturas de solo com amostras envelhecidas após o ensaio de biodegradação. Fonte: O autor (2019).

Tabela 9- Resultados de CBPI e frequência de micronúcleos, brotos e pontes (%) pelo ensaio de micronúcleo em células HepG2/C3A para amostras de solubilizado.

Amostras	CBPI		Frequência de alterações (%)					
			Micronúcleo		Broto		Ponte	
	NAT_sol	UVA_bio_sol	NAT_sol	UVA_bio_sol	NAT_sol	UVA_bio_sol	NAT_sol	UVA_bio_sol
CN	1,87 ± 0,03	1,95 ± 0,01	0,70 ± 0,20	0,70 ± 0,20	1,10 ± 0,50	0,70 ± 0,10	0,70 ± 0,40	0,60 ± 0,2
CP	1,90 ± 0,03	1,96 ± 0,01	2,90 ± 0,40*	4,10 ± 0,40*	4,10 ± 0,90*	3,90 ± 0,5*	3,60 ± 0,90*	3,30 ± 0,40*
SOLO	1,95 ± 0,04	1,95 ± 0,02	0,50 ± 0,10	0,80 ± 0,10	0,90 ± 0,20	1,0 ± 0,2	0,50 ± 0,20	0,70 ± 0,30
PBAT	1,93 ± 0,03	1,95 ± 0,01	0,50 ± 0,10	0,70 ± 0,00	0,90 ± 0,20	0,8 ± 0,10	0,60 ± 0,20	0,50 ± 0,10
NF1.5T1.5	1,94 ± 0,03	1,96 ± 0,02	0,40 ± 0,10	0,80 ± 0,10	0,70 ± 0,10	0,8 ± 0,10	0,70 ± 0,20	0,6 ± 0,10
NF1.5V1.5	1,94 ± 0,04	1,95 ± 0,01	0,50 ± 0,10	0,90 ± 0,20	0,90 ± 0,20	0,8 ± 0,10	0,40 ± 0,20	0,5 ± 0,20

*estatisticamente significativo (Kruskal-Wallis, $p<0,05$; comparações múltiplas pelo teste de Dunn); CN: controle negativo; CP: controle positivo; NAT_sol: solubilizados preparados com solo puro e misturas de solo com amostras naturais antes do ensaio de biodegradação; UVA_bio_sol: solubilizados preparados com solo puro e misturas de solo com amostras envelhecidas após o ensaio de biodegradação. Fonte: O autor (2019).