



UNIVERSIDADE
ESTADUAL de LONDRINA

AMANDA ALEIXO MOREIRA

**DESENVOLVIMENTO E APLICAÇÃO DE MATERIAIS
BIODEGRADÁVEIS NA AGRICULTURA**

Londrina
2019

AMANDA ALEIXO MOREIRA

**DESENVOLVIMENTO E APLICAÇÃO DE MATERIAIS
BIODEGRADÁVEIS NA AGRICULTURA**

Tese apresentada ao programa de Pós-graduação em Biotecnologia, nível doutorado, da Universidade Estadual de Londrina.

Orientador: Prof. Dr. André Luíz Martinez de
Oliveira

Co-orientador: Prof. Dr. Fábio Yamashita

Londrina
2019

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

Moreira, Amanda Aleixo.

Desenvolvimento e Aplicação de Materiais Biodegradáveis na Agricultura / Amanda Aleixo Moreira. - Londrina, 2019.

168 f. : il.

Orientador: André Luiz Martinez de Oliveira.

Coorientador: Fábio Yamashita.

Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Exatas, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, 2019.

Inclui bibliografia.

1. Extrusão-injeção - Tese. 2. Resíduos Agroindustriais - Tese. 3. Microbiota do solo - Tese. 4. Bactérias Promotoras de Crescimento Vegetal (BPCV) - Tese. I. de Oliveira, André Luiz Martinez. II. Yamashita, Fábio. III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Exatas. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. IV. Título.

AMANDA ALEIXO MOREIRA

**DESENVOLVIMENTO E APLICAÇÃO DE MATERIAIS
BIODEGRADÁVEIS NA AGRICULTURA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, nível Doutorado, da Universidade Estadual de Londrina.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Fábio Yamashita
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Prof^a. Dr^a. Cristiane de Conte Medina
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Prof^a. Dr^a. Thais de Souza Rocha
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Dr^a. Ana Elisa Stefani Vercelheze
Serviço Nacional de Aprendizado Industrial –
SENAI

Dr^a. Flávia Debiagi
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Londrina, 02 de abril de 2019.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Estadual de Londrina – UEL e em especial ao programa de pós-graduação em Biotecnologia.

Ao meu orientador Prof. Dr. André Luiz Martinez de Oliveira pela orientação, ensinamentos, aprendizado, paciência e confiança no meu trabalho.

Ao meu co-orientador Prof. Dr. Fabio Yamashita pela orientação e comprometimento, que fez possível o desenvolvimento deste trabalho.

À Maria Tereza de Paula pela ajuda em todas as etapas deste trabalho, além da sua amizade e carinho, não tenho palavras para expressar a minha eterna gratidão.

À Fabíola Azanha de Carvalho e Ana Paula Bilck pela colaboração na produção dos tubetes e ensinamentos, à Aline Merci pelo auxílio nas análises de FT-IR e à Sabrina Alves de Oliveira pelo auxílio no desenvolvimento das estruturas químicas.

À estagiária de Iniciação Científica Jordana Nogueira Laite de Araújo pelo auxílio nas análises laboratoriais.

Aos amigos e parceiros do grupo de pesquisa, em especial à Karina Maria Lima Milani e à Mônica Yorlady Alzate Zuluaga pela amizade, valiosas sugestões e pelos momentos de descontração.

Ao Laboratório de Espectroscopia – LABSPEC pela realização das análises térmicas e FT-IR, ao LARX – Laboratórios de Análises por Técnicas de Raios X e ao Laboratório de Microscopia Eletrônica e Microanálise – LMEM.

À todos os professores do departamento de Bioquímica e Biotecnologia da Universidade Estadual de Londrina – UEL pela grande contribuição no meu desenvolvimento acadêmico.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)/MEC pela concessão da bolsa de estudos.

À minha família, em especial meu marido Claudinei Camargo Ferreira, minha filha Alice Camargo Aleixo, meus pais Sueli Aleixo Moreira e Maurício Sebastião Moreira e meu irmão Vinícius Moreira pelo apoio, incentivo e carinho em todos os momentos.

A todos que contribuíram direta ou indiretamente para a finalização deste trabalho.

MOREIRA, Amanda Aleixo. **Desenvolvimento e aplicação de materiais biodegradáveis na agricultura**. 2019. 168 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2019.

RESUMO

O alto desempenho dos materiais produzidos a partir de polímeros não degradáveis tem permitido sua aplicação em diversas áreas, incluindo a agricultura, que analisa o problema de sua eliminação quando a vida útil termina. Considerando a importância dos plásticos na fabricação de materiais para uso agrícola e a necessidade de diminuir o desperdício de plásticos no meio ambiente, este trabalho teve como objetivo desenvolver materiais plásticos biodegradáveis para aplicações agrícolas sustentáveis. As formulações de materiais biodegradáveis foram produzidas pelos processos de extrusão, seguido pela moldagem por injeção, com diferentes fibras naturais (bagaço de cana, casca de aveia e resíduo de exuvia de bicho da seda), tanino, glicerol, polímeros como polivinil álcool (PVA), poliácido láctico (PLA) e amido, bem como fosfato de rocha, açúcar, extrato de levedura, leite em pó desnatado, como nutrientes. O trabalho foi realizado em quatro etapas, na primeira foram produzidos compósitos com PVA e as diferentes fibras naturais, mesma concentração, totalizando três formulações, as quais foram capazes de aumentar a atividade microbiana do solo conforme sua biodegradação em até 38% após 35 dias, em substrato orgânico florestal, acompanhada pelas determinações de parâmetros microbiológicos do solo (C-BMS, RBS e qCO_2), pH, composição protéica e de açúcares dos compósitos, microscopia eletrônica de varredura e espectroscopia por infravermelho com transformada de Fourier, a cada sete dias, servindo de base para projeção de novos produtos biotecnológicos. Na segunda etapa foi selecionado o bagaço de cana, por apresentar menor taxa de biodegradação comparada às outras fibras, adicionado tanino e realizada a substituição do PVA pelo PLA para o desenvolvimento de compósitos de fontes renováveis, os quais foram avaliados quanto à influência da adição de tanino nas propriedades mecânicas, solubilidade e absorção de água e o efeito até 60 dias da biodegradação em substrato orgânico florestal, quanto sua estrutura, morfologia, propriedade termogravimétrica e cristalinidade. A formulação com tanino apresentou melhor rendimento de produção, melhores propriedades mecânicas e degradação mais lenta. Na terceira etapa as formulações de compósitos com e sem tanino foram utilizadas para fabricação de tubetes (12 cm x 3–1,5 cm) e avaliados o efeito no solo [mistura de solo a granel (Alfisol) e areia (1: 2 g/g, respectivamente)] por 180 dias, utilizando indicadores microbiológicos (N-BMS, C-BMS, RBS e qCO_2) e químicos (pH, $C_{orgânico}$, $N_{orgânico}$, Al, K, Ca, Mg e P) de qualidade do solo. O estudo de biodegradação demonstrou uma meia-vida de 120 dias no solo para tubetes sem tanino e 150 dias para tubetes com tanino. A análise dos indicadores microbiológicos indicou um estímulo da população e atividade microbiana em resposta à adição de materiais biodegradáveis, com menor efeito nos solos onde a formulação contendo tanino foi adicionada. Os indicadores químicos apresentaram valores aumentados de pH, K, Ca e P em relação ao solo sem material introduzido. Na quarta etapa o tubete com tanino foi selecionado, devido seu melhor processamento e vida útil, para imobilização de *Azospirillum brasilense* Abv5 e a imersão sequencial do tubete em duas soluções diferentes (goma xantana-amido seguida por uma base de gelatina) foi a melhor

estratégia para imobilizar as células Ab-V5, levando à alta densidade populacional das células e viabilidade até 56 dias de armazenamento. Além disso, as células imobilizadas foram liberadas rápida e facilmente dos tubetes quando imersas em água ou enterradas na areia, sugerindo inclusive a conversão de compostos nutricionais liberados dos tubetes em biomassa bacteriana. A aplicação como inoculante nos tubetes bacterizados em mudas de tomate foi eficiente, com aumentos em todos os parâmetros avaliados para a planta. Portanto, os materiais e os processos descritos no presente estudo demonstram grande potencial em combinar o design de materiais biodegradáveis para aplicações biotecnológicas, no condicionamento e biorremediação de solos degradados, desenvolvimento de produtos agrícolas e florestais (recipientes) e como suporte para bactérias promotoras de crescimento vegetal, sendo altamente sustentáveis.

Palavras-chave: Extrusão-injeção. Resíduos agroindustriais. Microbiota do solo. Bactérias promotoras de crescimento vegetal (BPCV). Biotecnologia.

MOREIRA, Amanda Aleixo. **Development and application of biodegradable materials in agriculture.** 2019. 168 p. Thesis (Doctor's Degree in Biotechnology.) - State University of Londrina, 2019.

ABSTRACT

The high performance of materials produced from non-degradable polymers has allowed its application in several areas including agriculture, which raises the problem of its disposal when useful life-time ends. Considering the importance of plastics in manufacturing materials for agricultural use and the need to decrease the waste of plastics in environment, this work aimed to develop biodegradable plastic materials for sustainable agriculture applications. The formulations of biodegradable materials were produced by extrusion processes, followed by injection molding with different natural fibers (sugarcane bagasse, oat hulls and silkworm exuvia), tannin, glycerol, polymers such as polyvinyl alcohol (PVA), polylactic acid (PLA) and starch, as well as rock phosphate, sugar, yeast extract, skim powdered milk, as nutrients. The work was carried out in four steps, in the first one were produced composites with PVA and the different natural fibers, same concentration, totaling three formulations, which were able to increase the microbial activity of the soil according to its biodegradation in up to 38% after 35 days, in organic forest substrate, accompanied by determinations of soil microbiological parameters (MBC, RB and qCO_2), pH, protein and sugar composition of the composites, scanning electron microscopy and Fourier transform infrared spectroscopy, every seven days, serving as the basis for the projection of new biotechnological products. In the second step, the sugarcane bagasse was selected, because it presented a lower rate of biodegradation compared to the other fibers, tannin was added and PLA was replaced by PVA for the development of composites from renewable sources, which were evaluated for the influence of the addition of tannin on the mechanical properties, solubility and absorption of water and the effect up to 60 days of biodegradation in forest organic substrate, as well as its structure, morphology, thermogravimetric properties and crystallinity. The formulation with tannin presented better production yield, better mechanical properties and slower degradation. In the third step the formulations of composites with and without tannin were used to manufacture tubes (12 cm x 3-1.5 cm) and evaluated the effect on the soil [mixture of bulk soil (Alfisol) and sand (1: 2 w/w, respectively)] for 180 days, using microbiological indicators (MBN, MBC, RB and qCO_2) and soil chemical quality (pH, $C_{organic}$, $N_{organic}$, Al, K, Ca, Mg and P). The biodegradation study demonstrated a half-life of 120 days in the soil for tubes without tannin and 150 days for tubes with tannin. Analysis of microbiological indicators indicated a population stimulus and microbial activity in response to the addition of biodegradable materials, with a lower effect in soils where the tannin-containing formulation was added. The chemical indicators presented increased values of pH, K, Ca and P in relation to the soil without introduced material. In the fourth step, the tannin tube was selected, due to its better processing and service life, for immobilization of *Azospirillum brasilense* Abv5 and the sequential immersion of the tube in two different solutions (starch-xanthan gum based followed by a gelatin-starch based) was the best strategy to immobilize the Ab-V5 cells, leading to the high population density of the cells and viability up to 56 days of storage. In addition, immobilized cells were fast and easily released from the

containers when immersed in water or buried in sand, even suggesting the conversion of nutritional compounds released from the containers into bacterial biomass. The application as inoculant in the bacterized tubes in tomato plants was efficient, with increases in all parameters evaluated for the plant. Therefore, the materials and processes described in the present study demonstrate the huge potential in combining the design of biodegradable materials for biotechnological applications, in the conditioning and bioremediation of degraded soils, the development of agricultural and forestry products (containers) and as a support for growth promoting bacteria, being highly sustainable.

Keywords: Blends extrusion-injection. Agroindustrial waste. Soil microbiota. Plant growth-promoting bacteria (PGPB). Biotechnology.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

CAPÍTULO 1 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Figura 1 - Classificação dos polímeros biodegradáveis.....	25
Figura 2 - Obtenção do PVA pela hidrólise alcalina do poli-(vinil acetato)	26
Figura 3 - Estrutura química do PLA.....	27
Figura 4 - Estrutura molecular da amilose (a) e amilopectina (b)	29
Figura 5 - Estrutura molecular da celulose	31
Figura 6 - Componentes de uma extrusora mono-rosca.	34
Figura 7 - Esquema de uma injetora	35
Figura 8 - Formas de interação de BPCV com as plantas.....	39
Figura 9 - Comparação entre o encapsulamento de bactérias para utilização na fermentação industrial e como inoculante para uso agrícola ou ambiental	44
Figura 10 - Métodos para imobilização de células.....	45

CAPÍTULO 2 – BIODEGRADABLE PLASTIC DESIGNED TO IMPROVE THE SOIL QUALITY AND MICROBIOLOGICAL ACTIVITY

Figure 1 - Images of injection-mold samples produced with different biopolymeric fillers, before and after being subjected to biodegradation in a commercial substrate for seedlings production for 35 days. Samples produced with sugarcane bagasse (SB-composites), oat hulls (OH-composites) and silkworm exuvia waste (SE-composites).....	65
Figure 2 - Effect of different fillers (sugarcane bagasse - SB, oat hulls - OH, and silkworm exuvia waste- SE) on (a) the solubility in water (SW) and (b) water absorption capacity (WAC) of samples prepared with PVA, cassava starch, crystal sugar, powdered skim milk, yeast extract, and rock phosphate	67
Figure 3 - Surface view of samples as observed through SEM. Micrographs a, d, g, j, m and p correspond to the surfaces of materials formulated with sugarcane bagasse (SB). Micrographs b, e, h, k, n and q correspond to surface views of the materials formulated with oat hulls (OH). Micrographs c, f, i, l, o and r correspond to	

surface views of materials formulated with silkworm exuvia waste (SE). The images were obtained from fresh samples (a, b and c) and samples subjected to increasing biodegradation times of 7 (d, e and f), 14 (g, h and i), 21 (j, k and l), 28 (m, n and o) and 35 (p, q and r) days during which they were buried in a commercial organic substrate for seedlings production. Arrows indicate bacterial clumps (g, j, m and p) and fungal hyphae (h, i, k, l, n, o, q and r). Circle in l highlight the presence of reproductive fungal structures (sporangia).....69

Figure 4 - FT-IR spectra of formulations with sugarcane bagasse (SB), oat hulls (OH) and silkworm exuvia waste (SE). The spectra were recorded in samples before (a) and after biodegradation for different periods of time in a commercial substrate for seedlings production. The notation of numbers after the abbreviations of composite formulations (SB-, OH- and SE-) indicates the period of time, in days, during which the samples remained buried in the organic substrate (the biodegradation time period)..74

Figure 5 - Correlation matrix of associations between biodegradation and the microbiological parameters of composite samples based on PVA and cassava starch with different fillers (sugarcane bagasse - SB, oat hulls – OH, or silkworm exuvia waste - SE). Flat and rounded ellipses indicate strong and weak correlations, respectively; the color density indicates positive/negative correlations according to the scale bar. The correlation values between the variables are indicated in the lower triangular portion of the matrix, and insignificant correlations ($p > 0.05$) are evidenced by the “X” mark in the respective ellipses. Min weight loss of samples, MBC microbial biomass carbon, R_B basal respiration, qCO_2 metabolic quotient, TS total sugar content, RS reducing sugar content, PT total protein content, and pH hydrogen ionic potential..78

CAPÍTULO 3. TANNIN IMPROVES BIODEGRADABLE THERMOSET MATERIALS PRODUCED BY INJECTION MOLDING

- Figure 1** - Effect of tannin on (a) the solubility in water (SW) and (b) water absorption capacity (WAC) of different biodegradable thermoset materials (BTM) prepared with PLA, cassava starch, crystal sugar, powdered skin milk, yeast extract and rock phosphate. BTM-TAN, BTM with tannin and BTM-CONT, BTM without tannin..93
- Figure 2** - Weight-loss (as percentage %) of injection-mold biodegradable thermoset materials (BTM) produced with (BTM-TAN) and without tannin (BTM-CONT), after buried for 30 and 60 days in commercial soil substrate recommended for seedlings growth....95
- Figure 3** - Photographic images of biodegradable thermoset materials (BTM) produced with (BTM-TAN) and without tannin (BTM-CONT) in the formulation before (a) and after 30 (b) or 60 days (c) subjected to biodegradation in a commercial soil substrate recommended for seedlings growth...96
- Figure 4** - SEM micrographs morphology of the biodegradable thermoset materials (BTM), BTM with tannin (BTM-TAN) and BTM without tannin (BTM-CONT), before and after the biodegradation in commercial substrate for seedlings production...98
- Figure 5** - FT-IR spectra of biodegradable thermoset materials (BTM), BTM with tannin (BTM-TAN) and BTM without tannin (BTM-CONT), before and after biodegradation in commercial substrate for seedlings production...99
- Figure 6** - Thermogravimetric analysis for biodegradable thermoset materials (BTM), BTM with tannin (BTM-TAN) and BTM without tannin (BTM-CONT), before and after biodegradation in commercial substrate for seedlings production101
- Figure 7** - X-ray diffractograms of the biodegradable thermoset materials (BTM), BTM with tannin (BTM-TAN) and BTM without tannin (BTM-CONT), before and after biodegradation in commercial substrate for seedlings production.....102

CAPÍTULO 4. BIODEGRADABLE PLASTIC MATERIAL DESIGNED TO IMMOBILIZE PLANT GROWTH-PROMOTING BACTERIA IMPROVES SOIL QUALITY AND GROWTH OF TOMATO SEEDLINGS

- Figure 1 -** Release of immobilized *A. brasilense* Ab-V5 cells from bio-pots immersed in water, according to different immobilization procedures (a) and short-term survival (up to 7 days of storage) of immobilized cells in materials stored at room temperature (b). Values of colony forming units (CFU) are presented as $\log_{10}$. Different letters indicate statistically significant differences according to Tukey's test ($p < 0.05$). $n = 4$ 116
- Figure 2 -** Release of immobilized *A. brasilense* Ab-V5 cells from bio-pots buried in sterilized sand at 30% umidity, according to different immobilization procedures (a) and respective survival when stored at room temperature 56 days (b). Values of colony forming units (CFU) are presented as $\log_{10}$. Different letters indicate statistically significant differences according to Tukey's test ($p < 0.05$). $n = 4$ 118
- Figure 3 -** SEM micrographs (a-surface) and (b-fracture) of biodegradable containers (injection-mold bio-pots sterilized. Micrographs (c-surface) and (d-fracture) of bio-pots immersed in solution B (starch-xanthan gum based) and solution A (gelatin-starch based) for 1-hour each without bacteria. Micrographs (e-surface) and (f-fracture) of bio-pots with immobilized *Azospirillum brasilense* Ab-V5 cells (2×10^9 cells cm^{-2} material). Immobilization procedures were performed one week before use in a two-step process using solution B and solution A with bacterial suspensions, by immersion of materials 1-hour each solution. $n = 3$ 119
- Figure 4 -** Photographs of bio-pots produced without tannin (NT) and with tannin (WT) before and after 180 days the biodegradation in a mixture of sand and Alfisol (2:1) as substrate.....121

Figure 5 - Visual aspect of tomato seedlings and respective root system after 35 days of growth in biodegradable containers (injection-mold bio-pots) under nursery conditions. Plant grown in bio-pot containing immobilized *Azospirillum brasilense* Ab-V5 cells (2×10^9 cells cm^{-2} material; Fig 4a and 4c) and plant grown in bio-pot without immobilized bacteria (Figure 4b and 4d) are shown.126

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Tabela 1 -	Classificações e definições aplicadas a diferentes materiais poliméricos	20
-------------------	--	----

CAPÍTULO 2. BIODEGRADABLE PLASTIC DESIGNED TO IMPROVE THE SOIL QUALITY AND MICROBIOLOGICAL ACTIVITY

Table 1 -	General composition of formulations mixtures used to produce composites by extrusion followed by injection-molding.	57
Table 2 -	Biodegradation of composite materials formulated using sugarcane bagasse (SB), oat hulls (OH) or silkworm exuvia waste (SE) as fillers and microbiological parameters from the respective substrates in which biodegradation occurred. The values represent the means of three determinations. The sampling time corresponds to the elapsed time during which the samples remained buried in a commercial substrate used to produce seedlings.	73

CAPÍTULO 3. TANNIN IMPROVES BIODEGRADABLE THERMOSET MATERIALS PRODUCED BY INJECTION MOLDING

Table 1 -	Mechanical properties of the biodegradable thermoset materials (BTM) produced with composite formulations supplemented (BTM-TAN) or not (BTM-CONT) with 1% tannin.	94
------------------	---	----

CAPÍTULO 4. BIODEGRADABLE PLASTIC MATERIAL DESIGNED TO IMMOBILIZE PLANT GROWTH-PROMOTING BACTERIA IMPROVES SOIL QUALITY AND GROWTH OF TOMATO SEEDLINGS

Table 1 -	Composition of the formulation mixtures used to produce containers for plant propagation by extrusion followed by injection-molding	110
------------------	---	-----

Table 2 -	Different procedures and respective sequential steps applied over bio-pots injected-mold samples to immobilize <i>Azospirillum brasilense</i> Ab-V5 cells.....	112
Table 3 -	Biodegradation kinetics of bio-pots produced with (WT) and without tannin (NT) as formulation additive, and respective microbiological indicators from soils where biodegradation take place, including a reference control soil (CS) where no material was added. Sampling time indicates the elapsed time which samples remained in the microcosms filled with a mixture of sand and Alfisol (2:1) as substrate. $n = 3$	120
Table 4 -	Chemical analysis of substrates where the biodegradation of bio-pots produced with (WT) and without tannin (NT) as formulation additive has developed, including a reference control soil (CS) where no material was added. Sampling time indicates the elapsed time which samples remained in the microcosms filled with a mixture of sterilized sand and Alfisol (2:1) as substrate. $n = 3$	124
Table 5 -	Biometric parameters of tomato seedlings grown for 35 days in biodegradable containers (injection-mold bio-pots) produced with 35% PLA, 23.2% cassava starch, 20% sugarcane bagasse, 12.4% glycerol, 3.7% yeast extract, 2.5% rock phosphate, 1.5% crystal sugar, 1.0% tannin and 0.7% powdered skim milk. Bio-pots were evaluated with and without immobilized <i>Azospirillum brasilense</i> Ab-V5 cells (2×10^9 cells cm^{-2} material). Immobilization procedures were performed one week before use in a two-step process using different bacterial suspensions, by immersion of materials 1-hour each solution. $n = 3$	125

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	20
CAPÍTULO 1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	22
1 POLÍMEROS BIODEGRADÁVEIS	23
1.1 Poli-(vinil álcool) (PVA)	26
1.2 Poli-(ácido láctico) (PLA)	27
1.3 Amido.....	28
1.4 Fibras Vegetais.....	30
2 BIODEGRADAÇÃO	31
3 PROCESSO DE EXTRUSÃO E INJEÇÃO	33
4 MATERIAIS BIODEGRADÁVEIS APLICADOS NA AGRICULTURA	36
5 BACTÉRIAS PROMOTORAS DE CRESCIMENTO VEGETAL (BPCV)	38
5.1 Gênero <i>Azospirillum</i>	40
5.2 Inoculantes... ..	41
5.3 Imobilização de Células.....	43
REFERÊNCIAS.....	47
CAPÍTULO 2. BIODEGRADABLE PLASTIC DESIGNED TO IMPROVE THE SOIL QUALITY AND MICROBIOLOGICAL ACTIVITY	57
1 INTRODUCTION	57
2 MATERIAL AND METHODS	59
2.1 Materials, Extrusion and Injection-Molding Conditions	59
2.2 Solubility in Water (SW) and Water Absorption Capacity (WAC).....	61
2.3 Biodegradation Trial.....	61
2.4 Scanning Electron Microscopy (SEM)	62

2.5	Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR).....	62
2.6	Soil Microbial Biomass Carbon (MBC), Basal Respiration (R_B) and Metabolic Quotient (qCO_2).....	63
2.7	Soluble Total and Reducing Sugars, Soluble Proteins and pH.....	64
2.8	Statistical Analysis	64
3	RESULTS AND DISCUSSION	65
3.1	Production of Composite Materials.....	65
3.2	Solubility in Water (SW) and Water Absorption Capacity (WAC)	66
3.3	Scanning Electron Microscopy (SEM)	69
3.4	Fourier Transform-Infrared Spectroscopy (FT-IR)	73
3.5	Biodegradation and Soil Microbiological Parameters	75
4	CONCLUSIONS.	78
	REFERENCES.....	79

CAPÍTULO 3. TANNIN IMPROVES BIODEGRADABLE THERMOSET MATERIALS PRODUCED BY INJECTION MOLDING

1	INTRODUCTION	86
2	MATERIAL AND METHODS	88
2.1	Material.....	88
2.2	Extrusion and Injection Molding Conditions	88
2.3	Solubility in Water (SW) and Water Absorption Capacity (WAC)	89
2.4	Mechanical Properties	89
2.5	Biodegradation Trial.....	90
2.6	Scanning Electron Microscopy (SEM)	91
2.7	Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR).....	91
2.8	Thermogravimetric analysis (TGA)	91
2.9	X-ray diffraction (DRX).....	91
2.10	Statistical analysis	92
3	RESULTS AND DISCUSSION	92

3.1	Solubility in Water (SW) and Water Absorption Capacity (WAC).....	92
3.2	Biodegradable Thermoset Materials Production and Mechanical Properties	94
3.3	Biodegradation Trial.....	94
3.4	Microstructure of the Materials	97
3.5	Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR).....	98
3.6	Thermogravimetric Analysis (TGA) and X-Ray Diffraction (DRX)	100
4	CONCLUSIONS	102
	REFERENCES.....	103

CAPÍTULO 4. BIODEGRADABLE PLASTIC MATERIAL DESIGNED TO IMMOBILIZE PLANT GROWTH-PROMOTING BACTERIA IMPROVES SOIL QUALITY AND GROWTH OF TOMATO SEEDLINGS			107
1	INTRODUCTION.....		107
2	MATERIAL AND METHODS		109
2	Plant Growth-Promoting Bacterial Strain and Growth Conditions		109
2.2	Materials, Extrusion and Injection Molding Conditions.....		110
2.3	Immobilization of <i>A. brasilense</i> Ab-V5 on Bio-Pots.....		111
2.3.1	Survival of immobilized <i>A. brasilense</i> Ab-V5 on bio-pots.....		112
2.3.2	Release of immobilized <i>A. brasilense</i> Ab-V5 cells from the bio-pots		113
2.3.3	Scanning electron microscopy (SEM)		113
2.4	Biodegradation of Bio-Pots and Resulting Impacts on Soil Microbiological and Chemical Parameters.....		113
2.4.1	Biodegradation of bio-pots.....		114
2.4.2	Impact of biodegradation of bio-pots on microbiological and chemical properties of soil microcosms		114
2.5	Application of Bio-Pots with the Immobilized Plant Growth-Promoting Bacterial to Growth Tomato Seedlings		115
2.6	Statistical Analysis		116

3	RESULTS.....	116
3.1	Release, Survival and SEM of <i>A. brasilense</i> Ab-V5 Immobilized in Bio-Pots.....	116
3.2	Biodegradation and Effect of Bio-Pots in Soil Microbiological Indicators.....	120
3.3	Growth of Tomato Seedlings on Bio-Pots with Immobilized Ab-V5 Cells.....	125
4	DISCUSSION	126
4.1	Survival of <i>A. brasilense</i> Ab-V5 Immobilized in Bio-Pots and Controlled Release of Cells in Water and Sand.....	126
4.2	Biodegradation and Increase Soil Quality.....	128
5	CONCLUSIONS	131
	REFERENCES.....	131
	SUPPLEMENTARY MATERIAL	136
	ANEXOS	137
	ANEXO A – PATENTE 1: Número do Processo BR 1020180072269.....	138
	ANEXO B – PEDIDO DE PATENTE 2.....	154

INTRODUÇÃO

A produção mundial de plástico em 2016 foi de 335 milhões de toneladas, conforme relatório da Associação Europeia de Fabricantes de Plásticos - PlasticEurope (2017). Esse uso extensivo de produtos plásticos tem levantado questões sobre seu impacto ambiental (JAYANTH et al., 2017; GU et al., 2017). O destino de materiais plásticos recalcitrantes dispostos no meio ambiente pode causar um enorme impacto negativo sobre paisagens, bem-estar e saúde humana, incluindo o potencial de bioacumulação de seus produtos (ROCHMAN et al., 2013; HUERTA et al., 2017). Waters et al. (2016) atribuíram o aumento da geração de resíduos plásticos como um dos fatores responsáveis por uma nova era geológica, o Antropoceno, que se iniciou à medida que as intervenções humanas no planeta foram intensificadas a partir de meados do século XX. As consequências ambientais do Antropoceno envolvem a presença de plásticos derivados de petróleo encontrados como sedimentos em quantidades crescentes, levando a alterações nos ciclos biogeoquímicos e modificação de comunidades bióticas em solos (plantas, micróbios, insetos), com perda de qualidade em terras cultiváveis.

A substituição de materiais plásticos recalcitrantes por plásticos biodegradáveis produzidos com materiais naturais ou sintéticos surge como uma alternativa para reduzir e até mesmo remediar parte do impacto deletério do Antropoceno sobre o meio ambiente (JAYANTH et al., 2017; GU et al., 2017). Além disso, vários polímeros biodegradáveis podem ser misturados com outros materiais para produzir materiais com características completamente diferentes das observadas nos compostos individuais (YANG et al., 2015). Misturas desses materiais em formulações biodegradáveis podem permitir projetar respostas ambientais específicas ao longo de sua mineralização (antes, durante ou após sua disposição no solo circundante), abrindo novas perspectivas ao uso de plásticos biodegradáveis para condicionamento do solo e biorremediação de solos degradados. Assim, além da substituição de plásticos recalcitrantes por plásticos biodegradáveis, a composição da mistura dos materiais pode promover melhorias da qualidade do solo pelo estímulo da microbiota para a agricultura ou outras utilizações.

A composição de formulações projetadas para melhoria da qualidade do solo inclui nutrientes, cuja utilização também pode ser aplicada como suporte para

imobilização de bactérias promotoras do crescimento vegetal (BPCV). As BPCV correspondem a um grupo de microrganismos benéficos às plantas em virtude da capacidade de colonizarem a superfície das raízes, rizosfera, filosfera e tecidos internos das plantas. Podem estimular o crescimento com obtenção de nitrogênio pela fixação biológica de nitrogênio (FBN), de produzirem hormônios de crescimento como auxinas e giberelinas, além da capacidade de atuação como solubilizadoras de fosfatos e agentes de controle biológico (DOBBELARE et al., 2003).

A inoculação de BPCV é realizada pela aplicação de inoculantes, definidos pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), como um produto que contém microrganismos que atuam favoravelmente no desenvolvimento das plantas (MAPA, 2011). Contudo, o sucesso na aplicação desses microrganismos está diretamente relacionado à qualidade de suas formulações (STEPHENS; RASK, 2000). Grande parte das formulações inoculantes desenvolvidas são líquidas, sendo sensíveis às variações ambientais como a radiação UV, temperatura, predação por protozoários e stress salino (WU et al., 2012). Esses fatores podem diminuir a viabilidade e a sobrevivência de um número suficiente de bactérias, impedindo suas atuações sobre as plantas (HEIJNEN; VAN VEEN, 1991). O desenvolvimento de formulações sólidas contendo as BPCV imobilizadas pode ser uma estratégia eficiente para proteção de dessecação, fornecimento de nutrientes e liberação de células no solo (KIM et al., 2012; SCHOEBITZ; LÓPEZ; ROLDÁN, 2013).

Considerando a necessidade por produtos de tecnologia “verde” o objetivo deste trabalho foi desenvolver formulações baseadas em fibras vegetais, provenientes de resíduos da agroindústria, polímeros como amido, PVA, PLA e nutrientes para aplicações como substitutos de materiais plásticos convencionais, visando proporcionar melhorias na qualidade do solo, utilizar como suporte para imobilização de BPCV e aplicar como inoculante.

Foram estudadas diferentes formulações, na busca pelo melhor processamento e produto, com avaliação da biodegradabilidade, análises microbiológicas do solo, testes físico-químicos, morfológicos, processos de imobilizações com BPCV capazes de manter a sobrevivência e viabilidade dos microrganismos no produto, assim como, experimentos em viveiro com os tubetes para avaliar o efeito da promoção do crescimento sobre mudas de tomate.

Este trabalho foi subdividido em quatro capítulos, organizados da seguinte forma:

- Capítulo 1: Revisão bibliográfica.
- Capítulo 2: Plástico biodegradável projetado para melhorar a qualidade do solo e a atividade microbológica.
- Capítulo 3: Tanino melhora materiais termofixos biodegradáveis produzidos por moldagem por injeção.
- Capítulo 4: Material plástico biodegradável projetado para imobilizar bactérias promotoras de crescimento vegetal melhora a qualidade do solo e promove o crescimento de mudas de tomate.

CAPÍTULO 1 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1. POLÍMEROS BIODEGRADÁVEIS

Existe uma expectativa mundial em reduzir a utilização de produtos plásticos petroquímicos, uma vez que tais materiais causam elevado impacto ambiental. Uma alternativa para esse problema é a substituição desses polímeros pelos polímeros que sejam totalmente biodegradáveis. Para se considerar um polímero biodegradável a assimilação completa no meio ambiente deve ocorrer. Um fator chave em tal assimilação é o período de tempo que é necessário. Para que haja um benefício ambiental significativo, essa assimilação deve ocorrer dentro de um prazo razoável (ZHENG; YANFUL; BASSI, 2005). Embora haja desentendimento sobre o tempo exato que é "razoável", há um consenso geral de que os prazos devem ser da ordem de meses para alguns anos, em vez de décadas para séculos (ZHENG; YANFUL; BASSI, 2005; LUCAS et al., 2008). Algumas terminologias a respeito de materiais poliméricos são apresentadas pela *American Society for Testing and Materials* (ASTM) (Tabela 1).

Tabela 1. Classificações e definições aplicadas a diferentes materiais poliméricos.

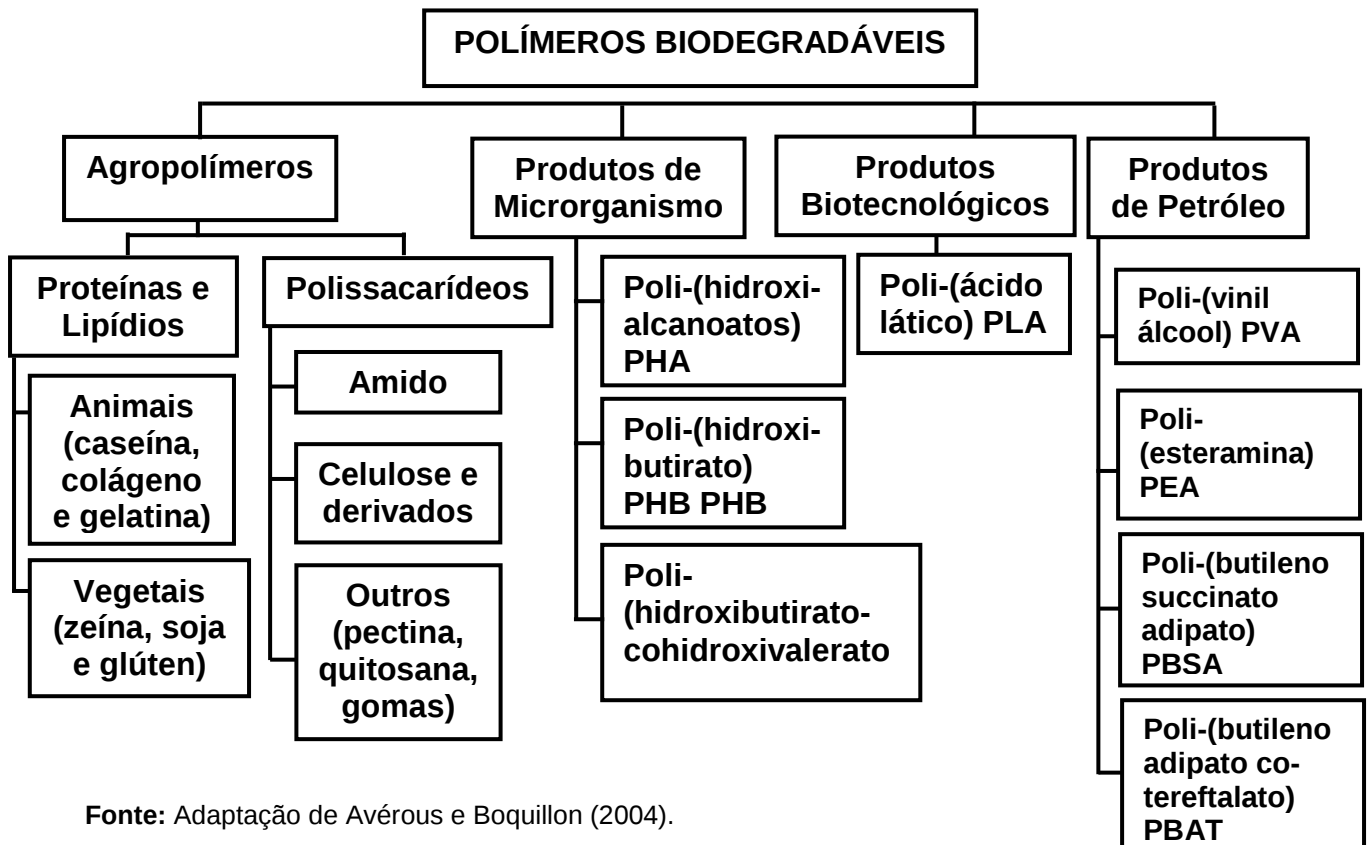
Polímero	Uma molécula grande composta por unidades repetitivas (monômeros) tipicamente conectadas por ligações covalentes.
Plástico	Um material que contém como ingrediente essencial uma ou mais substâncias poliméricas orgânicas de grande peso molecular, é sólido no seu estado acabado e, em algum momento na sua fabricação ou processamento em artigos acabados, pode ser moldado (ASTM-D883, 2012).
Bioplástico	Um plástico que é derivado da biomassa ou emitido a partir de monômeros derivados da biomassa e que, em algum momento do seu processamento em produtos acabados, pode ser moldado

	(VERT et al., 2012). A IUPAC desencoraja o uso do termo e propõe "polímero de base biológica".
Plástico de Base Biológica	Um plástico que contém carbono orgânico de origem renovável, como os materiais agrícolas, vegetais, animais, fungos, microrganismos, marinhos ou florestais que vivem em um ambiente natural em equilíbrio com a atmosfera (ASTM-D6866-16, 2016).
Plástico Degradável	Um plástico projetado para sofrer uma mudança significativa em sua estrutura química em condições ambientais específicas, resultando em perda de algumas propriedades que podem variar conforme medição por métodos de teste padrão apropriados para o plástico e a aplicação em um período de tempo que determina sua classificação (ASTM-D883, 2012).
Plástico Biodegradável	Um plástico degradável em que a degradação resulta da ação de microrganismos naturais, como bactérias, fungos e algas (ASTM-D883, 2012).
Plástico Compostável	Um plástico que sofre degradação biológica durante a compostagem para produzir dióxido de carbono, água, compostos inorgânicos e biomassa a uma taxa consistente com outros materiais compostáveis conhecidos e não deixa resíduos visivelmente distinguíveis ou tóxicos (ASTM-D883, 2012).
Plástico Hidro-degradável	Um plástico degradável em que a degradação resulta da hidrólise (ASTM-D883, 2012) como a celulose, amido e poliésteres (BONHOMME et al., 2003).
Plástico Degradável Oxidativamente	Um plástico degradável em que a degradação resulta da oxidação (ASTM-

	D883, 2012).
Plástico Oxo-Degradável	Estes plásticos se dividem em pequenos fragmentos ao longo do tempo graças a aditivos especiais, mas não são considerados biodegradáveis segundo a ASTM D6400 (KASIRAJAN; NGOUAJIO, 2012).
Plástico Fotodegradável	Um plástico degradável em que a degradação resulta da ação da luz natural (ASTM-D883, 2012).

Além da classificação de polímeros da ASTM, Avérous e Boquillon (2004), ainda enquadra os polímeros biodegradáveis em quatro grupos: produtos de origem agrícola, provenientes do fracionamento da biomassa; produtos de origem microbiana obtidos por fermentação; produtos de síntese biotecnológica e produtos derivados de petróleo (Figura 1).

Figura 1- Classificação dos polímeros biodegradáveis.

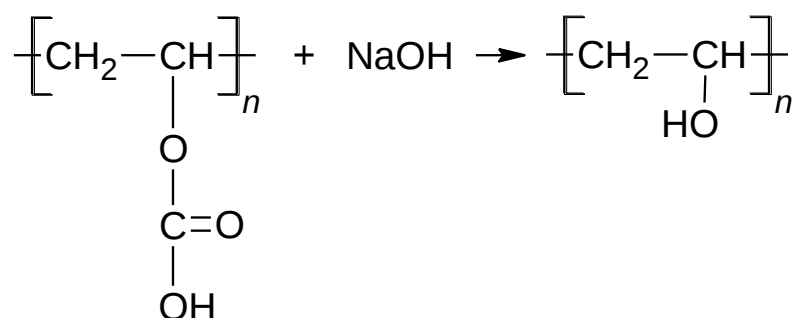


O alto custo dos polímeros biodegradáveis como PVA e PLA ainda é empecilho para a ampla utilização como substitutos dos polímeros petroquímicos convencionais. Pesquisas com produtos alternativos como amido, fibras vegetais em misturas com os polímeros biodegradáveis demonstram a possibilidade de redução de custos finais de produção, sendo mais competitivos frente aos polímeros petroquímicos convencionais.

1.1 Poli-(vinil álcool) (PVA)

O poli-(vinil álcool) (PVA), plástico biodegradável, é um polímero termoplástico e biocompatível a base de petróleo, solúvel em água, obtido pela hidrólise do poli-(vinil acetato) por Herrman e Haehnel, em 1924. Apresenta capacidade de conversão espontânea do álcool vinílico em enol de acetaldeído sem polimerização direta de seu monômero correspondente. Dessa forma, sua obtenção é realizada pela polimerização do acetato de vinila, com posterior reação de hidrólise alcalina em solução alcoólica do poli-(vinil acetato) para poli-(vinil álcool) (Figura 2).

Figura 2. Obtenção do PVA pela hidrólise alcalina do poli-(vinil acetato).



Fonte: A própria autora (ACD/Labs 2017. 1.2 Freeware Version).

O PVA é considerado polímero linear semicristalino pela presença de somente um grupamento funcional (hidroxila) em sua composição. Entretanto, a presença de grupos acetato residuais, provenientes do poli-(vinil acetato), diminui a cristalização e o grau de ligações de hidrogênio pela estrutura mais volumosa (GOODSHIP, 2009). As propriedades básicas do PVA são dependentes de seu grau de polimerização e de hidrólise. Quando o grau de hidrólise é aumentado, ocorre redução de solubilidade em água, associada à estabilização energética das ligações

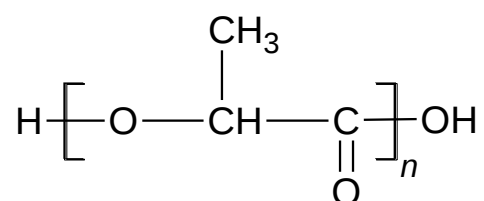
de hidrogênio intra e inter cadeias do polímero, ao aumento da adesão em superfícies hidrofílicas, viscosidade e resistência a tração (COSTA JÚNIOR; MANSUR, 2008).

O emprego do PVA como componente em materiais biodegradáveis é recomendado pelas suas características interfaciais e mecânicas. Sua aplicação industrial está relacionada por ser um polímero inodoro, atóxico, com boa capacidade emulsificante, adesiva, formação de filme, resistência a gases, óleos e uma série de solventes, além de boas propriedades mecânicas, com alta resistência à tração, compressão, abrasão e boa flexibilidade. Entretanto, tais características são dependentes da umidade, devido à água ser um plastificante para o PVA (AKCELRUD, 2007).

1.2 Poli-(ácido láctico) (PLA)

O poli-(ácido láctico) (PLA), plástico de base biológica, (Figura 3) apresentou sua síntese inicial por Carothers, em 1932. A obtenção industrial desse polímero é realizada pela polimerização do ácido láctico ou pela polimerização de abertura do anel do lactídeo (o dímero cíclico do ácido láctico, como intermediário) (LIM; AURAS; RUBINO, 2008; NAMPOOTHIRI; NAIR; JOHN, 2010; VINK; DAVIES, 2015). O PLA é um poliéster alifático termoplástico, atóxico, biocompatível e biodegradável, produzido a partir de recursos naturais renováveis não fósseis por fermentação de polissacarídeos, provenientes do milho, batata, melaço de cana e beterraba (VINK; DAVIES, 2015).

Figura 3. Estrutura química do PLA.



Fonte: A própria autora (ACD/Labs 2017. 1.2 Freeware Version).

O ácido láctico apresenta duas configurações opticamente ativas: os isômeros L (+) e D (-). O L-ácido láctico desvia o plano de luz polarizada em sentido horário e o D-ácido láctico, em sentido anti-horário (GUPTA; REVAGADE; HILBORN, 2007). Quando sintetizado quimicamente, produz uma mistura racêmica (50% D e 50% L). Pelo processo de fermentação é possível a produção específica, permitindo a produção essencialmente de um estereoisômero principal, com até 99,5% de isômero L e 0,5% de isômero D (VINK; RÁBAGO; GLASSNER, 2003).

As estruturas estereoquímicas poli-(L-ácido láctico) (PLLA) e poli-(D-ácido láctico) (PDLA) são semicristalinas, sendo que o PLLA apresenta maior cristalinidade. Essas formas do PLA possibilitam a obtenção de um polímero com diferentes propriedades, uma vez que há a possibilidade de alterar as proporções L e D (LIM et al., 2008). As características térmicas, mecânicas, de barreira e biodegradabilidade do PLA vão depender da escolha e distribuição de estereoisômeros dentro das cadeias do polímero. Os PLAs com maior teor de isômeros L são indicados quando existir a necessidade de maior resistência mecânica e maior tempo de degradação, pela sua propriedade mais cristalina; enquanto aqueles com maior teor de isômero D são, geralmente, utilizados em camadas de vedação térmica que necessitam de baixa temperatura de ativação, por ser menos cristalino (MEHTA; KUMAR; BHUNIA, 2005).

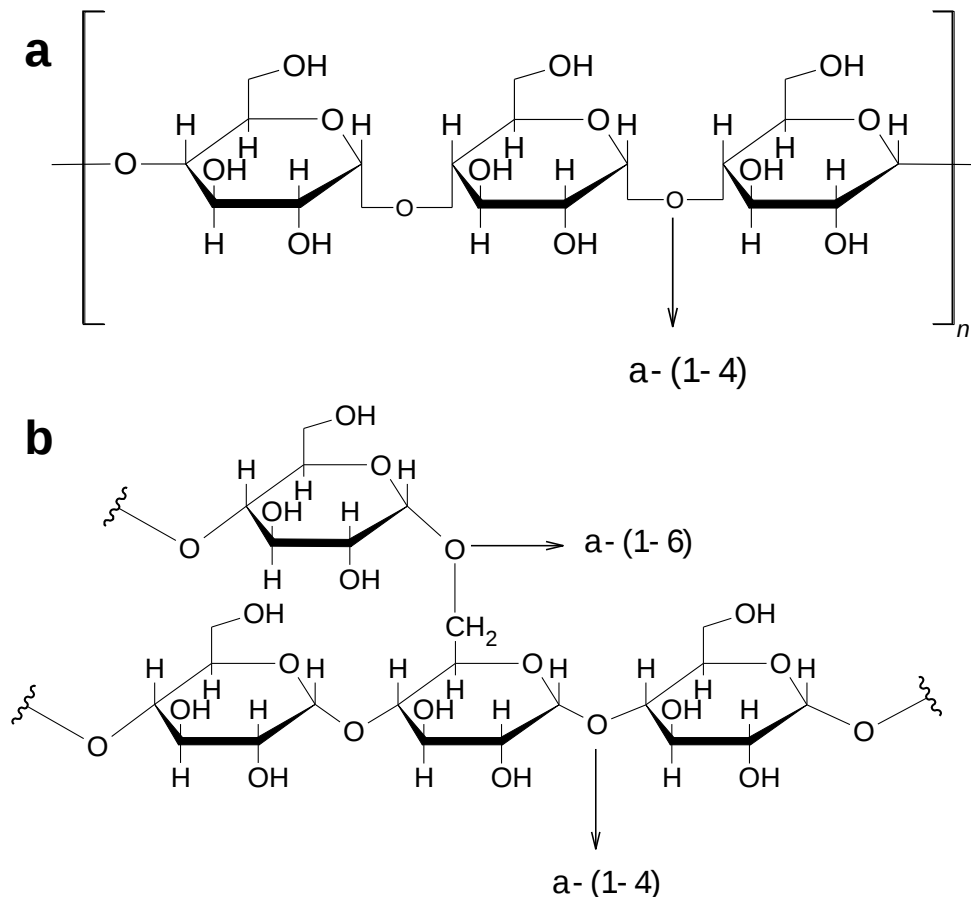
Os polímeros apresentados (PVA e PLA) ainda apresentam custo elevado, quando comparados a outros polímeros petroquímicos convencionais, como o polietileno e o polipropileno. Para se tornarem competitivos, podem-se misturar polímeros biodegradáveis de menor custo como o amido e fibras vegetais, os quais são abundantes e renováveis (TANG; ALAVI, 2011).

1.3 Amido

O amido é o polissacarídeo de reserva dos vegetais, constituído por polímeros de glicose em duas formas estruturais distintas, amilose e amilopectina (Figura 4). A amilose é um polímero linear com unidades de D-glicose por ligações glicosídicas α -(1-4). A amilopectina é um polímero ramificado constituído de D-glicose por ligações α -(1-4) e as ramificações α -(1-6). O comportamento da amilose é atribuído a sua característica linear, com massa molar (10^6 g/mol) cerca de dez vezes maior a de polímeros sintéticos. A massa molar da amilopectina é muito maior que a amilose,

na casa dos milhões g/mol; esta característica promove a redução da mobilidade das cadeias poliméricas (LIU et al., 2009).

Figura 4- Estrutura molecular da amilose (a) e amilopectina (b).



Fonte: A própria autora (ACD/Labs 2017. 1.2 Freeware Version).

A amilose e a amilopectina se distribuem em camadas em torno do núcleo dos grânulos, conferindo caráter semicristalino. A presença de regiões mais ordenadas é atribuída à maior concentração de amilopectina, de caráter cristalino; as regiões desordenadas são características de maior concentração de amilose, de caráter amorfo. Os graus de cristalinidade variam de 25 a 45%, com orientação regular das regiões amorfas e cristalinas, conferindo ao grânulo característica de birrefringência, conhecida como cruz de malta (HERNÁNDEZ-URIBE, 2003). Variações nas proporções entre estes componentes e em suas estruturas e propriedades podem resultar em grânulos de amido com propriedades físico-químicas e funcionais distintas (MALI; GROSSMANN; YAMASHITA, 2010).

As formulações realizadas somente com amido apresentam algumas limitações, incluindo propriedades mecânicas prejudicadas, quando comparadas aos polímeros sintéticos convencionais, e instabilidade de suas propriedades no armazenamento, pela sensibilidade à umidade e envelhecimento crítico (AVÉROUS; BOQUILLON, 2004). Por isso, há necessidade da realização de blends com outros polímeros biodegradáveis, incluindo celulose e poliésteres como PVA e PLA, para garantir a estabilidade do material e competitividade com produtos plásticos.

1.4 Fibras Vegetais

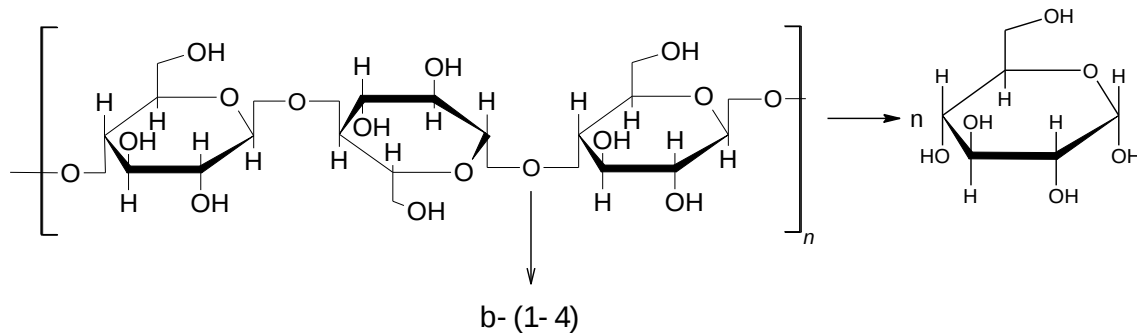
As fibras vegetais são constituídas por fibrilas de celulose ligadas à lignina e hemicelulos; em menores quantidades, são encontrados compostos inorgânicos e moléculas que podem ser extraídas com solventes orgânicos, incluindo pectina, terpenos, alcaloides, saponinas, compostos polifenólicos, gomas, resinas, óleos, dentre outros (ARAÚJO; WALDMAN; DE PAOLI, 2008). As fibras vegetais têm sido utilizadas para incorporação em materiais biodegradáveis pela possibilidade de melhorar as propriedades mecânicas e de barreira, atuando como agentes reforçadores. Além de serem encontradas em abundância, são biodegradáveis, de fontes renováveis, atóxicas e não abrasivas, apresentam baixo custo e compatibilidade com algumas matrizes poliméricas, como PVA, PLA e amido (TANG; ALAVI, 2012; SHIRAI et al., 2013).

As moléculas de celulose (Figura 5) presentes nas fibras vegetais são formadas pelas interações entre grupos hidroxila dos monômeros de glicose por ligações de hidrogênio. A celulose é um homopolímero linear, insolúvel, de alta massa molar, sendo o principal componente de sustentação dos vegetais, constituída de unidades repetitivas de β -D-glicopiranosil, unidas por ligações glicosídicas β (1–4). A celulose pode estar associada à hemicelulose e lignina ou entre si por ligações de hidrogênio, constituindo unidades cristalinas pela união de várias cadeias, mais resistentes (FENNEMA, 2000).

A hemicelulose é composta por hexoses (galactose, manose e glicose), pentoses (xilose e arabinose) e ácidos hexurônicos que contribuem na rigidez dos vegetais. A unidade mais abundante na hemicelulose é a xilose. As unidades de xilose se unem por ligações glicosídicas β (1–4). A hemicelulose apresenta natureza hidrofílica, ramificações e estrutura altamente amorfas e grau de polimerização de

100 até 200 (YANG; WYMAN, 2008).

Figura 5- Estrutura molecular da celulose.



Fonte: A própria autora (ACD/Labs 2017. 1.2 Freeware Version).

A lignina é um componente hidrofóbico tridimensional, altamente ramificada e amorfa, considerada um polifenol, o qual pode ser constituído por unidades de fenilpropano irregulares, que pode conter grupos hidroxila e metoxila como substituintes do grupo fenil. As unidades de lignina podem se unir por inter ligações de grupos éster. Atua como cimento entre as fibrilas, enrijecendo a estrutura (SILVA et al., 2009).

O Brasil apresenta grande disponibilidade de fibras vegetais, incluindo bagaço de cana-de-açúcar, casca de arroz, casca de aveia, casca de laranja, casca de coco, dentre outros. Grande parte dessas fibras é tratada como rejeitos das indústrias alimentícias e o seu aproveitamento é vantajoso à diminuição da quantidade do lixo sólido (ISHIZAKI et al., 2006). Entretanto, para a elaboração de materiais biodegradáveis com propriedades físicas e mecânicas adequadas, é necessária a adição de outros componentes, como o PVA ou PLA, polímeros biodegradáveis, que apresenta compatibilidade com as fibras vegetais e amido.

2. BIODEGRADAÇÃO

A biodegradação de materiais poliméricos ocorre por atividade biológica de microrganismos presentes naturalmente do solo, os quais transformam ou alteram por ação metabólica ou enzimática a estrutura de materiais introduzidos no meio

ambiente, com redução de sua massa molar (IUPAC, 2008). O processo de biodegradação ocorre inicialmente pela quebra da ligação carbono-carbono de longas cadeias do polímero em cadeias menores, as quais são usadas como uma fonte de alimento aos microrganismos e convertidas em água (H_2O), biomassa, dióxido de carbono (CO_2) e metano (CH_4), em condições aeróbias ou anaeróbias (THAKORE; DESAI; SARAWADE, 2001; GANOTOPOULOU, 2014).

Nas condições aeróbias os microrganismos utilizam O_2 como aceptor de elétrons, quebram por ação enzimática os materiais poliméricos em compostos menores e liberam no meio ambiente, principalmente, CO_2 . As condições anaeróbias começam quando não há ou acaba o oxigênio. Alguns microrganismos anaeróbios utilizam nitrato, sulfato, ferro, manganês e dióxido de carbono como aceptor de elétrons para quebrar materiais poliméricos em compostos menores, tendo o CH_4 como principal gás liberado nesse processo (PRIYANKA; ARCHANA, 2011; KARAMANLIOGLU; PREZIOSI; ROBSON, 2017). Para a ação microbiana se estabelecer é necessária a presença de umidade. A capacidade padrão de absorção de umidade dos plásticos convencionais é relativamente pequena, os materiais biodegradáveis apresentam componentes capazes de provocar inchaço, enfraquecendo as ligações do polímero com o surgimento de espaços intermoleculares, facilitando o crescimento microbiano (KARAMANLIOGLU; PREZIOSI; ROBSON, 2017).

Os microrganismos são incapazes de transportar os polímeros diretamente através de suas membranas celulares externas para o interior das células onde a maioria dos processos bioquímicos ocorrem, uma vez que a molécula de polímero é grande e não solúvel em água. Para usar tais materiais como fonte de carbono e energia, os microrganismos desenvolveram uma estratégia na qual eles excretam enzimas extracelulares que despolimerizam os polímeros fora das células (GU, 2003). Quando os produtos finais são CO_2 , H_2O ou CH_4 a biodegradação é chamada de mineralização (GU, 2003). A mineralização é completa quando todos os materiais biodegradáveis ou biomassa são consumidos e todo o carbono nele é convertido em dióxido de carbono (STEVENS, 2002).

Alguns fatores microbiológicos também podem influenciar no processo de biodegradação de polímeros, tais como distribuição, abundância, diversidade, atividade e adaptação da microbiota do solo. A adaptação da microbiota depende da composição do material que serve como substrato para os microrganismos, cuja a

biodegradação dependerá do genótipo da população microbiana, bem como sua mudança induzida pelo material, com produção de enzimas extracelulares capazes de degradar ou mudar a estrutura da comunidade microbiana com o aumento de determinadas populações envolvidas no processo de biodegradação, além da possível atuação de um consórcio microbiano para atacar e clivar o material (PALMISANO; PETTIGREW, 1992). Além disso, algumas características do solo como umidade, porosidade, temperatura, pH, disponibilidade de O₂, presença de contaminantes, outros aceptores de elétrons e disponibilidade de nutrientes, podem influenciar positivamente ou negativamente na biodegradação (BONHMME et al., 2003; ORHAN, HRENOVIC, BUYUKGUNGOR, 2004).

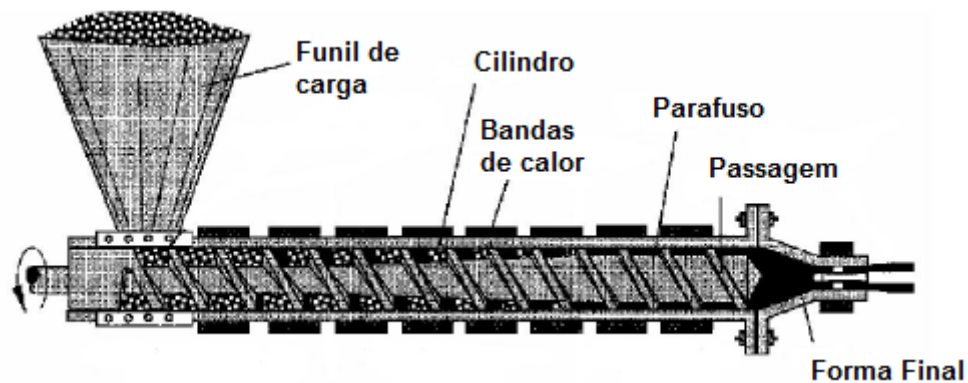
A biodegradabilidade de um polímero é essencialmente determinada pelas seguintes características físicas e químicas: 1. A disponibilidade de grupos funcionais que aumentam ou diminuem a hidrofobicidade (a degradação hidrófila é mais rápida que a hidrofóbica). 2. O peso molecular e a densidade do polímero (menor se degrada mais rápido que o maior). 3. A morfologia da TM (temperatura de fusão cristalina), quantidade de regiões cristalinas e amorfas (degradações amorfas são mais rápidas do que cristalinas). 4. Complexidade estrutural, como a linearidade ou a presença de ramificação no polímero. 5. Presença de ligações facilmente quebráveis, tais como ligações éster ou amida. 6. Composição molecular (mistura). 7. A natureza e a forma física do polímero (por exemplo, filmes, grânulos, pó ou fibras). 8. Dureza [Tg (temperatura de transição vítrea); quando a Tg é elevada o polímero é duro, geralmente quebradiço; quando a Tg é baixa o polímero é flexível], os polímeros mais flexíveis se degradam mais rápido do que os mais duros, resistentes (MOHAN; SRIVASTAVA, 2010).

3. PROCESSO DE EXTRUSÃO E INJEÇÃO

Na extrusão ocorre o transporte e a mistura de materiais que se fundem e plastificam-se até a obtenção da forma final. A máquina utilizada no processo de extrusão, na maioria dos casos, apresenta rosca interna de Arquimedes, que é capaz de fornecer quantidades de materiais fundidos de maneira contínua. A extrusora mono-rosca (Figura 6) é a mais empregada na obtenção do produto final, pela simplicidade e menor custo, podendo gerar cerca de 80% das energias térmicas e mecânicas necessárias para transformar os polímeros; os outros 20% são obtidos

por aquecedores externos (MANRICH, 2005). Existe também a extrusora dupla-rosca, que é mais utilizada para a flexibilidade de operação (CRIPPA, 2006).

Figura 6. Componentes de uma extrusora mono-rosca.



Fonte: adaptado de Fernandes (2012)

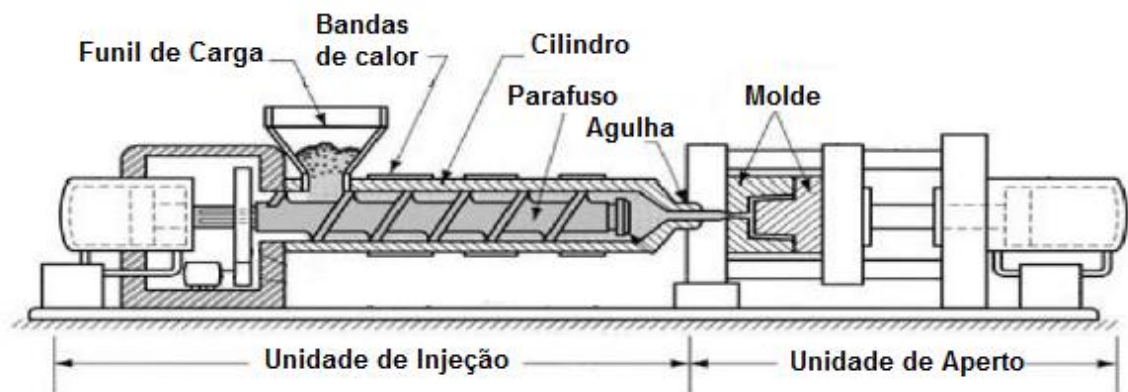
O funcionamento de uma extrusora ocorre pela adição do material sólido (pó, grânulo ou pellet) no funil de carga, que é transportado para o canal do parafuso ou rosca por gravidade. Nas primeiras voltas da rosca, o material sólido é transportado para um tambor aquecido por rotação, permitindo a sua fundição e plastificação; nesse material fundido, uma pressão é exercida para a passagem e a forma final. O sistema mais utilizado no processo de extrusão é o de três zonas: a zona 1 corresponde a entrada de material com função de transporte; a zona 2 apresenta funções de compressão, compactação e fusão do material; e a zona 3 corresponde a calibragem da temperatura de processamento desejada para homogeneização do material e obtenção da forma final. Além disso, com a relação entre comprimento e diâmetro da rosca (relação L/D), é possível obter sua potência (MERCIER, 1994; FERNANDES, 2012).

Para fins de modelagem, essas zonas funcionais estão conectadas sequencialmente. Os resultados obtidos dentro de uma zona são condições para entrada subsequente. A geometria do sistema, as propriedades do polímero e as condições de operação são consideradas, a fim de avaliar o desempenho do processo, tais como o produto, a temperatura de fusão, o consumo de energia ou grau de mistura (GASPAR-CUNHA, 2000). O processo de extrusão pode ser associado ao de injeção, promovendo uma moldagem do material em diferentes

formatos, ampliando a aplicação dos plásticos biodegradáveis como substitutos dos plásticos não biodegradáveis.

Injeção é um dos métodos de processamento de polímeros mais importantes para produzir peças de plástico. A principal preocupação na moldagem por injeção é produzir produtos com a qualidade desejada, que estão relacionadas com as características mecânicas, dimensionais, conformidade e aparência. Os principais fatores que afetam a qualidade do produto, são: propriedades de polímeros, projeto de moldes e condições de funcionamento da máquina (Figura 7) (OSSWALD; TURNING; GRAMANN, 2008; KAMAL et al., 2009).

Figura 7. Esquema de uma injetora.



Fonte: Adaptação de Cunha (2003)

O processo de moldagem por injeção é cíclico e pode ser caracterizado pelas etapas de: enchimento - o polímero fundido é injetado no molde fechado; embalagem - a pressão é mantida em valores elevados, de modo que o polímero fundido pode fluir para o interior do molde e evitar o encolhimento durante a solidificação; arrefecimento/plastificação - nesta fase, a peça moldada é arrefecida durante o tempo necessário para a parte suficientemente rígida ser ejetada. Para isto, o parafuso roda e o polímero sólido é aquecido no interior da unidade de injeção até o estado fundido (plastificação) para ser ejetado; na sequência, o próximo ciclo é iniciado (DOUGLAS, 1996; CUNHA, 2003; OSSWALD; TURNING; GRAMANN, 2008; KAMAL et al., 2009).

O desempenho da máquina está relacionado com as características do molde e

a distância a ser coberta. A otimização envolve a minimização do intervalo de abertura entre as metades dos moldes e do ajuste criterioso na velocidade que leva para a agulha encostar-se ao molde. A injeção do material inicia-se pelo preenchimento de 95% de volume do cilindro e avanço linear do parafuso, fundição, entrada no molde e fluxo do material. Após o enchimento do molde é necessário continuar a pressurizar a impressão, a fim de reduzir o efeito de contração por arrefecimento e impedir o refluxo da fusão, terminando com a ejeção por pressão exercida no material que é liberado pela porta presente na máquina. Os ciclos podem ocorrer de maneira manual (durante todo o processo de injeção são necessários comandos exercidos pelo manipulador), semiautomática (comando necessários para cada ciclo) e automática (a máquina, quando calibrada, realiza a operação inteiramente sozinha) (FERNANDES, 2012).

A injetora é projetada para a moldagem de materiais plásticos sintéticos, como o polipropileno e poliestireno, que apresentam algumas características, incluindo, fluidez, viscosidade e rigidez já conhecidas. Algumas variáveis podem afetar o processo de moldagem por injeção, incluindo, velocidade, temperatura, pressão, tempo e distância. Todas estas variáveis não são independentes, as alterações realizadas em uma podem afetar as outras (THYREGOD, 2001; KAMAL et al., 2009). O processo de injeção para materiais biodegradáveis tem sido empregado; entretanto, as características dos materiais podem afetar a repetibilidade e a moldagem. Geralmente, são utilizadas blendas de vários polímeros, constituídas por amido, fibras vegetais e polímeros sintéticos biodegradáveis que, muitas vezes, são materiais novos, com suas propriedades desconhecidas. Dessa forma, as variáveis do processo de moldagem por injeção precisam ser estudadas e calibradas para cada novo material. Com a calibração adequada, é possível a obtenção de um produto de maior qualidade que pode ser comercializado.

4. MATERIAIS BIODEGRADÁVEIS APLICADOS NA AGRICULTURA

A utilização de materiais biodegradáveis na agricultura tem contribuído para o meio ambiente de maneira sustentável. As substituições dos materiais plásticos não biodegradáveis por biodegradáveis podem ser realizadas na cobertura de solo (*mulch film*), em sacos e tubetes para mudas, em embalagens agrícolas, em cápsulas de liberação controlada de pesticidas, nutrientes e fertilizantes, além de

revestimentos de sementes e fitofarmacêuticos. As formulações com materiais biodegradáveis permitem a combinação de vários materiais úteis para melhorar o estado do solo (MITRUS; WOJTOWICZ; MOSCICKI, 2009).

As coberturas agrícolas são utilizadas para reduzir as plantas daninhas, manter o nível de umidade constante e aumentar a temperatura do solo, promovendo a melhora da taxa de crescimento da planta. Os filmes convencionais de cobertura de solo são de polietileno transparente ou preto. A temperatura na camada superficial do solo fica cerca de 5 °C mais elevada com a cobertura plástica em relação ao solo nu, propiciando maior absorção de água e nutrientes e, conseqüentemente, maior crescimento nos períodos de baixas temperaturas (ZHANG et al., 2015; LAMONT, 2017). Entretanto, filmes deixados no campo podem causar problemas no solo pela geração de resíduos plásticos, que vão influenciar na colheita e na próxima semeadura, além de apresentarem eliminação problemática e cara. Por isso, a utilização de materiais biodegradáveis é interessante para solucionar esses problemas; filmes biodegradáveis a base de amido com a adição de PVA, PLA, copolímeros de polietileno, ácido acrílico e cloreto de polivinilo têm sido desenvolvidos (MITRUS; WOJTOWICZ; MOSCICKI, 2009).

Os tubetes utilizados para mudas também são produzidos por materiais plásticos convencionais; são recipientes levemente cônicos, de seção circular ou quadrática, providos de frisos internos, equidistantes, com função de direcionar as raízes ao fundo do recipiente, evitando o desenvolvimento em forma espiral. Os tubetes podem ser colocados em suportes de isopor, plástico ou tela, denominados bandejas, dispostos pouco acima do nível do solo, formando os canteiros. Outra forma é a utilização de mesas com tampo de tela, onde tubetes são encaixados. As principais vantagens destes recipientes são: reaproveitamento da embalagem após o uso; menor diâmetro, ocupando menor área; menor peso; maior possibilidade de mecanização das operações de produção de mudas; menor incidência de pragas/doenças. As desvantagens são: custo elevado de implantação; lixiviação de nutrientes, tanto pela chuva, quanto por irrigação, sendo necessária reposição de nutrientes em maior escala (SCHORN; FORMENTO, 2003).

O desenvolvimento de tubetes plásticos biodegradáveis apresenta algumas vantagens em relação ao de plástico não biodegradável, incluindo redução do tempo com manuseio das plantas pelo plantio direto em solo, possibilidade de adicionar nutrientes na formulação diminuindo a necessidade de fertilizações recorrentes,

além de ser benéfico ao meio ambiente. Moretti, Lemes e Durán (2009) desenvolveram tubete biodegradável de PHBV e lignosulfonato que proporcionaram manutenção da umidade do solo. Urruth (2009) depositou uma patente de tubete biodegradável, que propõem o desenvolvimento de raízes pivotantes, bom escoamento de água excedente e a eliminação do enovelamento das raízes das mudas, problema observado nos tubetes convencionais. Tubetes biodegradáveis além dos polímeros sintéticos biodegradáveis e amido, podem ser desenvolvidos com matérias provenientes de resíduos agroindustriais para redução de custo. A adição de bactérias promotoras de crescimento vegetal ao tubete biodegradável pode agregar valor ao produto pela sua capacidade de reduzir a utilização de fertilizantes químicos.

5. BACTÉRIAS PROMOTORAS DE CRESCIMENTO VEGETAL (BPCV)

O solo contém ampla diversidade microbiana, incluindo bactérias, fungos actinomicetos, protozoários e algas. Dentre esses grupos, as bactérias estão em maior quantidade no solo devido a rápida multiplicação, cerca de 10^8 – 10^9 células por grama de solo (SCHOENBORN et al., 2004), podendo variar conforme as condições do solo, como temperatura, umidade, presença de sal, produtos químicos e plantas (GLICK et al., 1999). As bactérias não estão distribuídas de maneira uniforme no solo, algumas estão dispersas, outras ligadas às partículas de solo e um grande número pode interagir com as raízes das plantas. A alta concentração de bactérias ao redor das raízes se deve a presença de açúcares, aminoácidos, ácidos orgânicos e outras pequenas moléculas de exsudatos que são liberadas pelas raízes. Esses nutrientes são utilizados pelas bactérias rizosféricas para seu crescimento e metabolismo (LYNCH, 1990; BAIS et al., 2006; BADRI et al., 2009).

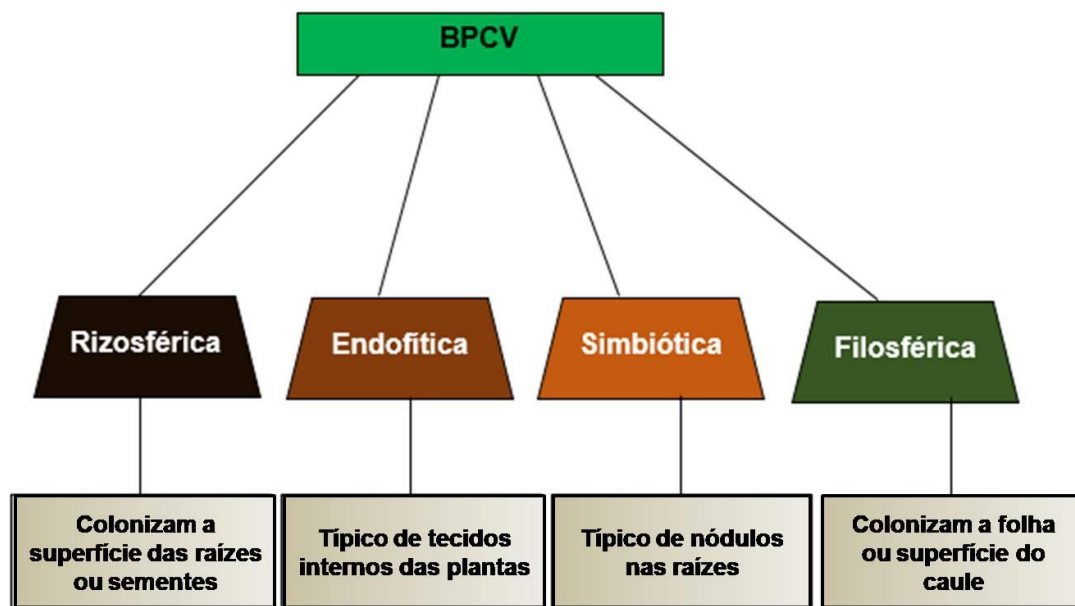
A interação de bactérias do solo com raízes de plantas pode ser classificada como benéfica, prejudicial ou neutra, podendo variar algumas vezes quando há mudança nas características do solo (LYNCH, 1990). As bactérias promotoras de crescimento vegetal (BPCV) (Figura 8) estão no grupo das benéficas e podem auxiliar no desenvolvimento da planta por ligação à superfície exterior das raízes ou folhas, ou podem habitar os tecidos internos da planta formando uma relação endofítica (HALLMANN et al., 1997; STURZ et al., 2000).

As bactérias consideradas de vida livre ou associativas pertencem aos gêneros

Azospirillum, *Enterobacter*, *Klebsiella* e *Pseudomonas*; as classificadas como endofíticas são *Gluconacetobacter*, *Herbaspirillum* e *Burkholderia*. O tipo de planta que as bactérias associativas e endofíticas colonizam, geralmente, são espécies de gramíneas (VIDEIRA; ARAÚJO; BALDANI, 2007; HAYAT et al., 2010).

Nem todas as cepas de um gênero ou espécie de bactérias consideradas promotoras de crescimento vegetal possuem a mesma constituição genética e capacidades metabólicas. Algumas linhagens de *Pseudomonas fluorescens*, por exemplo, podem promover ativamente o crescimento da planta, enquanto outras dessa espécie não apresentam efeito mensurável sobre as plantas. Isto indica que os chamados genes principais, que definem as capacidades metabólicas fundamentais de uma bactéria, não estão tipicamente envolvidos na promoção do crescimento de plantas (HUANG et al., 2013).

Figura 8. Formas de interação de BPCV com as plantas.



Fonte: Adaptação de Glick (2014)

As BPCV podem favorecer o crescimento e o desenvolvimento indireto ou direto da planta. O crescimento indireto é quando estas bactérias diminuem ou evitam os efeitos deletérios de um fitopatógeno, induzem resistência sistêmica aos vegetais, diminuem fatores de estresse, produzem antibióticos, entre outros. (GLICK, 2012). A promoção direta do crescimento das plantas por BPCV ocorre pela maior facilidade na aquisição de recursos de nutrientes do meio ambiente, incluindo

fixação de nitrogênio, ferro e fosfato, modulação específica pela alteração hormonal da planta como auxinas, etileno, citocininas e giberelinas, contribuindo para melhor absorção de água e nutrientes do solo (GLICK, 2012).

A utilização de BPCV no campo para melhorar a produção agrícola tem sido estudada. Entretanto, é necessário conhecimento sobre sua diversidade, os mecanismos de interação bactéria-planta, a capacidade de manter, modificar e manipular microrganismos benéficos sob condições de campo e as características do solo (OLIVARES, 2009). Antes de introduzir as BPCV em uma cultura deve-se considerar a função desejada com as características da planta ou do solo. Por exemplo, uma bactéria que promove o crescimento da planta apenas pela fixação biológica de nitrogênio não irá proporcionar benefício à planta se o solo estiver com grandes quantidades de fertilizantes nitrogenados (GLICK et al., 2007).

Dentre as BPCV mais estudadas estão às bactérias associativas do gênero *Azospirillum*, importantes para a inoculação em gramíneas, com aumento de rendimento pela fixação de nitrogênio, aumento no sistema radicular da planta e volume do solo colonizado (OKON; VANDERLEYDEN, 1997; HUNGRIA, 2011).

5.1. Gênero *Azospirillum*

As bactérias do gênero *Azospirillum* são encontradas naturalmente no solo; de vida livre, pertencem às bactérias diazotróficas, as quais possuem capacidade de fixação biológica do N₂ atmosférico. São α -proteobactérias, caracterizadas como gram-negativas, em forma de bastonete com dimensões de 0,8–1,0 μ m de diâmetro e 2,0–4,0 μ m de comprimento. Quando supridas com fonte de nitrogênio, são aeróbias típicas; porém, quando dependem da fixação de N₂, são microaerofílicas (DOBEREINER et al., 1995; REIS; PEDRAZA; TEIXEIRA, 2010).

As fontes de carbono mais utilizadas pelas bactérias do gênero *Azospirillum* são ácidos orgânicos como malato, citrato, α -cetoglutarato, piruvato e succinato (DOBEREINER et al., 1995). Outras fontes de carbono como a D-frutose e D-glicose foram observadas por Reis, Pedraza e Teixeira (2010). Com relação às fontes de nitrogênio, amônia, nitrato, nitrito, aminoácidos e N₂ atmosférico podem ser utilizadas (DOBEREINER et al., 1995).

Essas bactérias podem ser encontradas habitando a rizosfera, mas algumas estirpes possuem mecanismos específicos de interação com as raízes e podem

colonizar o interior das mesmas (STEENHOUDT; VANDERLEYDEN, 2000). Dentre as funções conhecidas das *Azospirillum* está a sua associação com diversas espécies de plantas para promover o crescimento vegetal, seja pela sua capacidade de fixar nitrogênio, ou produzir substâncias que auxiliam no crescimento das plantas (STEENHOUDT; VANDERLEYDEN, 2000; BASHAN; HOLGUIN; DE-BASHAN, 2004; REIS; PEDRAZA; TEIXEIRA, 2010). Tais substâncias podem ser hormônios de crescimento como auxinas, giberelinas e citocininas, os quais demonstraram ser estimulantes na formação de pêlos radiculares e aparecimento de raízes secundárias (HARTMAN; ZIMMER, 1994). Por essas características é que várias estirpes do gênero *Azospirillum* têm sido empregadas em inoculantes agrícolas.

5.2. Inoculantes

Os inoculantes aplicados no sistema de produção agrícola diminuem a utilização de insumos químicos como fertilizantes e pesticidas e contribuem para uma agricultura sustentável (HAYAT et al., 2010; BASHAN et al., 2014; GLICK, 2014; EL-AWADY; HASSAN; AL-SODANY, 2015). As principais vantagens dos inoculantes em relação aos agroquímicos são: aumento no crescimento das plantas e na produtividade da cultura pela disponibilidade de nutrientes e fertilidade do solo; proteção contra patógenos do solo; auxílio no crescimento da planta sob condições de estresse; melhoria na qualidade do solo; redução da poluição ambiental causada pela aplicação de fertilizantes e produtos químicos utilizados na agricultura; eficácia em pequenas quantidades; maior economia ao agricultor, uma vez que os fertilizantes nitrogenados podem chegar a participar com até 40% dos custos de produção (MC LAUGHLIN et al., 2000; HUNGRIA; VARGAS, 2000). O Brasil é o quarto maior consumidor mundial de fertilizantes nitrogenados e ainda é dependente da disponibilidade e dos preços do mercado internacional. Até o mês de maio de 2018 foi preciso importar cerca de 73% da necessidade desses fertilizantes para suprir a demanda agrícola brasileira (ANDA, 2018).

Algumas BPCV são utilizadas comercialmente como coadjuvantes na prática agrícola: *Agrobacterium radiobacter*, *Azospirillum brasilense*, *Azospirillum lipoferum*, *Azotobacter chroococcum*, *Bacillus fimus*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus mucilaginous*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus* spp., *Bacillus subtilis*, *Bacillus subtilis* var. *amyloliquefaciens*, *Burkholderia cepacia*, *Delftia acidovorans*,

Paenobacillus macerans, *Pantoea agglomerans*, *Pseudomonas aureofaciens*, *Pseudomonas chlororaphis*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas solanacearum*, *Pseudomonas* spp., *Pseudomonas syringae*, *Serratia entomophila*, *Streptomyces griseoviridis*, *Streptomyces* spp., *Streptomyces lydicus* e vários *Rhizobia* spp. (LUCY; REED; GLICK, 2004; BANERJEE; YESMIN; VESSEY, 2006; BASHAN et al., 2014; JALPOT; TEWARI; NAYYAR, 2015; EL-AWADY; HASSAN; AL-SODANY, 2015).

A inoculação de BPCV na agricultura mundial, apesar de estudos realizados, representam uma pequena fração comparado à utilização de fertilizantes químicos. Para maior comercialização desses microrganismos é necessário garantir a eficácia da estirpe bacteriana e a tecnologia de aplicação adequada para o sucesso em culturas agrícolas (BASHAN et al., 2014). Para a seleção da melhor estirpe bacteriana adequada como inoculante são necessários: identificação, condições de produção (tempo de cultivo, temperatura, nutrientes específicos) e caracterização do microrganismo, assim como ensaios em casa de vegetação e em condições de campo (HUNGRIA et al., 2005; HERRMANN; LESUEUR, 2013). O principal obstáculo para o sucesso da aplicação de inoculantes bacterianos é a heterogeneidade do solo, que possui sua microflora bacteriana nativa. As bactérias inoculadas em formulações inadequadas ficam sem condições de sobreviver e desprotegidas para competir com a microflora melhor adaptada e resistir a predação da microfauna do solo. Por isso, grande parte de estirpes bacterianas com alto potencial biotecnológico que são disponibilizadas no meio científico não são comercializadas (DEAKER et al., 2011; BASHAN et al., 2014; NEHRA; CHOUDHARY, 2015).

O desenvolvimento de uma formulação inoculante eficaz, capaz de manter elevada densidade de células viáveis por longos períodos de tempo no material, é indispensável para que a estirpe bacteriana permaneça estável durante a produção, a distribuição, o armazenamento e o transporte. Deve proporcionar um microambiente adequado, combinado com a proteção física para evitar o declínio rápido de bactérias até o momento de sua utilização (BASHAN, 1998; STEPHENS; RASK, 2000; BASHAN et al., 2014). A formulação inoculante deve ser de fácil manuseio para a aplicação do produto, considerando as limitações dos produtores. O custo-benefício também deve ser avaliado para não prejudicar financeiramente os agricultores (DEAKER et al., 2011; BASHAN et al., 2014; NEHRA; CHOUDHARY,

2015). No Brasil foram comercializadas cerca de 25 milhões de doses de inoculantes, sendo a maioria destinada à cultura da soja (MAPA, 2012). Inoculantes a base de BPCV para trigo e milho foram desenvolvidos em 2010 pela EMBRAPA Soja (PR), em parceria com a Universidade Federal do Paraná (UFPR) e a iniciativa privada. A aplicação desse inoculante proporcionou aumento nos rendimentos de 25–30% para o milho e de 13–18% para o trigo (HUNGRIA, 2011).

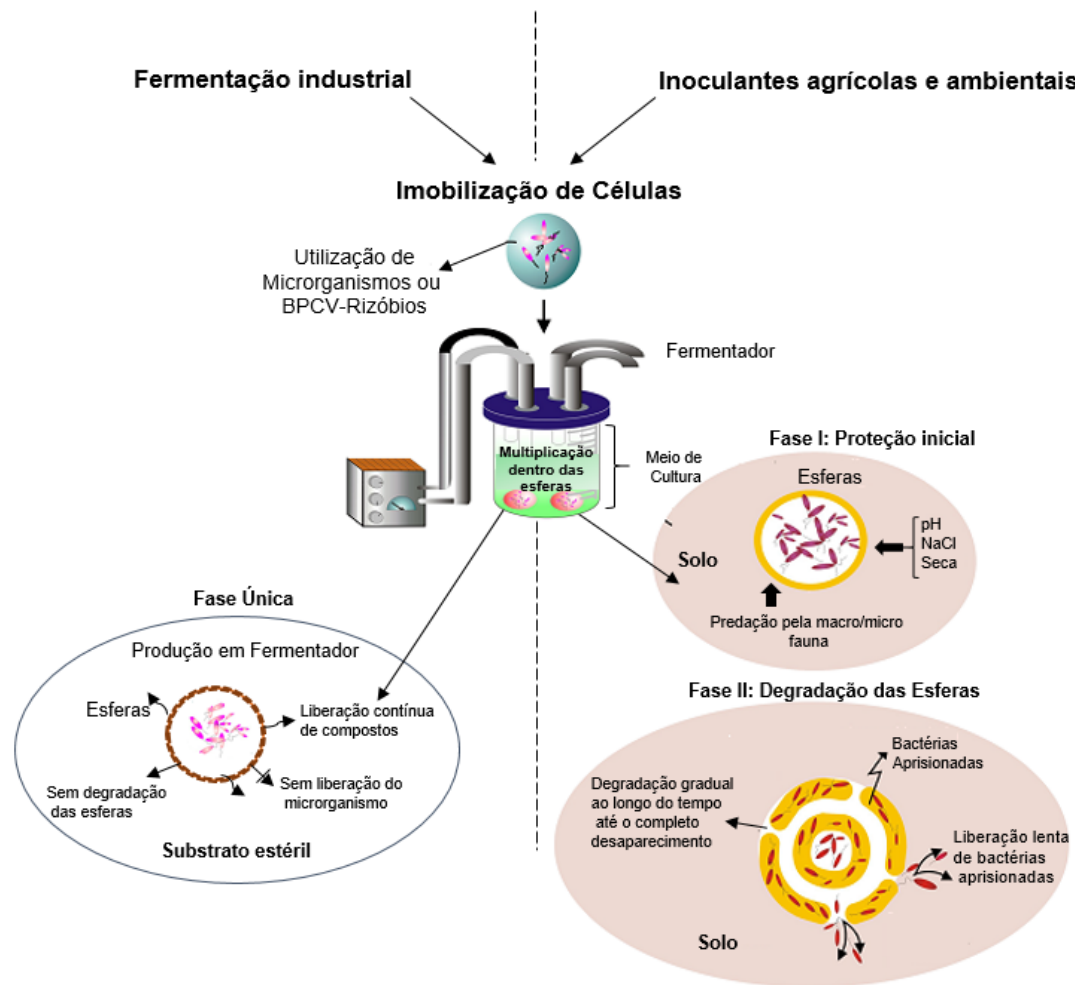
Portanto, uma formulação que reúna todas as características desejáveis já descritas e que sejam adequadas para o uso sob condições de campo é necessária (BASHAN, 1998; BASHAN et al., 2014; NEHRA; CHOUDHARY, 2015). A formulação sólida contendo células imobilizadas pode ser considerada uma alternativa eficaz para a melhora do fornecimento de nutrientes, proteção de dessecação e garantia de uma liberação de células gradual e prolongada no solo (KIM et al., 2012; SCHOEBITZ; LÓPEZ; ROLDÁN, 2013).

5.3. Imobilização de Células

A indústria de fermentação foi pioneira na imobilização de células, a qual foi desenvolvida para eliminar procedimentos longos e caros de separação e purificação de enzimas com possibilidade de reutilização (STOLARZEWICZ et al., 2011). Os produtos bacterianos desejados são extraídos a partir do biorreator, enquanto a fermentação continua (PRASAD; KADOKAWA, 2009). O principal objetivo dessas formulações industriais é manter as células imobilizadas na forma ativa, em concentrações elevadas, por longo período. Qualquer liberação prematura dos microrganismos é indesejável (Figura 9).

Imobilizações bacterianas para formulações de inoculantes agrícolas e ambientais apresentam pontos distintos comparados à indústria de fermentação: o sistema de imobilização precisa fornecer abrigo temporário a estirpe isolada do solo e proteger dos competidores microbianos que ficam hostis a qualquer mudança da composição biológica do solo. Além disso, para colonizar as raízes das plantas, a liberação desejada das células é gradual e ocorre quando o suporte é degradado pelos microrganismos nativos do solo, liberando assim as BPCV para o desenvolvimento de plantas (BASHAN et al., 2014).

Figura 9. Comparação entre o encapsulamento de bactérias para utilização na fermentação industrial e como inoculante para uso agrícola ou ambiental.



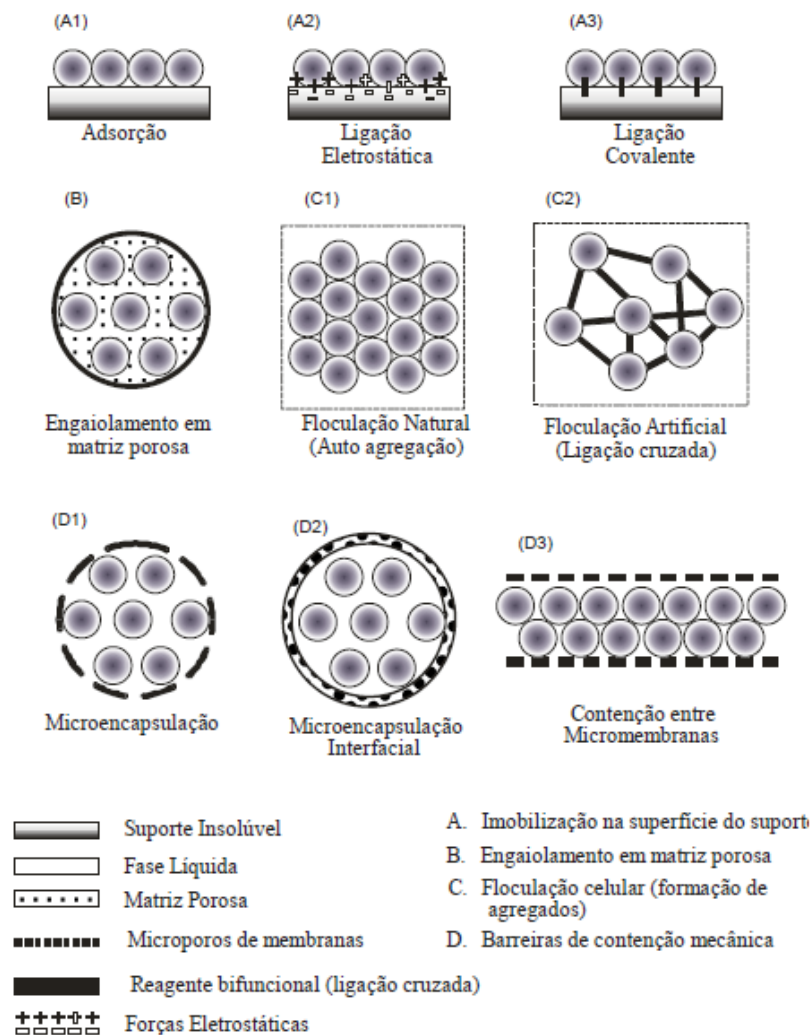
Fonte: Adaptação de Bashan et al. (2014).

Em comparação com bactérias de vida livre, as células imobilizadas apresentam maior vida útil, são mais eficazes e mais tolerantes em condições adversas (BAYAT; HASSANSHAHIAN; CAPPELLO, 2015). Entretanto, para o desenvolvimento do sistema biológico que atenda as expectativas, as escolhas do método de imobilização e do tipo de suporte devem ser realizadas considerando as características do material biológico e as condições de utilização do sistema. Tendo em vista a variabilidade desses fatores, não existe um método geral de imobilização nem um suporte universal adequado para qualquer processo (VITOLO, 1988; PIKINGTON et al., 1998).

Os métodos de imobilização de células (Figura 10) podem ser classificados em: naturais, que incluem formação de biofilmes e adesão ou adsorção em suporte

sólido; artificiais, que incluem encapsulação ou aprisionamento em matriz porosa e utilização de agentes ligantes; e agregação por floculação, que pode ser natural ou artificial (PIKINGTON et al., 1998; COVIZZI et al., 2007).

Figura 10- Métodos para imobilização de células.



Fonte: Adaptação de Covizzi et al. (2007).

O suporte para formulação inoculante deve ser atóxico, não poluente, com alta capacidade de contensão celular, estabilidade mecânica, biológica e química, longa vida de prateleira, baixo custo, simples método de preparo e degradável no solo por microrganismos, com liberação de células lenta e gradual nas quantidades necessárias para o desenvolvimento da planta. Além disso, o suporte deve

apresentar capacidade de contensão de água suficiente para a sobrevivência e o movimento das bactérias para as plantas (COVARRUBIAS et al., 2012).

A turfa é o suporte mais utilizado em formulações inoculantes sólidas de BPCV, vendida em grandes volumes no mundo. É composta por 90% de material orgânico proveniente de diversos estágios da decomposição anaeróbica vegetal, sendo um material não renovável (FERNANDES JUNIOR et al., 2009). Algumas formulações inoculantes testadas como suportes não estéreis, incluindo serragem (ARORA et al., 2008), resíduos de bananeira (RIVERA-CRUZ et al., 2008), bagaço de cana-de-açúcar e areia apresentaram significativo sucesso. A principal limitação para a utilização desses suportes orgânicos é a disponibilidade de matéria-prima para comercialização em larga escala, principalmente pela variabilidade do lote (BASHAN et al., 2014).

Materiais poliméricos como alginato, agar, λ - e κ carragenina, pectina, quitosana, goma de feijão e polímeros patenteados têm sido utilizados e avaliados em formulações inoculantes agrícolas e ambientais. O alginato é o polímero mais estudado para formulações inoculantes, devido seu desempenho bem estabelecido nas áreas industrial e farmacêutica (TONNESEN; KARLSEN, 2002; PRASAD; KADOKAWA, 2009). As principais vantagens desses polímeros em relação à turfa são vida útil mais longa, facilidade de fabricação, maior proteção e sobrevivência adequada após a inoculação com densidade de células suficiente, possibilidade de alteração com nutrientes e melhor desempenho. Entretanto, o elevado custo é o grande inconveniente de inoculantes poliméricos em comparação a turfa (BASAN 1998; JOHN et al 2011). Por isso, ainda não há inoculantes comerciais poliméricos disponíveis (BASHAN et al., 2014).

REFERÊNCIAS

- ANDA- **Associação Nacional para a difusão de adubos**. Disponível em: <<http://anda.org.br/index.php?mpg=03.00.00>> Acesso em: 15 de junho de 2018.
- AKCELRUD, L. **Fundamentos da ciência dos polímeros**. Barueri: Manole, 2007.
- ARAÚJO, J. R.; WALDMAN, W. R.; De PAOLI, M. A. Thermal properties of high density polyethylene composites with natural fibres: coupling agent effect. **Polymer Degradation and Stability**, v. 93, n. 10, p. 1770-1775, 2008.
- ARORA, N. K.; KHARE, E.; NARAIAN, R.; MAHESHWAR, D. K. Sawdust as a superior carrier for production of multipurpose bioinoculant using plant growth promoting rhizobial and pseudomonad strains and their impact on productivity of *Trifolium repense*. **Current Science**, v. 95, p. 90–94, 2008.
- ASTM-D6866-16, <https://www.astm.org/Standards/D6866.htm>, 2016.
- ASTM-D883, https://compass.astm.org/EDIT/html_annot.cgi?D883, 2012.
- AVEROUS, L.; BOQUILLON, N. Biocomposites based on plasticized starch: thermal and mechanical behaviors. **Carbohydrate Polymers**, v. 56, p. 111–122, 2004.
- BADRI, D.V.; QUINTANA, N.; EL-KASSIS, E. G.; KIM, H. K.; CHOI, Y. H.; SUGIYAMA, A.; VERPOOTE, R.; MARTINOIA, E.; MANTER, D. K.; VIVANCO, J. M. An ABC transporter mutation alters root exudation of phytochemicals that provoke an overhaul of natural soil microbiota. **Plant Physiology**, v. 151, p. 2006–2017, 2009.
- BAIS, H. P.; WEIR, T. L.; PERRY, L. G.; GILROY, S.; VIVANCO, J. M. The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms. **Annual Review of Plant Biology**, v. 57, p. 233–266, 2006.
- BANERJEE, M. R.; YESMIN, L.; VESSEY, J. K. Plant-growth promoting rhizobacteria as biofertilizers and biopesticides. In: Handbook of Microbial Biofertilizers, RAI, M. K. Ed., p.137–181, **Food Products Press**, Binghamton, NY, USA, 2006.
- BASHAN, Y.; DE-BASHAN, L. E.; PRABHU, S. R.; HERNANDEZ, J. P. Advances in plant growth-promoting bacterial inoculant technology: formulations and practical perspectives (1998–2013). **Plant Soil**, v. 378, p. 1–33, 2014.
- BASHAN, Y.; HOLGUIN, G.; DE-BASHAN, L. E. *Azospirillum*-plant relationships: physiological, molecular , agricultural , and environmental advances (1997–2003). **Canadian Journal of Microbiology**, v. 50, p. 521-577, 2004.
- BASHAN, Y. Inoculants of plant growth-promoting bacteria for use in agriculture. **Biotechnology Advances**, v. 16, p. 729–770, 1998.
- BAYAT, Z.; HASSANSHAHIAN, M.; CAPPELLO, S. Immobilization of microbes for bioremediation of crude oil polluted environments: a mini review. **The Open Microbiology Journal**, v. 9, p. 48–54, 2015.

BONHOMME, S.; CUER, A.; DELORT, A. M.; LEMAIRE, J.; SANCELME, M. SCOTT, G. Environmental biodegradation of polyethylene. **Polymer Degradation and Stability**, v. 81, p. 441–452, 2003.

COSTA Jr. S. E.; MANSUR, H. S. Preparação e caracterização de blendas de quitosana/poli(álcool vinílico) reticuladas quimicamente com glutaraldeído para aplicação em engenharia de tecido. **Química Nova**, v. 31, n. 6, 1460–1466, 2008.

COVARRUBIAS, S. A.; DE-BASHAN, L. E.; MORENO, M.; BASHAN, Y. Alginate beads provide a beneficial physical barrier against native microorganisms in wastewater treated with immobilized bacteria and microalgae. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 93, p. 2669–2680, 2012.

COVIZZI, L. G.; GIESE, E. C.; GOMES, E.; DEKKER, R. F. H.; SILVA, R. Imobilização de células microbianas e suas aplicações biotecnológicas. **Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas**, Londrina, v. 28, n. 2, p. 143–160, jul./dez., 2007.

CRIPPA, A. **Estudo do desempenho de filmes multicamadas em embalagens termoformadas**. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em engenharia e Ciência de Materiais), Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006.

CUNHA, A. Manual do Projetista para Moldes de Injeção de Plástico, **Centimfe**, 2003.

DEAKER, R.; KECSKÉS, M. L.; ROSE, M. T.; AMPRAYN, K.; GANISAN, K.; TRAN, T. K. C.; VU, T. N.; PHAN, T. C.; HIEN, N. T.; KENNEDY, I. R. Practical methods for the quality control of inoculant biofertilisers. **ACIAR Monograph Series**, Canberra, n.147, p. 101, 2011.

DOBBELARE, S.; VANDERLEYDERN, J.; OKON, Y. Plant-growth promoting effects of diazotrophs in the rhizosphere. **Critical Reviews in Plant Sciences**, 22:107-149, 2003.

DÖBEREINER, J.; BALDANI, V. L. D.; BALDANI, J. I. **Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não-leguminosas**. Brasília, DF: EMBRAPA-SPI, 1995. 60p.

DOUGLAS, M. Plastic Injection Molding: Manufacturing Process Fundamentals. **Society of Manufacturing Engineers**, 1996.

EL-AWADY, M. A. M.; HASSAN, M. M.; AL-SODANY, Y. M. Isolation and characterization of salt tolerance endophytic and rhizospheric plant growth-promoting bacteria (PGPB) associated with the halophyte plant (*Sesuvium verrucosum*) grown in KSA. **International Journal of Applied Sciences Biotechnology**, v. 3, n. 3, p. 552–560, 2015.

FENNEMA, O. R. **Química de los Alimentos**. 2 ed. Zaragoza: Acribia, 2000.

FERNANDES JUNIOR, P. I.; ROHR, T.G.; OLIVEIRA, P.J.; XAVIER, G.R.; RUMJANEK, N.G. Polymers as carrier for rhizobial inoculant formulations. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. v. 44, n.9, p. 1184-1190, 2009.

FERNANDES, C. B. P. **Optimization of the injection moulding process: from polymer plasticating to final part properties**. PhD thesis, University of Minho, 2012.

GANOTOPOULOU, E. **Biodegradable Material: a research and design handbook; enhancing the use of biodegradable materials on building's envelopes in the Netherlands**. Tu Delft – Faculty of Architecture of Netherlands, 2014, 260 p.

GASPAR-CUNHA. **Modelling and Optimisation of Single Screw Extrusion**. PhD thesis, University of Minho, 2000.

GLICK, B. R. Bacteria with ACC deaminase can promote plant growth and help to feed the world. **Microbiological Research**, v. 169, p. 30–39, 2014.

GLICK, B. R. Plant growth-promoting bacteria: mechanisms and applications. **Scientifica**, p. 1–15, 2012.

GLICK, B. R.; CHENG, Z.; CZARNY, J.; DUAN, J. Promotion of plant growth by ACC deaminase-containing soil bacteria. **European Journal of Plant Pathology**, v. 119, p. 329–39, 2007.

GLICK, B. R.; PATTEN, C. L.; HOLGUIN, G.; PENROSE, D. M. **Biochemical and Genetic Mechanisms Used by Plant Growth Promoting Bacteria**, Imperial College Press, London, UK, 1999.

GOODSHIP, V. **Polyvinyl alcohol: materials, processing and applications**. Shrewsbury: Smithers Rapra Press, 2009.

GU, F.; GUO, J.; ZHANG, W.; SUMMERS, P. A.; HALL, P. From waste plastics to industrial raw materials: A life cycle assessment of mechanical plastic recycling practice based on a real-world case study. **Science of the Total Environment**, v. 601–602, p. 1192–1207, 2017.

GU, J. D. Microbiological deterioration and degradation of synthetic polymeric materials: recent research advances. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 52, 69–91, 2003.

GUPTA, B.; REVAGADE, N.; HILBORN, J. Poly(lactic acid) fiber: an overview. **Progress in Polymer Science**, v. 32, p. 455-482, 2007.

HALLMANN, J.; QUADT-HALLMANN, A.; MAHAFFEE, A. W.; KLOEPPER, J. W. Endophytic bacteria in agricultural crops. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 43, p. 895–914, 1997.

HARTMAN, A.; BALDANI, J. I. The genus *Azospirillum*. In: DWORKIN, M.; FLAKNOW, S.; ROSEMBERG, E.; SCHLEIFER, K-H.; STACKERBRANDT, E.; (Ed.). **The Prokaryotes**. 3. ed. New York : Springer, v. 5.; p. 115-140, 1994.

HAYAT, R.; ALI, S.; AMARA, U.; KHALID, R.; AHMED, I. Soil beneficial bacteria and their role in plant growth promotion: a review. **Annals Microbiology**, v. 60, p. 579–598, 2010.

HEIJNEN, C. E.; VAN VEEN, J. A. A determination of protective microhabitats for bacteria introduced into soil. **FEMS Microbiology and Ecology** 1991;85:73–80.

HERNÁNDEZ-URIBE, J.P. **Caracterización termica y reologica de almidones de maíz aislados de diferentes híbridos**. 2003. (Tesis de Licenciatura) – Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Cuernavaca.

HERRMANN, L.; LESUEUR, D. Challenges of formulation and quality of biofertilizers for successful inoculation. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 97, n. 20, p. 8859-73, out. 2013.

HUANG, C. H.; HSIANG, T.; TREVORS, J.T. Comparative bacterial genomics: defining the minimal core genome. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v 103, p. 385–98, 2013.

HUERTA, E.; MENDOZA VEGA, J.; QUEJ, V. K.; CHI, J. de los A.; SANCHEZ DEL CID, L.; QUIJANO, C.; ESCALONA-SEGURA, G.; GERTSEN, H.; SALÁNKI, T.; VAN DER PLOEG, M.; KOELMANS, A. A.; GEISSEN, V. Bioaccumulation of microplastics in the terrestrial food chain: an example from home gardens in SE Mexico. **19th EGU General Assembly, EGU2017, proceedings from the conference held 23-28 April, 2017 in Vienna, Austria., p.15847**, v. 19, n. September 2016, p. 15847, 2017.

HUNGRIA, M. **Inoculação com *Azospirillum brasilense*: inovação em rendimento a baixo custo**. Londrina: Embrapa Soja, 2011.36p. (Documentos/Embrapa Soja, ISSN 1516-781X; n.325)

HUNGRIA, M.; LOUREIRO, F. M.; MENDES, I. C.; CAMPO, R. J.; GRAHAM, P. H. Inoculant preparation, production and application. In: WERNER, D.; NEWTON, W. E (Ed.) **Nitrogen Fixation Agriculture, Forestry, Ecology and the Environment**. Dordrecht, Amsterdam: Springer, 2005. 347p. p. 224-253.

HUNGRIA, M.; VARGAS, M. A. T. Environmental factors affecting N₂ fixation in grain legumes in the tropics, with emphasis on Brazil. **Field Crops Research**, v. 65, p. 151-164, 2000.

ISHIZAKI, M. H.; VISCONTE, L. L. Y.; FURTADO, C. R. G.; LEITE, M. C. A. M.; LEBLANC, J. L. Caracterização mecânica e morfológica de compósitos de polipropileno e fibras de coco verde: influência do teor de fibra e das condições de mistura. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 16, n. 3, p. 182–186, 2006.

IUPAC. Compendium of polymer terminology and nomenclature. **IUPAC recommendations**, 2008.

JALPOT, A.; RUPINDER, T.; NAYYAR, H. Effect of organic compost, tricalcium phosphate and PGPB in enhancing growth and glycoside constituents in four high yielding varieties of stevia rebaudiana. **International Joournal of Science , Engineering e Computer Technology**, v. 5, n. 1, 2015.

JAYANTH, D.; KUMAR, P. S.; NAYAK, G. C.; KUMAR, J. S.; PAL, S. K.; RAJASEKAR, R. A Review on Biodegradable Polymeric Materials Striving Towards the Attainment of Green Environment. **Journal of Polymers and the Environment**, v. 0, n. 0, p. 1–28, 2017.

JOHN, R. P.; TYAGI, R. D.; BRAR, S. K.; SURAMPALLI, R. Y.; PREVOST, D. Bio-encapsulation of microbial cells for targeted agricultural delivery. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 31, p. 211–226, 2011.

KAMAL, M.; ISAYEV, A.; LIU, S. Injection Molding Technology and Fundamentals, **Hanser Publications**, 2009.

KARAMANLIOGLU, M.; PREZIOSI, R.; ROBSON, G. D. Abiotic and biotic environmental degradation of the bioplastic polymer poly(lactic acid): A review. **Polymer Degradation and Stability**, v. 137, p. 122–130, 2017.

KASIRAJAN, S.; NGOUAJIO M. Polyethylene and biodegradable mulches for agricultural applications: a review. **Agronomy for Sustainable Development**, v, 32, p. 501–529, 2012.

KIM, I. Y.; PUSEY, P. L.; ZHAO, Y.; KORBAN, S. S.; CHOI, H.; KIM, K. K. Controlled release of Pantoea agglomerans E325 for biocontrol of are blight disease of apple. **Journal of Controlled Release**, v. 161, p.109–15, 2012.

LAMONT, W. J. Plastic mulches for the production of vegetable crops. **A Guide to the Manufacture, Performance, and Potential of Plastics in Agriculture**, p. 45–60, 2017

LIM, L.T.; AURAS, R.; RUBINO, M. Processing technologies for poly(lactic acid), **Progress in Polymer Science**, v. 33, p. 820–852, 2008.

LIU, H.; XIE, F.; YU, L.; CHEN, L.; LI, L. Thermal processing of starch-based polymers. **Progress in Polymer Science**, v. 34, p. 1348–1368, 2009.

LUCAS, N.; BIENAIME, C.; BELLOY, C.; QUENEUDEC, M.; SILVESTRE, F.; NAVA-SAUCEDO, J. E. Polymer biodegradation: Mechanisms and estimation techniques - A review. **Chemosphere**, v. 73, p. 429–442, 2008.

LUCY, M.; REED, E.; GLICK, B. R. Applications of free-living plant growth-promoting rhizobacteria. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 86, n. 1, p. 1–25, 2004.

LYNCH, J. M. **The rhizosphere**. Chichester, UK: Wiley-Interscience; 1990.

MAHESHWARI, D. K.; DUBEY, R. C.; AGARWAL, M.; DHEEMAN, S.; AERON, A.; BAJPAI, V. K. Carrier based formulations of biocoenotic consortia of disease suppressive *Pseudomonas aeruginosa* KRP1 and *Bacillus licheniformis* KRB1. **Ecological Engineering**, v. 81, p. 272–277, 2015.

MALI, S.; GROSSMANN, M. V. E.; YAMASHITA, F. Filmes de amido: produção, propriedades e potencial de utilização. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 31, p. 137–156, 2010.

MANRICH, S. **Processamento de termoplásticos: rosca única, extrusão e matrizes, injeção e moldes**. São Paulo: Artliber, 2005.

MAPA - **MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO, Instrução Normativa Nº 13, de 24 de março de 2011**. Diário Oficial da União da República Federativa do Brasil.

MAPA - **MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO**. 2012. Disponível em <http://www.agricultura.gov.br/comunicacao/noticias/2012/08/xvi-relare-apresenta-estudos-para-melhorar-producao>. Acesso em: 7 de janeiro de 2016.

MC LAUGHLIN, N. B.; HIBA, A.; WALL, G. J.; KING, D. J. Comparison of energy inputs for inorganic fertilizer and manure based corn production. **Canadian Agricultural Engineering**, v. 2, n.1, p. 9-17, 2000.

MEEKS, D.; HOTTLE, T.; BILEC, M. M.; LANDIS, A. E. Compostable biopolymer use in the real world: Stakeholder interviews to better understand the motivations and realities of use and disposal in the US. **Resources, Conservation and Recycling**, v. 105(Part A), p. 134–142, 2015.

MEHTA, R.; KUMAR, V.; BHUNIA, H.; UPADHYAY, S. N. Synthesis of poly(lactic acid): a review. **Journal of Macromolecular Science, Part C**, v. 45, p. 325–349, 2005.

MÉNDEZ-GÓMEZ, M.; CASTRO-MERCADO, E.; ALEXANDRE, G.; GARCÍA-PINEDA, E. Oxidative and antioxidative responses in the wheat-*Azospirillum brasilense* interaction. **Protoplasma**, 2015.

MERCIER, C. Coment aborder La cussion-extrusion. In: COLLONA, P.; VALLE, G.D. **La cuisson – extrusion**. Paris: Technique & Documentation, 1994. p. 3 – 11.

MITRUS, M.; WOJTOWICZ, A.; MOSCICKI, L. Biodegradable polymers and their practical utility. **Thermoplastic Starch**, p. 1–33, 2009.

MOHAN, S. K.; SRIVASTAVA, T. Microbial deterioration and degradation of polymeric materials. **Journal of Biochemical Technology**, v. 2, p. 210–215, 2010.

MORETTI, A. M.; LEMES A. P.; DURÁN, N. Produção e caracterização de tubetes biodegradáveis de PHBV/lignosulfonato. In: XVII Congresso Interno de Iniciação Científica da Unicamp. **Resumos**, 2009.

NAMPOOTHIRI, K. M.; NAIR, N. R.; JOHN, R. P. An overview of the recent developments in polylactide (PLA) research. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 8493–8501, 2010.

NEHRA, V.; CHOUDHARY, M. A review on plant growth promoting rhizobacteria acting as bioinoculants and their biological approach towards the production of sustainable agriculture. **Journal of Applied and Natural Science**, v. 7, n. 1, p. 540–556, 2015.

OKON, Y.; VANDERLEYDEN, J. Root-associated *Azospirillum* species can stimulate plants. **Applied and Environmental Microbiology**, New York, v. 63, n. 7, p. 366–370, 1997.

ORHAN, Y.; HRENOVIC, J.; BUYUKGUNGOR, H. Biodegradation of Plastic Compost Bags Under Controlled Soil Conditions. **Acta Chimica Slovenica**, v. 51, p. 579–588, 2004.

OSSWALD, T.; TURNG, L.; GRAMANN, P. **Injection Molding of Plastics – Handbooks**. Carl Hanser Verlag, 2008.

PALMISANO A.C; PETTIGREW C.A. Biodegradability of plastics. **BioScience**, v. 42, n. 9, p. 680–685, 1992.

PIKINGTON, P. H.; MARGARITIS, A.; MENSOUR, N. A.; RUSSEL, I. Fundamentals of immobilized yeast cells for continuous beer fermentation: a review. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 104, p. 19–31, 1998.

PLASTICS EUROPE. **Plastics - the facts 2017. An analysis of european plastics production, demand and waste data**. Disponível em: <<http://www.plasticseurope.org/cust/documentrequest.aspx?DocID=65435>> Acesso em: 05/05/2018.

PRASAD, K.; KADOKAWA, J. I. Alginate-based blends and nano/ microbeads. **Microbiol Monogr**, 13:175–210, 2009.

PRASAD, K. K.; MOHAN, S. V.; BHASKAR, Y. V.; RAMANAIAH, S. V.; BABU, V. L.; PATI, B. R.; SARMA, P. N. Laccase production using *Pleurotus ostreatus* 1804 immobilized on PUF cubes in batch and packed bed reactors: influence of culture conditions. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 43, n. 3, p. 301–307, 2005.

PRIYANKA, N.; ARCHANA, T. 2011. Biodegradability of Polythene and Plastic By The Help of Microorganism: A Way for Brighter Future. **J Environ Anal Toxicol** 1.

REDDY, M. M.; VIVEKANANDHAN, S.; MISRA, M.; BHATIA, S. K.; MOHANTY, A. K. Biobased plastics and bionanocomposites: Current status and future opportunities. **Progress in Polymer Science**, v. 38, p. 1653–1689, 2013.

REIS, V. M.; PEDRAZA, R. O.; TEIXEIRA, K. R. D. S. Diversidade e relação filogenética de espécies do gênero. **Seropédica: Embrapa Agrobiologia**, p. 20, 2010.

RIVERA-CRUZ, M. C.; TRUJILLO NARCÍA, A.; CÓRDOVA BALLONA, G.; KOHLER, J.; CARAVACA, F.; ROLDÁN, A. Poultry manure and banana waste are effective biofertilizer carriers for promoting plant growth and soil sustainability in banana crops. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 40, p. 3092–3095, 2008.

ROCHMAN, C. M.; HOH, E.; KUROBE, T.; TEH, S. J. Ingested plastic transfers hazardous chemicals to fish and induces hepatic stress. **Scientific Reports**, v. 3, p. 1–7, 2013.

RUTIAGA, M.O.; GALAN, L. J.; MORALES, L. H.; GORDON, S. H.; IMAM, S. H.; ORTS, W. J.; GLENN, G. M.; NINO, K. A. Mechanical property and biodegradability of cast films prepared from blends of oppositely charged biopolymers. **Journal of Polymers and the Environment**, v.13, p.185-191, 2005.

SCHOEBITZ, M.; LÓPEZ, M. D.; ROLDÁN, A. Bioencapsulation of microbial inoculants for better soil–plant fertilization. A review. **Agronomy for Sustainable Development**, v. 33, p. 756–765, 2013.

SCHOENBORN, L.; YATES, P. S.; GRINTON, B. E.; HUGENHOLTZ, P.; JANSSEN, P. H. Liquid serial dilution is inferior to solid media for isolation of cultures representative of the phylum-level diversity of soil bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, n. 7, p. 4363–4366, 2004.

SCHORN, L. A.; FORMENTO, S. **Silvicultura II: Produção de Mudas Florestais**. Universidade Regional de Blumenau, 2003.

SHIRAI, M. A.; GROSSMANN, M. V. E.; YAMASHITA, F.; GARCIA, P. S.; MÜLLER, C. M. O. Development of biodegradable flexible films of starch and poly (lactic acid) plasticized with adipate or citrate esters. **Carbohydrate Polymers**, v.92, n.1, p. 19–22, 2013.

SILVA, R.; HARAGUCHI, S. K.; MUNIZ, E. C.; RUBIRA, A. F. Aplicações de fibras lignocelulósicas na química de polímeros e em compósitos. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 661- 671, 2009.

STEENHOUDT, O.; VANDERLEYDEN, J. *Azospirillum*, a free-living nitrogen-fixing bacterium closely associated with grasses: genetic, biochemical and ecological aspects. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 24, n. 4, p. 487-506, out. 2000.

STEPHENS, J. H. G.; RASK, H. M. Inoculant production and formulation. **Field Crops Research**, v. 65, p. 249–258, 2000.

STEVENS, E. S. How green are green plastics? **BioCycle**, v. 43, n. 12, p. 42–45, 2002.

STOLARZEWICZ, I.; BIALECKA-FLORJAŃCZYK, E.; MAJEWSKA, E.; KRZYCZKOWSKA, J. Immobilization of yeast on polymeric supports. *Chemical and Biochemical Engineering*, v. 25, p. 135–144, 2011.

STURZ, A. V.; CHRISTIE, B. R.; NOWAK, J. Bacterial endophytes: potential role in developing sustainable systems of crop production. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 19, p.1–30, 2000.

TANG, X.; ALAVI, S. Recent advances in starch, polyvinyl alcohol based polymer blends, nanocomposites and their biodegradability. **Carbohydrate Polymers**, v. 85, n. 1, p. 7–16, 2011.

TANG, X.; ALAVI, S. Structure and physical properties of starch/poly vinyl alcohol/laponite RD nanocomposite films. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, n. 8, p. 1954–1962, 2012.

THAKORE, I. M.; DESAI, S.; SARAWADE, B. D.; Devi, S. Studies on biodegradability, morphology and thermomechanical properties of LDPE-modified starch blends. **European Polymer Journal**, v. 37, p. 151–160, 2001.

THYREGOD, P. **Modelling and Monitoring in Injection Molding**. PhD thesis, Technical University of Denmark, 2001.

TONNESEN, H. H.; KARLSEN, J. Alginate in drug delivery systems. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 28, p. 621–630, 2002.

URRUTH, A. R. O. Processo de produção de tubete biodegradável poroso de fragmentação mecânica determinada pelos vegetais, para plantio direto de mudas no solo. **Patente nº PI 0801432-9 A2**, 2009.

VERT, M.; DOI, Y.; HELLWICH, K. H.; HESS, M.; HODGE, P.; KUBISA, P.; RINAUDO M.; SCHUE´F. Terminology for biorelated polymers and applications (IUPAC Recommendations **2012**). **Pure and Applied Chemistry**, p. 377, 2012.

VIDEIRA, S.S.; ARAÚJO, J.K.S.; BALDANI, V.L.D. **Metodologia para Isolamento e Posicionamento Taxonômico de Bactérias Diazotróficas Oriundas de Plantas Não-leguminosas**. Rio de Janeiro: Embrapa Agrobiologia, 2007. 74p. (Embrapa Agrobiologia. Documentos, 234).

VITOLO, M. Imobilização de células e enzimas. **Biotecnologia**, n. 11, p. 2, janeiro de 1988.

VINK, E. T. H.; DAVIES, S. Life cycle inventory and impact assessment data for 2014 Ingeo™ Polylactide Production. **Industrial Biotechnology**, v. 11, p. 167–180, 2015.

VINK, E. T. H.; RÁBAGO, K. R.; GLASSNER, D. A.; GRUBER, P. R. Applications of life cycle assessment to NatureWorks™ polylactide (PLA) production. **Polymer Degradation and Stability**, v. 80, p. 403–419

WATERS, C. N.; ZALASIEWICZ, J.; SUMMERHAYES, C.; BARNOSKY, A. D.; GAŁUSZKA, C. P. A.; CEARRETA, A.; EDGEWORTH, M.; ELLIS, E. C.; ELLIS, M.; JEANDEL, C.; LEINFELDER, R.; MCNEILL, J. R.; RICHTER, D. B.; STEFFEN, W.; SYVITSKI, J.; VIDAS, D.; WILLIAMS, M. W. M.; ZHISHENG, A.; GRINEVALD, J.; ODADA, E.; ORESKES, N.; WOLFE, A. P. The Anthropocene is functionally and stratigraphically distinct from the Holocene. **Science**, v. 351, p. 2622–1–10, 2016.

WU, Z.; GUO, L.; QIN, S.; LI, C. Encapsulation of *R. planticola* Rs-2 from alginate–starch–bentonite and its controlled release and swelling behavior under simulated soil conditions. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 39, p. 317–327, 2012.

YANG, S.; MADBOULY, S. A.; SCHRADER, J. A.; SRINIVASAN, G.; GREWELL, D.; MCCABE, K. G.; KESSLER, M. R.; GRAVES, W. R. Characterization and biodegradation behavior of bio-based poly(lactic acid) and soy protein blends for sustainable horticultural applications. **Green Chemistry**, v. 17, n. 1, p. 380–393, 2015.

YANG, B.; WYMAN, C. E.; Yang, B.; **Bioresource technology**, v. 99, p. 5756–5762, 2008.

ZHANG, G. S.; HU, X. B.; ZHANG, X. X.; LI, J. Effects of plastic mulch and crop rotation on soil physical properties in rain-fed vegetable production in the mid-Yunnan Plateau, China. **Soil and Tillage Research**, v. 145, 111–117, 2015.

ZHENG, Y.; YANFUL, E.; BASSI, A. A review of plastic waste biodegradation. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 25, n. 4, p. 243–250, 2005.

CAPÍTULO 2. BIODEGRADABLE PLASTIC DESIGNED TO IMPROVE THE SOIL QUALITY AND MICROBIOLOGICAL ACTIVITY

Abstract

Biodegradable plastic composites were produced from mixtures of polyvinyl alcohol (PVA) and starch, which were mixed with different natural fillers [sugarcane bagasse (SB), oat hulls (OH) or silkworm exuvia (SE)] and nutrients to stimulate the biodegrading microbiota. The physicochemical and biodegradability characteristics of the produced materials were studied, in addition to their influence over the microbiota involved in biodegradation. The SB-composite showed reduced solubility in water, a lower water absorption capacity and a slower mineralization rate when buried in a commercial substrate for seedlings production, as compared with those of the OH- and SE-composites. Scanning electron micrographs demonstrated the increased colonization of materials by the biodegrading microbiota over time, which were predominated by filamentous fungi in OH- and SE-composites, while the SB-composite was predominantly colonized by bacteria. A Fourier transform-infrared spectroscopy (FT-IR) analysis of the biodegraded materials highlighted the chemical differences in the protein and carbohydrate content between formulations, corroborating the activity of different microbial groups on their mineralization. Regardless of its composition, the mineralization rate of the materials was positively correlated with the microbial biomass carbon (C_{mic}) and basal respiration (RB) of the substrate. However, the correlation between the mineralization rate and the metabolic quotient of the substrate (qCO_2) was negative for the OH- and SE-composites, while the SB-composite showed no significant correlation among these variables. The differences observed in the formulations indicated that biodegradable plastics can be designed for a given goal by selecting the most appropriate formulation.

Keywords: Blend materials. Soil microbiota. Plant fibers. Biotechnology.

Sustainability.

1. INTRODUCTION

The extensive use of plastic materials has caused massive negative impacts on the environment, landscapes, human welfare and human health, including the bioaccumulation potential of its gross and biodegradation products (ROCHMAN et al., 2013; HUERTA et al., 2017). Waters et al. (2016) designated the increased generation of plastic wastes as one of the factors responsible for a new geological age, the Anthropocene, that began in the mid-twentieth century as the effects of human interventions on the planet were intensified.

The environmental consequences of the Anthropocene involve the presence of petroleum-derived plastics, which have been found as sediments in increasing amounts, leading to alterations in biogeochemical cycles and the modification of biotic communities in soils (plants, microbes, and insects) with a loss of quality in cultivable land (WATERS et al., 2016; HORTON et al., 2017; LIU et al., 2018).

The substitution of recalcitrant plastic materials with biodegradable plastics produced from natural or synthetic polymers as the primary materials has emerged as an alternative to reduce and even remediate part of the deleterious Anthropocene impact on the environment (JAYANTH et al., 2017; GU et al., 2017). Furthermore, several biodegradable polymers can be blended with other materials to produce completely different materials with characteristics that cannot be predicted based on the characteristics observed in their underlying individual compounds (YANG et al., 2015; JESSOP et al., 2015; LEE et al., 2016). The formulation of biodegradable plastics in blends also allows designs based on these materials that aim to produce a specific environmental response along with their mineralization (before, during or after their disposal in the surrounding soil), opening up new possibilities for the uses of these materials for soil conditioning and the bioremediation of impacted lands. Thus, in addition to the substitution of recalcitrant plastics with biodegradable plastics, the blend composition of materials can be set up to promote increases and/or the regeneration of soil microbiota activity/diversity and consequently improve the soil quality for agriculture or other uses.

Several authors have described the production of biodegradable materials using melt-extrusion and injection-mold processes, including reports on their mineralization kinetics (RYCHTER et al., 2006; JAKUBOWICZ; YARAHMADI; ARTHURSON, 2011; VERCELHEZE et al., 2013; SCHRIJVERS et al., 2014). However, the impacts of these materials on the soil microbiota have not always been addressed. The general trend in degradable polymer mineralization shows an increase in soil respiration with a concomitant increase in the soil microbial populations as the biodegradation process occurs. Different polymeric materials have shown different impacts on a given microbial community, which suggests the possibility of actively shaping this microbiota by formulating the biodegradable materials with blends enriched in nutrients that favor a given microbial group or others with broad metabolization by the soil microbes in accordance with the intended effect. In this same sense, biodegradable injection-mold materials for agricultural use can be designed to

provide at least part of the plant nutritional requirements according to the evolution of material mineralization, functioning as slow-release fertilizers (MAJEED et al., 2015).

In this study, two biodegradable polymers, polyvinyl-alcohol (PVA) and cassava starch, were mixed with fillers (sugarcane bagasse, oat hulls or silkworm exuvia waste) and nutrients (yeast extract and sucrose) to develop new biodegradable composite materials designed to increase the soil microbial activity when its mineralization starts. Extrusion and injection molding were employed to obtain the composites, which were comparatively characterized according to their microstructure, morphology, and biodegradability. The resulting materials were shown to increase the soil microbial activity and improve its biological quality, serving as the basis for the development of innovative products that can be designed to assist in the reforestation of degraded lands or the bioremediation of contaminated soils, such as slow-release fertilizers and plant containers.

2. Material and Methods

2.1. Materials, Extrusion and Injection-Molding Conditions

The formulations described aimed to evaluate how different agricultural wastes used as fillers would influence the physicochemical characteristics, biodegradation rate and impact the microbial communities involved on the mineralization of materials produced by the injection-mold process. Table 1 presents the general composition of formulations used for the extrusion and injection-molding experiments, whose specifications are following: polyvinyl alcohol (PVA) with a hydrolysis degree of 98.4% and average viscosity of 28–32 cP (Selvol™ 325 – Sekisui Chemical, Japan); glycerol acquired from Dinâmica Química (Diadema, Brazil); cassava starch (amylose 20.8 ± 0.6 wt%; protein 0.28 ± 0.1 wt%; lipids 0.11 ± 0.6 wt%; ash 0.22 ± 0.6 wt%, db) obtained from Indemil (Paranavaí, Brazil); rock phosphate (basalt powder) in the form of Alvorada phosphate, acquired from Socal S.A. (Registro, Brazil); yeast extract from Kasvi (Liofilchen, Italy); crystal sugar and powdered skim milk acquired from local market (Londrina, Brazil). Variations in the formulations were obtained using different fillers, which were sieved to millimeter sizes: sugarcane bagasse (residue from sugar and alcohol plant - Usiban,

Bandeirantes, Brazil); oat hulls (SL-Alimentos, Mauá da Serra, Brazil), or silkworm exuvia waste (*Bombyx mori*) acquired from Fiação Seda Bratac (Londrina, Brazil).

Table 1. General composition of formulations mixtures used to produce composites by extrusion followed by injection-molding.

Materials	(g/100 g solids)
Filler ¹	20
Polyvinyl alcohol (PVA)	25
Glycerol	21.6
Cassava starch	20
Rock phosphate	7.5
Yeast extract	3.7
Crystal sugar	1.5
Powdered skim milk	0.7

¹Different fillers were used to obtain different formulations: sugarcane bagasse (SB), Oat hulls (OH) or Silkworm exuvia (SE).

The ratio of materials used in the present study was achieved after modification of the composition of a biodegradable foam produced by melt extrusion and successfully used to deliver beneficial bacteria (as inoculant) (MARCELINO et al., 2016). A total of three composite formulations were produced, and they are known throughout this manuscript as SB, OH or SE, the sugarcane bagasse, oat hulls and silkworm exuvia waste used as fillers, respectively. The components of these formulations were manually mixed to homogeneity then were dried at 40 °C for 16 h following their extrusion on a single screw extruder (BGM, EL-25, Brazil) to produce pellets. The extruder had a screw diameter (D) of 25 mm, a screw length (L) of 750 mm (L/D ratio of 30), five heating zones and a matrix consisting of six 2-mm holes, and the barrel temperature profile was set at 90/175/175/165 °C with a screw speed of 35 rpm. The pellets were injected into an AX16 III lab-scale injection-molding machine (AX-Plásticos, Brazil) with a temperature profile of 150/175/175 °C

from the feeder to the injection nozzle, and the material was molded into a dog bone shape (test specimen type 4), according to ASTM D638 (2003).

2.2. Solubility in Water (SW) and Water Absorption Capacity (WAC)

The samples (3 cm x 1 cm) from the three formulations were dried (40 °C for 16 h), weighed, immersed in 50 mL of distilled water and placed in an orbital shaker at 200 rpm and 25 °C for 24 h. After this period, the samples were recovered and dried at 105 °C until reaching a constant weight. The SW (%) was calculated according to the following equation and expressed as the mean of five replicates:

$$SW (\%) = \frac{(W_i - W_f)}{W_i} \times 100$$

(1)

where W_i is the initial weight expressed as dry matter and W_f is the weight of the undissolved dry formulations (GONTARD; GUILBERT; CUQ, 1993).

The water absorption capacity (WAC) was determined according to the standard ABNT NBR NM ISO 535 (1999), applied to 3 cm² samples. In brief, the samples were soaked in 50 mL of distilled water for 0, 5, 10, 15, 20, 30, 60, 120, 180 and 240 min. At each time point, the samples were collected and reweighed after the removal of excess water with the aid of paper tissue. The amount of adsorbed water was expressed in g of water g⁻¹ of sample material for each sampling time as the mean of five replicates for each formulation.

2.3. Biodegradation Trial

The biodegradation of the injection-mold materials was performed under controlled conditions (greenhouse), in a bed of commercial substrate (Biomix, Cotia, Brazil) used to produce forest seedlings. Its composition includes: peat, ground and composted pine bark, vermiculite, macro and micronutrients from mineral and organic sources (pH 7.3; H + Al, 2.03 cmol_c/dm³; Al, 0.03 cmol_c/dm³; K, 1.14 cmol_c/dm³; Ca, 9.46 cmol_c/dm³; Mg, 3.41 cmol_c/dm³; P, 57.90 mg/kg; base saturation, 87.21%; and organic matter content, 7.11%). The experimental unit was set up in plastic pots filled

with the commercial substrate, and each one contained a nondegradable mesh bag (40 x 80 mm) with two samples (3 cm²) of known weight for each formulation, buried at a depth of 3 cm from the surface and kept at the maximum water holding capacity by watering every two days. A set of plastic pots was prepared under the same conditions except that no samples were added, and they were used in the biochemical determinations presented below. The samples were collected every 7 days for up to 35 days, resulting in five sampling times with five replications each in a completely randomized design. For each sampling, the samples were cleaned with tissue paper, dried at 60 ± 2 °C for 4 h and held for 24 h under the same environmental conditions used to record the initial weights, followed by the removal of the remaining residues with a soft brush and the reweighing of the samples, which were used in determinations of the soluble sugars (total sugar and reducing sugar), protein content, pH, SEM and FTIR analysis.

The weight loss was expressed as a percentage (Wloss%) according to equation 2 as follows:

$$W_{loss\%} = \frac{(W_0 - W_1)}{W_0} \times 100$$

(2)

where W₀ represents the initial sample weight (before the biodegradation starts) and W₁ represents the biodegraded sample weight at each sampling time.

2.4. Scanning Electron Microscopy (SEM)

Samples of up to 1 cm² were fixed in 3% glutaraldehyde in PBS solution, pH 7.2 to 24 h, washed in the same buffer without glutaraldehyde and dehydrated in a series of increasing ethanol concentrations and subjected to critical point drying. The samples were fixed on the SEM holders, coated with gold and observed using a FEI Quanta 200 Field Emission Scanning Electron Microscope (FE-SEM) at 10 kV.

2.5. Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR)

The FTIR spectra of the samples were analyzed using a Shimadzu 8300 FTIR spectrometer (Shimadzu, Japan). The analyses were performed after the samples

were dried and mixed with potassium bromide and compressed into tablets. The spectra were collected over a range of frequencies from 4000 cm^{-1} to 500 cm^{-1} , with a spectral resolution of 1 cm^{-1} .

2.6. Soil Microbial Biomass Carbon (MBC), Basal Respiration (R_B) and Metabolic Quotient ($q\text{CO}_2$)

The substrates used in the biodegradation trial were also subjected to determinations of the R_B , MBC and $q\text{CO}_2$ as follows. For each sampling time in the biodegradation test, the substrates were individually sieved through a 2 mm mesh to remove the larger organic debris, and 50 g subsamples were incubated in vessels for 6 days at 28 ± 2 °C and 60% humidity in the dark. After this period, the incubation vessels were sealed along with a flask containing 10 mL of 1.0 M NaOH to trap the released CO_2 and then incubated further for 24 h. The R_B was determined by quantifying the carbon dioxide (CO_2) trapped in the NaOH solution according to Silva et al. (2007a) by adding BaCl_2 following titration with 0.5 M HCl. The MBC was determined by the fumigation extraction method of Vance et al. (1985) and modified by Silva et al. (2007b) in the same samples used for R_B analysis. To this, 25 g of incubated substrate as described above was fumigated for 24 h at 25 ± 3 °C with 1 mL of ethanol-free chloroform added directly to the substrate. Following fumigation, the samples were treated with 80 mL of freshly prepared 0.5 M K_2SO_4 by orbital shaking at 220 rpm and 25 °C for 30 min. Non-fumigated samples were extracted as controls. The extracts were filtered through qualitative filter paper (80 g/m^2 ; 3 micron porosity) and the organic carbon content was measured after dichromate oxidation (VANCE et al., 1985). The microbial biomass carbon was calculated as follows:

$$\text{MBC} = \frac{[\text{organic carbon (fum)} - \text{organic carbon (non.fum)}]}{0.33} \times 100$$

(3)

The metabolic quotient was calculated as the ratio of basal respiration to microbial biomass carbon (ANDERSON; DOMSCH, 1993).

2.7. Soluble Total and Reducing Sugars, Soluble Proteins and pH

The modification in the composition of the materials was assessed by determining the total soluble and reducing sugars, soluble proteins and pH in the samples collected during the biodegradation trial. An analysis of nonbiodegraded materials was performed as the control. For each sampling time, the collected samples were treated with distilled water in a 1:10 (w/v) proportion by orbital shaking at 100 rpm and 25 °C for 24 h. The resulting solution was filtered through qualitative filter paper (80 g/m²; 3 micron porosity) and immediately used to determine the pH, the total soluble sugar content according to the phenol-sulfuric method Dubois et al. (1956), the soluble reducing sugar according to the DNS method Miller (1959) and the soluble proteins according to Bradford (1976). The soluble total and reducing sugars were determined with the aid of a standard curve drawn with known concentrations of glucose, while the soluble protein content was determined with a standard curve drawn using known concentrations of bovine serum albumin (BSA). The results are expressed as the means of five replicates, as the amount of sugars and protein per mL of the diluted solution per sample weight (g).

2.8. Statistical Analysis

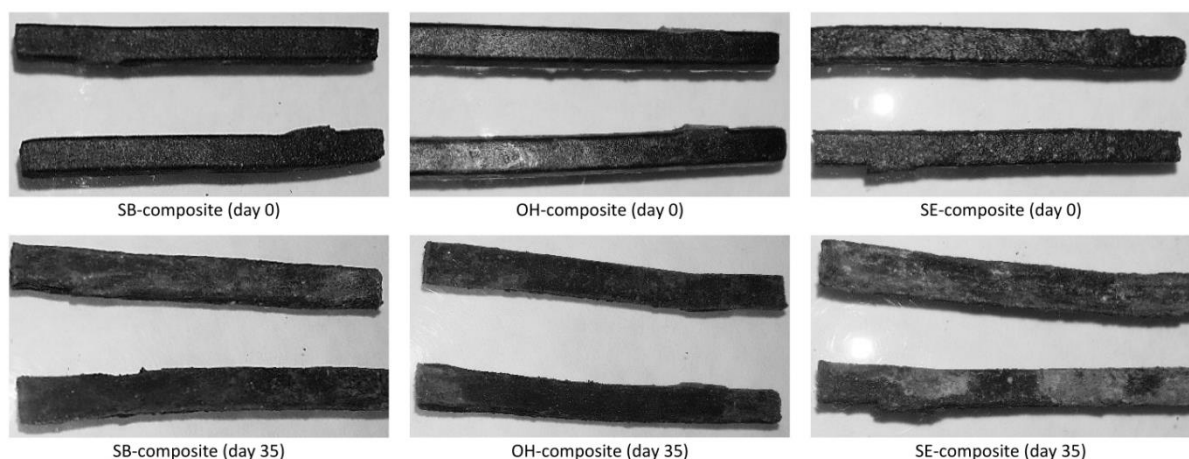
All the data were subjected to analyses of variance (ANOVA) and Tukey's mean comparison test ($p < 0.05$) using Statistica software, version 10.0 (Statsoft, OK, USA). Correlation analyses were conducted to quantify the effect of material composition parameters (total sugar, reducing sugars, protein content and pH) on microbiological parameters (mineralization rate, microbial biomass carbon, basal respiration and metabolic quotient) along biodegradation time. Pearson's correlation analyses and their respective significant P-values were performed with the aid of R software (<http://www.rproject.org>).

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1. Production of Composite Materials

The composite materials described in this study were produced with 25% PVA, a highly polar synthetic polymer that was largely adopted to produce biodegradable plastic matrices because of its compatibility with other natural polymers, such as starch, although of limited applications because its higher cost (TANG et al., 2011). The materials reported here were produced from mixtures of PVA with natural biopolymers such as starch, sugarcane bagasse, oat hulls, chitin-rich silkworm exuvia, proteins and polysaccharides from skim powder milk and yeast extract, leading to good processability and suitability for the melt extrusion and further injection-mold treatments in addition to biodegradability (Figure 1).

Figure 1. Images of injection-mold samples produced with different biopolymeric fillers, before and after being subjected to biodegradation in a commercial substrate for seedlings production for 35 days. Samples produced with sugarcane bagasse (SB-composites), oat hulls (OH-composites), and silkworm exuvia waste (SE-composites).



Lignocellulosic fibers based on agroindustry wastes have interesting qualities for use as fillers in biodegradable composites because of their low costs and lack of competition with the food production chain (CARDENAS-TORO et al., 2014). In addition, these residues can be used in their natural form (seed hulls, straw or

bagasse) or after minimal processing to improve the mechanical properties and biodegradability of the composites (VERCELHEZE et al., 2013; OLIVEIRA et al., 2015). Silkworm exuvia represent another renewable resource that is obtained as waste from the sericulture industry (CHEN; ZHAO; DAI, 2011). This residue is rich in chitin (approximately 40%), and it is a linear polysaccharide consisting of β -(1,4)-linked-2-acetamido-2-deoxy-D-glucose used in cellulose substitutes to reinforce composite materials due to its biocompatibility with other compounds and its absence of toxicity (KADOKAWA et al., 2011; LOPEZ et al., 2014). The extrusion of chitin-rich materials can be challenging due to the tendency of this material to form aggregates resulting from its high potential for hydrogen bonding, making the continuous feeding of the extruder difficult (HERRERA et al., 2017). In our study, the SE-composite showed no processing problems, indicating its compatibility with the other compounds present in the formulation.

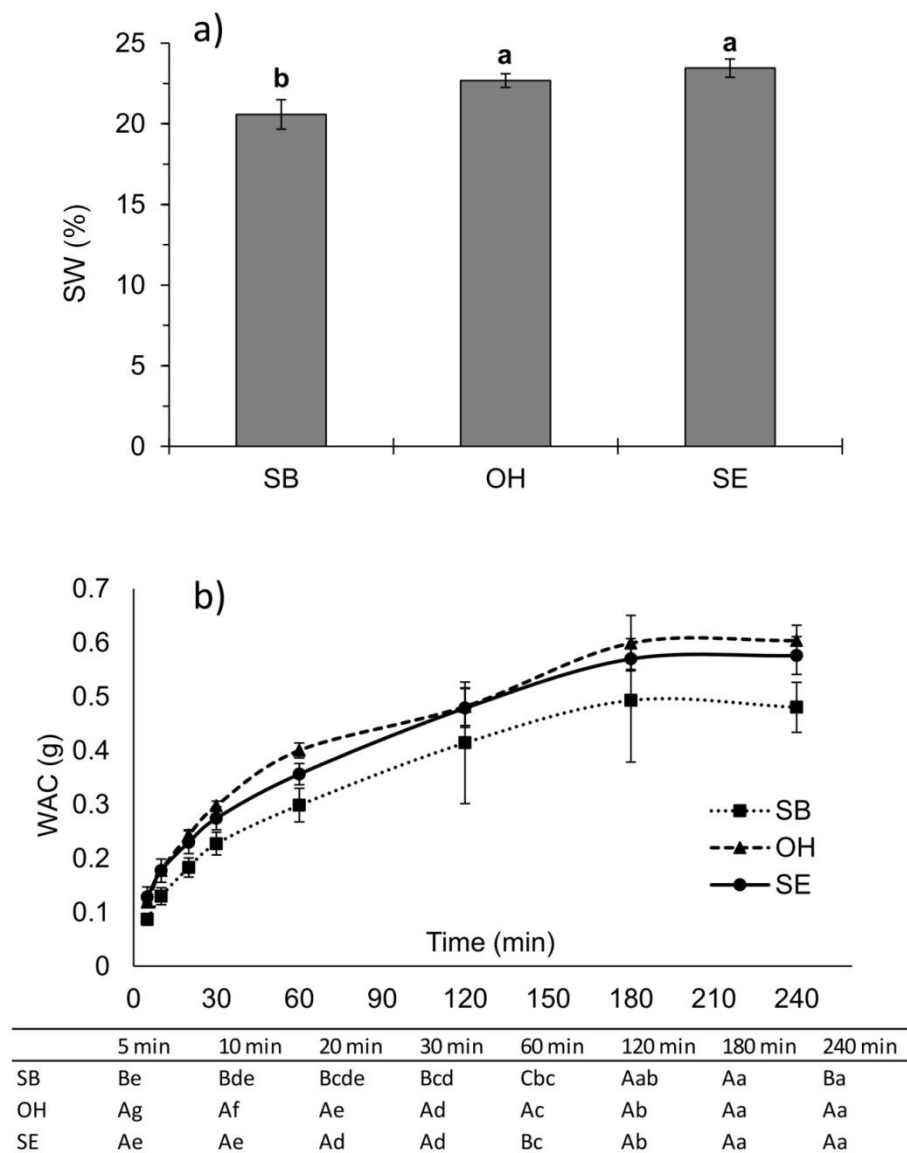
The choice in use unusual compounds (crystal sugar, powdered skim milk, yeast extract, and rock phosphate) were based on the results of a previous study that demonstrated the beneficial effects of these compounds in maintaining the viability of beneficial bacteria immobilized in biodegradable foams (MARCELINO et al., 2016). Here, the introduction of these compounds was hypothesized to function as nutritional support for the soil microbiota, which could in turn sustain higher microbial populations and enhance the mineralization rate of the produced materials once they were mixed into soil. In fact, although this hypothesis requires further experimental support, it is worth noting that these compounds contributed to the processing flow (extrusion and injection-molding) of developed materials, regardless of the type of natural filler in use (SB, OH or SE), and they positively affected the microbial community involved in the biodegradation of materials as discussed below.

3.2. Solubility in Water (SW) and Water Absorption Capacity (WAC)

Because the materials described in this study were designed to present an active role in the soil microbiota as their mineralization took place, there was a need to characterize their natural decomposition as well as their biodegradation. Figure 2 presents the solubility in water (SW) of the composite materials, which is indicative of the stability of the soluble constituents in the injection-molded samples as well as the water absorption capacity (WAC), which is related to the ability of the samples to

retain structural integrity (OLIVEIRA et al., 2015; ZANELA et al., 2015). The values observed for SW were significantly lower for the SB-composite (up to 20.63%) than those of the OH- and SE-composites (up to 22.66% and 23.45%, respectively), which did not differ from one another (Fig. 2a). In addition, all the samples presented structural integrity at the end of the SW determination, with no apparent separation between composite constituents, indicating that the polymeric matrix remained structured and only a small portion of the low mass molecules were solubilized, in accordance with previous results (WITTAYA, 2009).

Figure 2. Effect of different fillers (sugarcane bagasse - SB, oat hulls - OH, and silkworm exuvia waste- SE) on (a) the solubility in water (SW) and (b) water absorption capacity (WAC) of samples prepared with PVA, cassava starch, crystal sugar, powdered skim milk, yeast extract, and rock phosphate.



Different capital letters indicate statistically significant differences between composite materials while different small letters indicate statistically significant differences between sampling times, according to Tukey's test ($p < 0.05$).

The results of the WAC (Fig. 2b) highlight the differences between the composite materials in relation to their interactions with water, as influenced by the filler used in the polymeric matrix. The SB-composite absorbed significantly less water than did the OH- and SE-composites until 60 min of immersion in water, while the last two formulations did not differ from one another. In fact, the SB-composite was found to be water-saturated earlier (120 min) than were the other formulations (180 min). The maximum WAC value was observed for the SB-composite, which reached up to 49.3% after 180 min, when the values observed for the OH- and SE-

composites increased until the end of the experiment, reaching up to 60.4% and 57.6% of the absorbed water, respectively.

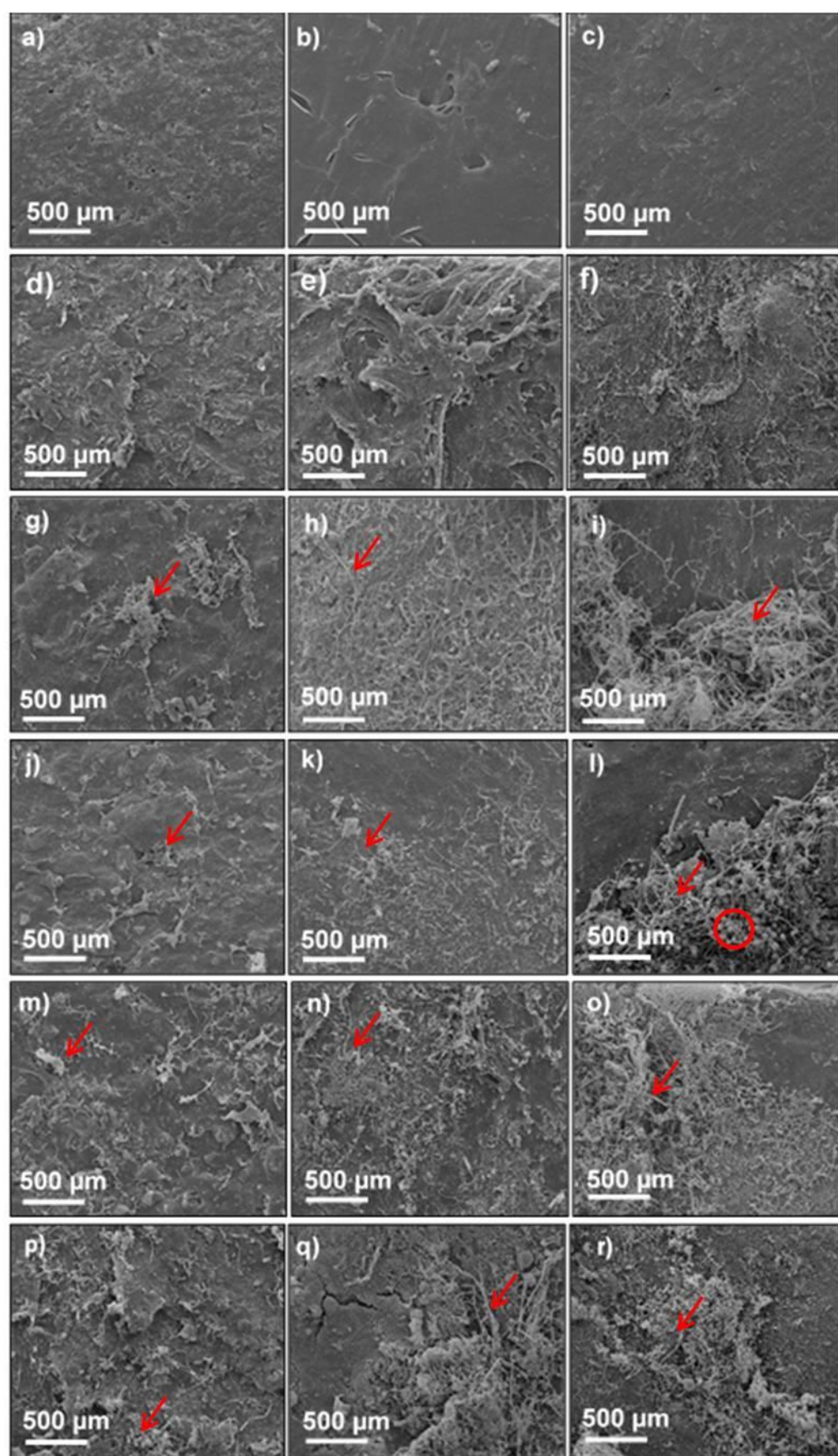
The sugarcane bagasse used in this work is a byproduct obtained after washing the milled cane, an industrial process that is necessary to remove as much soluble sugars as possible, resulting in a material consisting primarily of cellulose, hemicelluloses and lignin. This process could be related to the lower WAC values and the early saturation of the SB-composites, because of the lower chemical complexity and high lignocellulosic content (ADANS et al., 2017; MONTANES et al., 2017). However, the fillers used in the OH- and SE-composites (oat hulls and silkworm exuvia waste, respectively) were not subjected to any previous treatment and were used as is, and thus, their proteins, lipids and noncellulosic carbohydrate content may have interfered with the material's behavior when subjected to the extrusion and injection-mold processes.

3.3. Scanning Electron Microscopy (SEM)

Micrographs of the sample surfaces before they were subjected to biodegradation (Fig. 3) showed small variations in roughness, although the general appearance was homogeneous, demonstrating that the components used here were compatible and equally dispersed (Fig. 3a, 3b and 3c), as expected for materials based on PVA and starch (ZANELA et al., 2015). It is important to note that the differences observed in the surface appearance between the samples described here resulted from the use of different fillers. In this sense, samples prepared with sugarcane bagasse, which presented the lowest amounts of protein and reducing sugars and a higher carbon-to-nitrogen (C/N) ratio, showed the roughest surface, while samples prepared using oat hulls, which contained the highest amounts of reducing sugars and proteins, exhibited the smoothest surfaces among the samples.

Figure 3. Surface view of samples as observed through SEM. Micrographs a, d, g, j, m and p correspond to the surfaces of materials formulated with sugarcane bagasse (SB). Micrographs b, e, h, k, n and q correspond to surface views of the materials formulated with oat hulls (OH). Micrographs c, f, i, l, o and r correspond to surface views of materials formulated with silkworm exuvia waste (SE). The images were obtained from fresh samples (a, b and c) and samples subjected to increasing

biodegradation times of 7 (d, e and f), 14 (g, h and i), 21 (j, k and l), 28 (m, n and o) and 35 (p, q and r) days during which they were buried in a commercial substrate for seedlings production. Arrows indicate bacterial clumps (g, j, m and p) and fungal hyphae (h, i, k, l, n, o, q and r). Circle in l highlight the presence of reproductive fungal structures (sporangia).



As the biodegradation time advanced, an increased microbial colonization was evident in addition to modifications in the composite material structure, as a result of the mineralization activity promoted by the biodegrading microbiota (SALEHPOUR et al., 2018). Differences in the surface morphology of the samples was apparent after just 7 days of biodegradation, when a increase in the roughness of the OH-composite samples (Fig. 3e) and the high colonization of SE-composite samples by filamentous fungi (Fig. 3f) were noted. Surface images obtained after increasing biodegradation times (14, 21, 28 and 35 days of biodegradation, Fig. 3g–3r) highlighted the advance in sample colonization by microorganisms, with an apparent prevalence of bacteria colonizing the SB-composite (Fig. 3g, 3j, 3m and 3p), while the OH- and SE-composites were largely colonized by filamentous fungi. The prevalence of the bacterial groups colonizing the SB-composite samples may hence be related to their higher C/N ratios when compared to those of the OH- and SE-composites, and further studies are necessary to determine to what extent these differences modified the structure of the microbial communities and their function as decomposers.

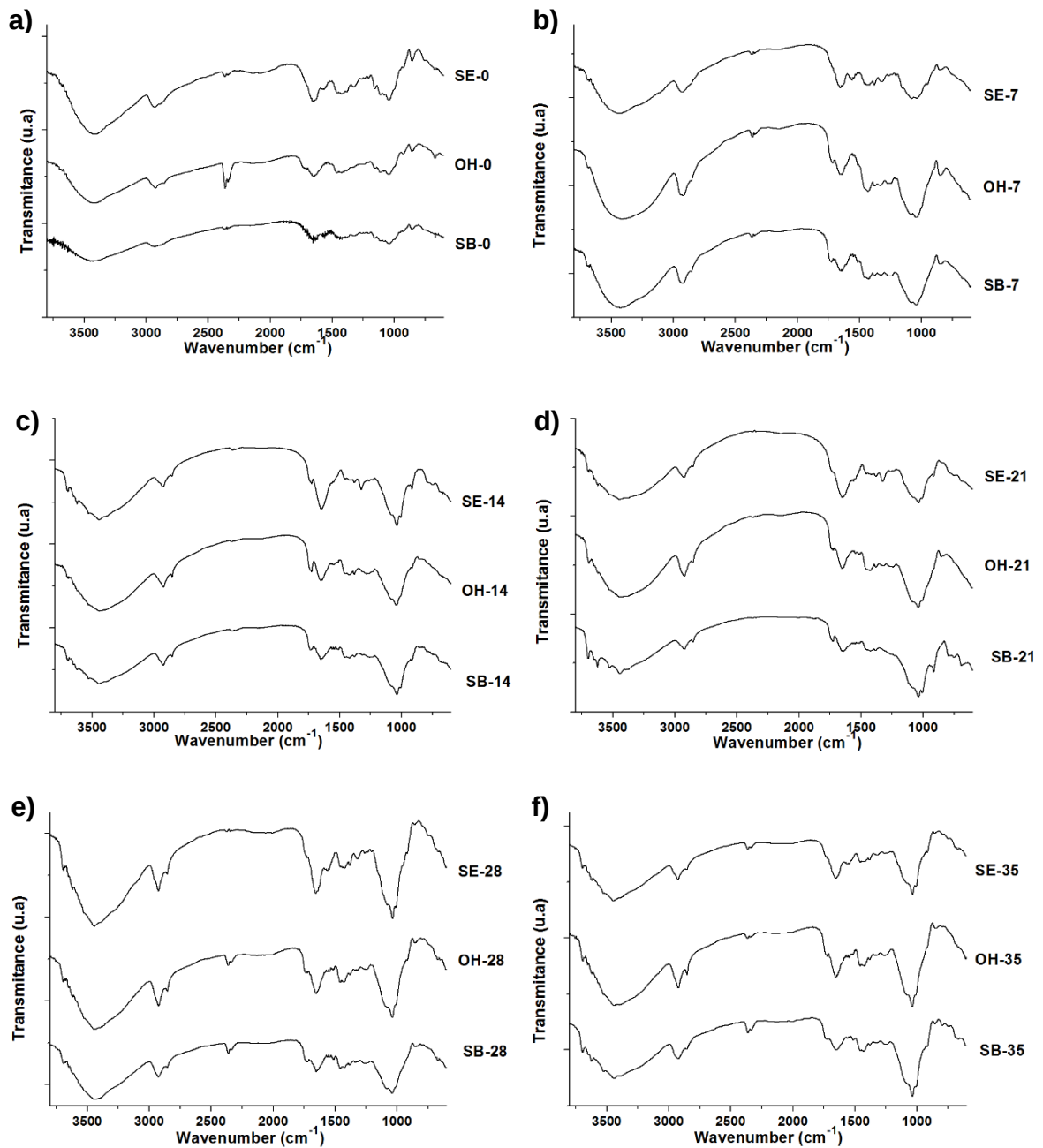
Shifts in the structure of the soil microbial communities in response to nutrients and/or organic matter input is well reported in the literature and has been shown to be correlated with modifications in the ecological functioning of soils (LEFF et al., 2015). In addition, different soil microbial groups present different nutritional constraints to reach increased populations along with the decomposition of organic matter, and although these constraints have been found in relation to the native soil nutritional status, it has also been demonstrated that fungal growth prevails through N amendments while bacterial growth responds better to C-rich substrates (KAMBLE; BÅÅTH, 2016; NOTTINGHAN et al., 2018). Furthermore, it is possible to note the bacterial clumps in an exopolysaccharide-like matrix (biofilm) on the SB-composite samples that were subjected to at least 14 days of biodegradation (Fig. 3g, 3j, 3m and 3p), indicating the tight association of these microbial groups with the buried material. Bacterial attachment to surfaces through biofilm formation is a strategy for long-term survival, and it was previously reported to occur in starch/sugarcane fiber composite materials that were subjected to biodegradation in soil (DUNNE et al., 2002; VERCELHEZE et al., 2013).

3.4. Fourier Transform-Infrared Spectroscopy (FT-IR)

FT-IR spectra analyses of the SB-, OH- and SE-composites are shown in Figure 4. The similar chemical compositions of the materials, which differed only with respect to the source of the filler, is evidenced by the FT-IR spectra obtained from samples that were not subjected to biodegradation (Fig. 4a). These samples presented the characteristic bands of hydrogen bonds between the OH groups ($3720\text{--}3004\text{ cm}^{-1}$), axial and angular deformations in CH_2 (2922 cm^{-1}) and the elongation bands of the anhydroglucose ring (the O-C region between $1029\text{--}1162\text{ cm}^{-1}$ and the C-O region at 1157 cm^{-1}), which characterize the presence of starch (GALDEANO et al., 2009). The bands observed at 1430 and 850 cm^{-1} can be attributed to the C-O-C stretching vibrations characteristic of the β ($1 \rightarrow 4$) glycosidic bonds of cellulose, which is the primary component of sugarcane bagasse and oat hulls (IBRAHIM; AGBLEVOR; EL-ZAWAWY, 2010; CIOLACU; CIOLACU; POPA, 2011). The bands related to cellulose were more pronounced in the CH- than those in the SB-composites, which could be related to the higher content of this material in composites prepared with sugarcane bagasse (HUANG; YU; MA, 2004).

In all the samples that were not subjected to biodegradation (Fig. 4a), the observed bands approximately 1650 cm^{-1} indicate the angular bending of water molecules that are bound to polysaccharides (ŁOJEWSKA et al., 2005). This band was more pronounced in SE-composites, and it may respond to the higher hygroscopicity in this sample, as observed in the water absorption capacity (WAC) analysis. The discrete presence of this same region (1650 cm^{-1}) in the FT-IR spectra of OH- and SB-composites could be related to the lignocellulosic composition of these samples, because this region is related to the C=C portion of the lignin aromatic ring (SUN et al., 2004). For SE-composites, the typical bands related to the chitin carbohydrate backbone were observed between $1040\text{--}1070\text{ cm}^{-1}$, in addition to the bands at $1152\text{--}1156\text{ cm}^{-1}$ that are related to the glycosidic linkage, C-H stretch and saccharide structure. Other bands related to the C-N stretching in the secondary amide (Amide III, 1328 cm^{-1}), N-acetyl ester bonds (1560 cm^{-1} , Amide II) and the C-O stretching in the secondary amide (Amide I 1627 cm^{-1} and 1670 cm^{-1} at) were also present in the SE-composites (DUARTE et al., 2002; VAN DE VELDE; KIEKENS, 2004; PRABU; NATARAJAN, 2012).

Figure 4. FT-IR spectra of formulations with sugarcane bagasse (SB), oat hulls (OH) and silkworm exuvia waste (SE). The spectra were recorded in samples before (a) and after biodegradation for different periods of time in an organic substrate. The notation of numbers after the abbreviations of composite formulations (SB-, OH- and SE-) indicates the period of time, in days, during which the samples remained buried in the substrate (the biodegradation time period).



As the biodegradation of the materials containing SB, OH and SE advanced (Fig. 4b, 4c and 4d), an increased intensity in the bands was observed at 3720-3004 cm^{-1} , which was attributed to the O-H hydrogen bonds. Bands indicative of the angular flexion of water molecules bound to polysaccharides (1650 cm^{-1}), to the O-C and C-O anhydroglucose elongation ring (1029-1162 cm^{-1} and 1157 cm^{-1} , respectively) and the C-O-C stretching vibrations of β (1 $\rightarrow$ 4) glucosidic bonds (850 cm^{-1}) were also found to have increased intensity in biodegraded materials. The increased intensity of these bands as the composite biodegradation take place indicates that the biotransformation of polysaccharides from starch, cellulose and chitin in low-molecular-weight sugars or into the biofilms from the microbial cells that are involved in biodegradation experience population increases as the sample biodegradation progresses. According to Stloukal et al. (2015), components with low molecular weights could be more easily assimilated by microorganisms and ultimately mineralized into end-products such as CO_2 , H_2O and biomass during biodegradation. Bands related to amide groups showed small changes in Amide III and more pronounced changes in Amide II and Amide I, in accordance with the increased protein content in the composites as biodegradation occurs. According to Klemenčič et al. (2010) the increase in these bands can be attributed to the production of proteins by microbial growth during the biodegradation process.

3.5. Biodegradation and Soil Microbiological Parameters

The physical and chemical modifications observed during the biodegradation of samples produced from composite materials that were formulated with different fillers and their respective effects on the microbiological parameters from substrates in which the biodegradation occurred are presented in Table 2. It is interesting to note that all the parameters were influenced by the filler employed in the composite polymeric matrix. The SB-composite samples exhibited a slower biodegradation rate, as determined by the weight of the samples during the experimental period. The biodegradation rate of the OH or SE-composites did not differ from one another and showed a mean weight loss of 38% after 35 days buried in a commercial substrate for seedlings production, while the SB-composites showed a weight decrease of 29.7% under the same conditions. It is noteworthy that the SB samples showed decreased weights until 14 trial days and then remained without further significant

variations, while the OH and SE samples required twice as much time (28 days) to present no significant variations in the sample weights.

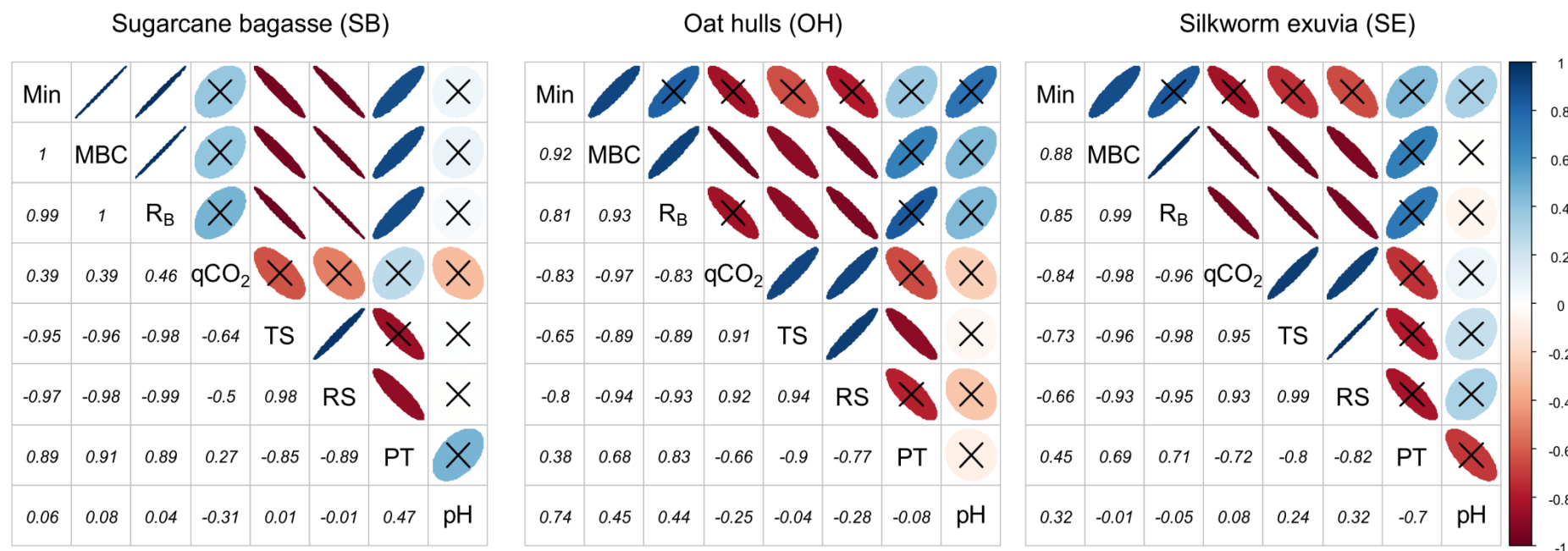
Table 2. Biodegradation of composite materials formulated using sugarcane bagasse (SB), oat hulls (OH) or silkworm exuvia waste (SE) as fillers and microbiological parameters from the respective substrates in which biodegradation occurred. The values represent the means of three determinations. The sampling time corresponds to the elapsed time during which the samples remained buried in a commercial substrate used to produce seedlings.

Sampling time (days)	Weight loss (%)			Total sugars (mL g ⁻¹ composite material)			Reducing sugars (mL g ⁻¹ composite material)			Total protein (mL g ⁻¹ composite material)		
	SB	OH	SE	SB	OH	SE	SB	OH	SE	SB	OH	SE
Reference ¹		NA ²		488.8 ^{Aa}	471.0 ^{Ba}	409.3 ^{Ca}	92.4 ^{Ba}	271.1 ^{Aa}	41.4 ^{Ca}	1.13 ^{Ce}	8.38 ^{Aa}	7.52 ^{Bc}
7	16.02 ^{Bc}	26.64 ^{Ac}	27.96 ^{Ab}	157.2 ^{Bb}	215.9 ^{Ab}	91.6 ^{Cb}	40.6 ^{Bb}	178.0 ^{Ab}	38.2 ^{Cb}	0.19 ^{Bf}	3.77 ^{Ad}	3.72 ^{Ad}
14	23.94 ^{Bb}	27.67 ^{Ac}	29.49 ^{Ab}	37.2 ^{Ac}	32.3 ^{Bc}	25.3 ^{Cc}	23.6 ^{Bc}	82.6 ^{Ac}	15.7 ^{Cc}	3.27 ^{Cd}	7.77 ^{Bab}	9.61 ^{Ab}
21	29.88 ^{NSa}	31.05 ^{NSb}	30.22 ^{NSb}	25.9 ^{Ad}	20.9 ^{Bd}	25.0 ^{Ac}	19.4 ^{Ad}	17.3 ^{Bd}	14.2 ^{Cd}	4.77 ^{Cc}	7.74 ^{Bb}	9.91 ^{Ab}
28	29.11 ^{Ba}	36.23 ^{Aa}	35.29 ^{Aa}	16.7 ^{Ae}	12.8 ^{Ce}	14.7 ^{Bd}	14.3 ^{Af}	13.3 ^{Be}	13.4 ^{Bd}	6.16 ^{Bb}	6.16 ^{Bc}	12.27 ^{Aa}
35	29.69 ^{Ba}	38.17 ^{Aa}	37.89 ^{Aa}	14.8 ^{Ae}	13.9 ^{Be}	6.2 ^{Ce}	16.8 ^{Ae}	14.4 ^{Bde}	11.3 ^{Ce}	8.72 ^{Aa}	7.58 ^{Bb}	7.69 ^{Bc}
CV (%)	3.43	3.96	3.16	1.08	0.58	2.39	1.63	1.41	1.50	3.66	3.31	2.82
Sampling time (days)	pH in water			MBC ³ (mg kg ⁻¹ substrate)			R _B ⁴ (mg C–CO ₂ kg ⁻¹ substrate h ⁻¹)			qCO ₂ ⁵ (mg C–CO ₂ mg ⁻¹ MBC h ⁻¹)		
	SB	OH	SE	SB	OH	SE	SB	OH	SE	SB	OH	SE
Reference	5.7 ^{Bc}	6.6 ^{Ab}	6.4 ^{Ab}		180.20			1.85			10.26	
7	6.1 ^{Bb}	6.1 ^{Bc}	6.6 ^{Aab}	181.61 ^{Bc}	183.33 ^{Bc}	250.00 ^{Ad}	1.21 ^{Cc}	2.09 ^{Bd}	2.33 ^{Ac}	6.69 ^{Cb}	11.38 ^{Aa}	9.31 ^{Bns}
14	5.5 ^{ABc}	5.1 ^{Bd}	5.8 ^{Ac}	277.28 ^{NSb}	304.55 ^{NSb}	345.45 ^{NSb}	2.32 ^{Cb}	2.70 ^{Bc}	2.94 ^{Ab}	8.38 ^{NSa}	8.90 ^{NSb}	8.63 ^{NSns}
21	5.6 ^{NSc}	5.8 ^{NSc}	5.8 ^{NSc}	339.39 ^{Ba}	336.36 ^{Bb}	362.12 ^{Ab}	2.54 ^{Ba}	2.97 ^{Ab}	2.91 ^{Ab}	7.50 ^{Cab}	8.83 ^{Ab}	8.04 ^{Bns}
28	5.5 ^{Bc}	6.1 ^{Ac}	5.9 ^{Ac}	350.00 ^{Ba}	403.54 ^{Aa}	400.36 ^{Aab}	2.61 ^{Ca}	2.85 ^{Bbc}	3.14 ^{Aab}	7.46 ^{ABb}	7.07 ^{Bc}	7.84 ^{Ans}
35	7.2 ^{NSa}	7.2 ^{NSa}	6.9 ^{NSa}	348.48 ^{Ba}	427.27 ^{Aa}	431.52 ^{Aa}	2.58 ^{Ba}	3.29 ^{Aa}	3.30 ^{Aa}	7.41 ^{NSb}	7.69 ^{NSc}	7.66 ^{NSns}
CV (%)	2.35	2.82	2.39	1.76	5.37	6.40	3.04	2.40	4.02	4.42	4.00	8.51

¹Reference control values from materials not subjected to biodegradation but used for the statistical analysis and values for the MBC, R_B and qCO₂ recorded on substrate without the presence of composite materials that were not used for the statistical analysis. ²Not applicable. ³Microbial biomass carbon (MBC).

⁴Basal respiration (R_B). ⁵Metabolic quotient (qCO₂). Different capital letters in the row and different small letters in the column indicate statistically significant differences ($p < 0.05$) according to Tukey's test.

Figure 5. Correlation matrix of associations between biodegradation and the microbiological parameters of composite samples based on PVA and cassava starch with different fillers (sugarcane bagasse - SB, oat hulls – OH, or silkworm exuvia waste - SE). Flat and rounded ellipses indicate strong and weak correlations, respectively; the color density indicates positive/negative correlations according to the scale bar. The correlation values between the variables are indicated in the lower triangular portion of the matrix, and insignificant correlations ($p > 0.05$) are evidenced by the “X” mark in the respective ellipses. Min weight loss of samples, MBC microbial biomass carbon, R_B basal respiration, qCO_2 metabolic quotient, TS total sugar content, RS reducing sugar content, PT total protein content, and pH hydrogen ionic potential.



An analysis of the soluble sugars and proteins performed in the samples before the biodegradation trial shows that SB samples had the highest sugar content, with more than 80% corresponding to nonreducing sugars, while their protein content was the lowest among the composite materials evaluated here (Table 2). However, the total protein content, which indicates the portion of N that is available to the biodegrading microbiota, was much higher in the OH and SE formulations, than that in the SB. Along with the biodegradation experiment, the protein content of the samples showed a decrease during the first week for all the formulations, followed by increases in its content as the biodegradation advanced until the end of the experiment, when the values converged between the samples. Together, the total sugar and protein content indicate the C/N ratio dynamics of biodegrading samples, whereas the great variation resulting from the differences in the composite formulations tends to decrease and reach similar C/N ratios as the biodegradation activity progresses. This finding suggests that the microbiota involved in biodegradation passes an initial period of approximately one week of high mineralization activity, with the rapid consumption of carbon and nitrogen without increases in the populations. This activity was followed by a slow mineralization activity period with a continuous increase in the microbial populations, which may be related to the depletion of nutrients from composites that became immobilized by the biodegrading microbiota.

The C/N ratio is one of the most important parameters affecting the biodegradation of organic materials in soil, and it is related to the biodegradation of PVA nanocomposites. This parameter acts by lowering the biodegradation rate as the C/N ratio of the materials increases (SALEHPOUR et al., 2018; YE et al., 2018). In addition, although PVA is susceptible to biological degradation, its biodegradation rate has been shown to be slow (TANG et al., 2011; BEN HALIMA et al., 2016). The incorporation of readily metabolizable compounds into PVA-based composite formulations, such as starch, biopolymers and nutrient minerals, can operate as nutritional support for microbial growth and promote significant increases in the biodegradation rate (IMAM et al., 2005; TAN et al., 2016). The influence of organic materials on the biodegradation rate of the PVA-based composites described in this study can be associated with the priming effect, because changes in soil microbial characteristics are expected when adding substrates that are rich in soluble C content (WANG et al., 2015). This finding was evidenced by the increases in the

substrate MBC (Table 2) with the concomitant decrease in the amount of total sugars and the increase in the protein content of samples subjected to biodegradation, regardless of the chosen organic filler.

The transformations of the composite biomass into microbial biomass and energy is expected as a result of the biodegradation activity as well as the colonization of the surface and inner spaces of the composite samples subjected to biodegradation (SALEHPOUR et al., 2018). The MBC values are indicative of the microbial activity (JANZEN et al., 1992; ANDERSON; DOMSCH, 2010), and their application within monitoring parameters related to soil quality has been put to broad use because the biological and biochemical properties of soil promptly respond to small changes in this environment. In this study, the results of the MBC, R_B and qCO_2 of the substrates along with the different composite samples were in accordance with the weight loss analysis, indicating the active role of microorganisms in the biodegradation of the materials described here. Substrates mixed with SB composites presented the lowest MBC during the entire experimental period, in contrast to the substrates mixed with SE composites that supported the highest MBC for up to 21 days, with a prompt effect on the MBC in relation to the reference control and the strongest priming effect between the materials studied here. Positive correlations between the microbial biomass carbon and nitrogen were previously reported in soils, supporting the present results (ANDERSON; DOMSCH, 2010; FANIN et al., 2015).

The correlation analyses across the composite materials characteristics and microbiological parameters related to biodegradation are presented in Figure 5, according to each study formulation and considering the full period of biodegradation (35 days). Significant correlations are evident from the MBC with the weight loss and with the R_B in all the studied materials, confirming that microbial communities have used part of material mass to increase its own biomass and part of it to produce metabolic energy through respiration. The basal respiration has been widely addressed to study the microbial activity and biodegradation of organic materials in soil and other solid substrates, once its use provides information about the gross metabolic state of microbial populations and to allow an inference about their role in the decomposition of these materials (BANEGAS et al., 2007). Here, the R_B values increased while total and reducing sugars decreased with the biodegradation time, leading to negative correlations regardless the composite formulation. This

correlation is expected and confirms that readily metabolizable C sources were rapidly consumed followed by other non-sugar C sources which supported the biodegradation process along time. The nutritional quality and the ability of organic C-rich materials to support the establishment of biodegrading microbiota was previously demonstrated (EMMERLING et al., 2000).

On the other hand, the qCO_2 showed no correlation to any studied variable when considering SB-composites, while significant positive correlations were observed between qCO_2 and sugars content, in addition to negative correlations between qCO_2 and microbial biomass carbon (OH- and SE-composites) and between qCO_2 and R_B (SE-composites only). The biodegradation efficiency can be inferred from the metabolic quotient (qCO_2), which indicates the amount of CO_2 emitted per unit of organic carbon and hence the microbial energy demand to convert C-sources into biomass (ISLAM et al., 2000). Generally, a high qCO_2 may be indicative of either ecological disorders or high-level productivity in ecosystems, and a low qCO_2 represents efficient and more stable microbial communities with a prevalence of slow-growing (K-strategists) over fast-growing (r-strategists) microorganisms (ANDERSON; DOMSCH, 2010). Our results demonstrate that variations for the qCO_2 values between samples were prominent at early biodegradation (7th to 21st day) and converged to similar at later biodegradation periods with the general a to decrease qCO_2 values over time. Taking into account these results, we inferred that more labile carbon was accumulated on substrates added with OH- or SE-composites as compared to those that received SB-composites. These variations are suggested to result from microbial communities with different activities or composition, where those less efficient ones in terms of carbon utilization can be related to the SB-composites. The potential of microbial communities with high fungal/bacterial ratios to present increased carbon storage potential was previously reported (VRIES et al., 2006; MALIK et al., 2016) and supports our findings which showed by SEM the prevalence of bacterial morphotypes colonizing SB-composites in contrast to OH and SE-composites which fungi morphotypes prevailed as main colonizers.

According to the hypothesis presented by this study, the introduction of easily metabolizable compounds into a composite formulation could function as nutritional support for the biodegrading microorganisms, and it could subsidize the design of functional biodegrading materials that are suitable substitutes for synthetic

thermoplastic ones while improving the environmental quality. In fact, the presence of compounds such as crystal sugar, powdered skim milk, yeast extract, rock phosphate and an organic filler positively influenced the microbial activity associated with biodegradation, as observed in the presented results. In addition, we found that the fillers had remarkable effects over the biodegradation rate, primarily due to the C/N ratio of these materials. The use of lignocellulosic filler material with a high C/N ratio, as with the sugarcane bagasse used in this study, may result in compacted injection-mold samples with low porosity, limiting the lixiviation of nutrients from samples as well as the access of biodegrading microbiota, hence lowering its biodegradation rate. Conversely, the composite samples produced with OH or SE showed a similar impact on the microbial activity and biomass, even though the sugar and protein content of these formulations differed significantly due to the lignocellulosic nature of OH material (TAMANINI et al., 2004). From the presented results, it is possible to state that biodegradable materials can be designed from a basal formulation to modulate the quali-quantitative composition of the microbiota, maintaining at, recovering or increasing in a given environment, an intended function ruled by microorganisms. Given the importance of microorganisms to agriculture, and the growing concern related to the degradation of crop lands, the use of biodegradable injection-mold materials that are able to improve the biological activity of soil is of great importance for addressing the bioremediation of degraded lands or the introduction of beneficial bacteria into farm crops (BAREA, 2015). The rate of material biodegradation described in this study was shown to be suitable for medium and short-term applications, such as the manufacturing of the pots and propagation tubes used in agriculture.

4. Conclusions

The formulations based on PVA, starch, natural fillers and nutrients described in this study were successfully used to produce biodegradable plastic composites, the performance of which allows their applications in several areas. In particular, the influence of the developed materials in the differently shape the microbial community involved in its biodegradation, according to the biopolymeric filler in use, highlights its application as a biotechnological input to ameliorate biological functions on soil, which includes agriculture and bioremediation. The presented results indicate that the

intended effects on the soil microbiota can be achieved through the design of the material composition, primarily the C/N ratio of the composite materials and the number of added nutritional compounds. The composite formulation produced with sugarcane bagasse as filler showed the best characteristics for long-term applications, with the slowest biodegradation rate and a lower water absorption capacity and solubility in water, while composites produced with oat hulls or silkworm exuvia showed high potential to stimulate microbial communities with more efficiency in carbon use. Considering the current importance of plastics in manufacturing materials for daily use and the necessity to decrease the plastic waste in the environment, the materials described in this study are a feasible alternative to partly supply the demand for plastic for the pots and buckets used in agriculture and produce positive impacts on soil quality parameters when disposed after their lifetimes end.

REFERENCES

ABNT–Associação Brasileira de Normas Técnicas. Papel e Cartão. Determinação da capacidade de absorção de água. Método de Cobb. **Associação Brasileira de Normas Técnicas**, 1999, Rio de Janeiro.

ADAMS, B.; ABDELWAHAB, M.; MISRA, M.; MOHANTY, A. K. Injection-Molded Bioblends from Lignin and Biodegradable Polymers: Processing and Performance Evaluation. **Journal of Polymers and the Environment**, n. 123456789, p. 1–14, 2017.

ANDERSON, T.-H.; DOMSCH, K. H. The metabolic quotient for CO₂ (qCO₂) as a specific activity parameter to assess the effects of environmental conditions, such as pH, on the microbial biomass of forest soils. **Soil biology and biochemistry**, v. 25, n. 3, p. 393–395, 1993.

ANDERSON, T. H.; DOMSCH, K. H. Soil microbial biomass: The eco-physiological approach. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 42, n. 12, p. 2039–2043, 2010.

ASTM- American Society for Testing and Material, **ASTM D638-03**, 2003.

BANEGAS, V.; MORENO, J. L.; MORENO, J. I.; GARCÍA, C.; LEÓN, G.; HERNÁNDEZ, T. Composting anaerobic and aerobic sewage sludges using two proportions of sawdust. **Waste Management**, v. 27, n. 10, p. 1317–1327, 2007.

BAREA, J. M. Future challenges and perspectives for applying microbial biotechnology in sustainable agriculture based on a better understanding of plant-microbiome interactions. v. 15, n. 2, p. 261–282, 2015.

BEN HALIMA, N. Poly(vinyl alcohol): review of its promising applications and insights into biodegradation. **RSC Advances**, v. 6, n. 46, p. 39823–39832, 2016.

BRADFORD, M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein– dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248–254, 1976.

CARDENAS-TORO, F. P.; ALCAZAR-ALAY, S.; C.; FORSTER-CARNEIRO, T.; ANGELA, M.; MEIRELES, A. Obtaining Oligo- and Monosaccharides from Agroindustrial and Agricultural Residues Using Hydrothermal Treatments. **Food Public Health**, v. 4, p. 123–139, 2014.

CHEN, H.; ZHAO, J.; DAI, G. Silkworm exuviae - A new non-conventional and low-cost adsorbent for removal of methylene blue from aqueous solutions. **Journal of Hazardous Materials**, v. 186, p. 1320–1327, 2011.

CIOLACU, D.; CIOLACU, F.; POPA, V. Amorphous cellulose—structure and characterization. **Cellulose and Chemistry**, v. 45, p. 13–21, 2011.

DUARTE, M. L.; FERREIRA, M. C.; MARVÃO, M. R.; ROCHA, J. An optimised method to determine the degree of acetylation of chitin and chitosan by FTIR spectroscopy. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 31, p. 1–8, 2002.

DUBOIS, M.; GILLES, K.; HAMILTON, J.; REBERS, P.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, v. 28, n. 3, p. 350–356, 1956.

DUNNE, W. M. Bacterial Adhesion: Seen Any Good Bio fms Lately? **Society**, v. 15, n. 2, p. 155–166, 2002.

EMMERLING, C.; LIEBNER, C.; HAUBOLD-ROSAR, M.; KATZUR, J.; SCHRODER, D. Impact of application of organic waste materials on microbial and enzyme activities of mine soils in the Lusatian coal mining region. **Plant and Soil**, v. 220, n. 1–2, p. 129–138, 2000.

FANIN, N.; HÄTTENSCHWILER, S.; SCHIMANN, H.; FROMIN, N. Interactive effects of C, N and P fertilization on soil microbial community structure and function in an Amazonian rain forest. **Functional Ecology**, v. 29, n. 1, p. 140–150, 2015.

GALDEANO, M. C.; MALI, S.; GROSSMANN, M. V. E.; YAMASHITA, F.; GARCÍA, M. A. Effects of plasticizers on the properties of oat starch films. **Materials Science and Engineering: C**, v. 29, p. 532–538, 2009.

GONTARD, N.; GUILBERT, S.; CUQ, J. -L. Water and Glycerol as Plasticizers Affect Mechanical and Water Vapor Barrier Properties of an Edible Wheat Gluten Film. **Journal of Food Science**, v. 58, n. 1, p. 206–211, 1993.

GU, F.; GUO, J.; ZHANG, W.; SUMMERS, P. A.; HALL, P. From waste plastics to industrial raw materials: A life cycle assessment of mechanical plastic recycling practice based on a real-world case study. **Science of The Total Environment**, v. 601–602, p. 1192–1207, 2017.

HERRERA, N.; SINGH, A. A.; SALABERRIA, A. M.; LABIDI, J.; MATHEW, A. P.; OKSMAN, K. Triethyl citrate (TEC) as a dispersing aid in polylactic acid/chitin nanocomposites prepared via liquid-assisted extrusion. **Polymers**, n. 9, v. 406, p. 1–16, 2017.

HORTON, A. A.; WALTON, A.; SPURGEON, D. J.; LAHIVE, E.; SVENDSEN, C. Microplastics in freshwater and terrestrial environments: Evaluating the current understanding to identify the knowledge gaps and future research priorities. **Science of the Total Environment**, v. 586, p. 127–141, 2017.

HUERTA, E.; MENDOZA VEGA, J.; QUEJ, V. K.; CHI, J. de los A.; SANCHEZ DEL CID, L.; QUIJANO, C.; ESCALONA-SEGURA, G.; GERTSEN, H.; SALÁNKI, T.; VAN DER PLOEG, M.; KOELMANS, A. A.; GEISSEN, V. Bioaccumulation of microplastics in the terrestrial food chain: an example from home gardens in SE Mexico. **19th EGU General Assembly, EGU2017, proceedings from the conference held 23-28 April, 2017 in Vienna, Austria., p.15847**, v. 19, n. September 2016, p. 15847, 2017.

HUANG, M. F.; YU, J. G.; MA, X. F. *Polymer (Guildf)*. Studies on the properties of Montmorillonite-reinforced thermoplastic starch composites. **Polymer**, v. 45, p. 7017–7023, 2004.

IBRAHIM, M. M.; AGBLEVOR, F. A.; EL-ZAWAWY, W. K. Isolation and characterization of cellulose and lignin from steam-exploded lignocellulosic biomass. **BioResources**, v. 5, n. 1, p. 397–418, 2010.

IMAM, S. H.; CINELLI, P.; GORDON, S. H.; CHIELLINI, E. Characterization of biodegradable composite films prepared from blends of poly(vinyl alcohol), cornstarch, and lignocellulosic fiber. **Journal of Polymers and the Environment**, v. 13, n. 1, p. 47–55, 2005.

JAKUBOWICZ, I.; YARAHMADI, N.; ARTHURSON, V. Kinetics of abiotic and biotic degradability of low-density polyethylene containing prodegradant additives and its effect on the growth of microbial communities. **Polymer Degradation and Stability**, v. 96, n. 5, p. 919–928, 2011.

JANZEN, H. H.; CAMPBELL, C. A.; BRANDT, S. A.; LAFOND, G. P.; TOWNLEY-SMITH, L. Light-Fraction Organic Matter in Soils from Long-Term Crop Rotations. **Soil Science Society of America Journal**, v. 56, p. 1799–1806, 1992.

JAYANTH, D.; KUMAR, P. S.; NAYAK, G. C.; KUMAR, J. S.; PAL, S. K.; RAJASEKAR, R. A Review on Biodegradable Polymeric Materials Striving Towards the Attainment of Green Environment. **Journal of Polymers and the Environment**, v. 0, n. 0, p. 1–28, 2017.

JESSOP, P. G.; AHMADPOUR, F.; BUCZYNSKI, M. A.; BURNS, T. J.; GREEN II, N. B.; KORWIN, R.; LONG, D.; MASSAD, S. K.; MANLEY, J. B.; OMIDBAKHS, N.; PEARL, R.; PEREIRA, S.; PREDALE, R. A.; SLIVA, P. G.; VANDERBILT, H.; WELLER, S.; WOLF, M. H. Opportunities for greener alternatives in chemical formulations. **Green Chemistry**, v. 17, n. 5, p. 2664–2678, 2015.

KADOKAWA, J. I.; TAKEGAWA, A.; MINE, S.; PRASAD, K. Preparation of chitin nanowhiskers using an ionic liquid and their composite materials with poly(vinyl alcohol). **Carbohydrate Polymers**, v. 84, n. 4, p. 1408–1412, 2011.

KAMBLE, P. N.; BÅÅTH, E. Comparison of fungal and bacterial growth after alleviating induced N-limitation in soil. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 103, p. 97–105, 2016.

KLEMENČIČ, D.; SIMONČIČ, B.; TOMŠIČ, B.; OREL, B. Biodegradation of silver functionalised cellulose fibres. **Carbohydrate Polymers**, v. 80, p. 427–436, 2010.

LEE, W. J.; CLANCY, A. J.; KONTTURI, E.; BISMARCK, A.; SHAFFER, M. S. P. Strong and stiff: high-performance cellulose nanocrystal/poly (vinyl alcohol) composite fibres. **ACS Applied Materials and Interfaces**, v. 8, p. 31500–31504, 2016.

LEFF, J. W.; JONES, S. E.; PROBER, S. M.; BARBERÁN, A.; BORER, E. T.; FIRN, J. L.; HARPOLE, W. S.; HOBIE, S. E.; HOFMOCKEL, K. S.; KNOPS, J. M. H.; MCCULLEY, R. L.; PIERRE, K.; RISCH, A. C.; SEABLOOM, E. W.; SCHÜTZ, M.; STEENBOCK, C.; STEVENS, C. J.; FIERER, N. Consistent responses of soil microbial communities to elevated nutrient inputs in grasslands across the globe. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 112, p. 10967–10972, 2015.

LIU, H.; GAO, C.; WEI, C.; WANG, C.; YU, X.; WANG, G. Evaluating the timing of the start of the Anthropocene from Northeast China: Applications of stratigraphic indicators. **Ecological Indicators**, v. 84, n. September 2017, p. 738–747, 2018.

ŁOJEWSKA, J.; MIŚKOWIEC, P.; ŁOJEWSKI, T.; PRONIEWICZ, L. M. Cellulose oxidative and hydrolytic degradation: In situ FTIR approach. **Polymer Degradation and Stability**, v. 88, n. 3, p. 512–520, 2005.

LOPEZ, O.; GARCIA, M. A.; VILLAR, M. A.; GENTILI, A.; RODRIGUEZ, M. S.; ALBERTENGO, L. Thermo-compression of biodegradable thermoplastic corn starch films containing chitin and chitosan. **LWT - Food Science and Technology**, v. 57, n. 1, p. 106–115, 2014.

MAJEED, Z.; RAMLI, N. K.; MANSOR, N.; MAN, Z. A comprehensive review on biodegradable polymers and their blends used in controlled-release fertilizer processes. **Reviews in Chemical Engineering**, v. 31, n. 1, p. 69–95, 2015.

MARCELINO, P. R. F.; MILANI, K. M. L.; MALI, S.; SANTOS, O. J. A. P. dos; DE OLIVEIRA, A. L. M. Formulations of polymeric biodegradable low-cost foam by melt extrusion to deliver plant growth-promoting bacteria in agricultural systems. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 100, n. 16, p. 7323–7338, 2016.

MALIK, A. A.; CHOWDHURY, S.; SCHLAGER, V.; OLIVER, A.; PUISSANT, J.; VAZQUEZ, P. G. M.; JEHLICH, N.; BERGEN, M. V.; GRIFFITHS, R. I.; GLEIXNER, G. Soil fungal: bacterial ratios are linked to altered carbon cycling. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, p. 1247, 2016

MILLER, G. L. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, p. 426–428, 1959.

MONTANES, N.; GARCIA-SANOQUERA, D.; SEGUI, V. J.; FENOLLAR, O.; BORONAT, T. Processing and Characterization of Environmentally Friendly Composites from Biobased Polyethylene and Natural Fillers from Thyme Herbs. **Journal of Polymers and the Environment**, p. 1–13, 2017.

NOTTINGHAM, A. T.; HICKS, L. C.; CCAHUANA, A. J. Q.; SALINAS, N.; BÅÅTH, E.; MEIR, P. Nutrient limitations to bacterial and fungal growth during cellulose decomposition in tropical forest soils. **Biology and Fertility of Soils**, v. 54, p. 219–228, 2018.

OLIVEIRA, T. G.; MAKISHI, G. L. A.; CHAMBI, H. N. M.; BITTANTE, A. M. Q. B.; LOURENÇO, R. V.; SOBRAL, P. J. A. Cellulose fiber reinforced biodegradable films based on proteins extracted from castor bean (*Ricinus communis* L.) cake. **Industrial Crops and Products**, v. 67, p. 355–363, 2015.

PRABU, K.; NATARAJAN, E. Isolation and FTIR spectroscopy characterization of chitin from local sources. **Advances in Applied Science Research**, v. 3, p. 1870–1875, 2012.

ROCHMAN, C. M.; HOH, E.; KUROBE, T.; TEH, S. J. Ingested plastic transfers hazardous chemicals to fish and induces hepatic stress. **Scientific Reports**, v. 3, p. 1–7, 2013.

RYCHTER, P.; BICZAK, R.; HERMAN, B.; SMYTTA, A.; KURCOK, P.; ADAMUS, G.; KOWALCZUK, M. Environmental degradation of polyester blends containing atactic poly(3-hydroxybutyrate). Biodegradation in soil and ecotoxicological impact. **Biomacromolecules**, v. 7, n. 11, p. 3125–3131, 2006.

SALEHPOUR, S.; JONOBI, M.; AHMADZADEH, M.; SIRACUSA, V.; RAFIEIAN, F.; OKSMAN, K. Biodegradation and ecotoxicological impact of cellulose nanocomposites in municipal solid waste composting. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 111, n. 2017, p. 264–270, 2018.

SCHRIJVERS, D. L.; LEROUX, F.; VERNEY, V.; PATEL, M. K. Ex-ante life cycle assessment of polymer nanocomposites using organo-modified layered double hydroxides for potential application in agricultural films. **Green Chemistry**, v. 16, n. 12, p. 4969–4984, 2014.

SILVA, E. E.; AZEVEDO, P. H. S.; DE-POLLI, H. **Determinação da Respiração Basal (RBS) e cociente metabólico do solo (qCO₂)**, Comunicado Técnico 99, EMBRAPA Agrobiologia, p.4, 2007a.

SILVA, E. E.; AZEVEDO, P. H. S.; DE-POLLI, H. **Determinação do Carbono da Biomassa Microbiana do Solo (BMS-C)**, Comunicado Técnico 98, EMBRAPA Agrobiologia, p. 6, 2007b.

STLOUKA, L. P.; PEKAŘOVÁ, S.; KALEDOVA, A.; MATTAUSCH, H.; LASKE, S.; HOLZER, C.; CHITU, L.; BODNER, S.; MAIER, G.; SLOUF, M.; KOUTNY, M. Kinetics and mechanism of the biodegradation of PLA/clay nanocomposites during thermophilic phase of composting process. **Waste Management**, v. 42, p. 31–40, 2015.

SUN, J. X.; SUN, X. F.; ZHAO, H.; SUN, R. C. Isolation and characterization of cellulose from sugarcane bagasse. **Polymer Degradation and Stability**, v. 84, n. 2, p. 331–339, 2004.

TAMANINI, C.; OLIVEIRA, A. S. De; FELIPE, M. D. G. D. A.; CANETTIERI, E. V.; CÂNDIDO, E. D. J.; HAULY, M. C. D. O. Avaliação da casca de aveia para produção biotecnológica de xilitol. **Acta Scientiarum. Technology**, v. 26, n. 2, p. 117–125, 2004.

TAN, Z.; YI, Y.; WANG, H.; ZHOU, W.; YANG, Y.; WANG, C. Physical and degradable properties of mulching films prepared from natural fibers and biodegradable polymers. **Applied Sciences**, v. 6, n. 5, 2016.

TANG, X.; ALAVI, S. Recent advances in starch, polyvinyl alcohol based polymer blends, nanocomposites and their biodegradability. **Carbohydrate Polymers**, v. 85, n. 1, p. 7–16, 2011. .

VAN DE VELDE, K.; KIEKENS, P. Structure analysis and degree of substitution of chitin, chitosan and dibutylchitin by FT-IR spectroscopy and solid state ¹³C NMR. **Carbohydrate Polymers**, v. 58, p. 409–416, 2004.

VANCE, E. D.; BROOKES, P. C.; JENKINSON, D. S. An Extraction Method for Measuring Microbial Biomass C. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 19, n. 6, p. 703–707, 1985.

VERCELHEZE, A. E. S.; OLIVEIRA, A. L. M.; REZENDE, M. I.; MULLER, C. M. O.; YAMASHITA, F.; MALI, S. Physical Properties, Photo- and Bio-degradation of Baked Foams Based on Cassava Starch, Sugarcane Bagasse Fibers and Montmorillonite. **Journal of Polymers and the Environment**, v. 21, n. 1, p. 266–274, 2013.

VRIES, F. T.; HOFFLAND, E.; EEKEREN, N. V.; BRUSSAARD, L.; BLOEM, J. Fungal/bacterial ratios in grasslands with contrasting nitrogen management. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 38, p. 2092–2103, 2006.

WANG, H.; BOUTTON, T. W.; XU, W.; HU, G.; JIANG, P.; BAI, E. Quality of fresh organic matter affects priming of soil organic matter and substrate utilization patterns of microbes. **Scientific Reports**, v. 5, n. March, p. 1–13, 2015.

WATERS, C. N.; ZALASIEWICZ, J.; SUMMERHAYES, C.; BARNOSKY, A. D.; POIRIER, C.; GA, A.; CEARRETA, A.; EDGEWORTH, M.; ELLIS, E. C.; ELLIS, M.; JEANDEL, C.; LEINFELDER, R.; MCNEILL, J. R.; RICHTER, D.; STEFFEN, W.; SYVITSKI, J.; VIDAS, D.; WAGREICH, M.; WILLIAMS, M.; ZHISHENG, A.; GRINEVALD, J.; ODADA, E.; ORESKES, N.; WOLFE, A. P. The Anthropocene is functionally and stratigraphically distinct from the Holocene. **Science**, v. 351, n. 6269, p. aad2622-1-aad2622-10, 2016.

WITTAYA, T. Microcomposites of rice starch film reinforced with microcrystalline cellulose from palm pressed fiber. **International Food Research Journal**, v. 16, n. 4, p. 493–500, 2009.

YANG, S.; MADBOULY, S. A.; SCHRADER, J. A.; SRINIVASAN, G.; GREWELL, D.; MCCABE, K. G.; KESSLER, M. R.; GRAVES, W. R. Characterization and biodegradation behavior of bio-based poly(lactic acid) and soy protein blends for sustainable horticultural applications. **Green Chemistry**, v. 17, n. 1, p. 380–393, 2015.

YE, J.; PEREZ, P. G.; ZHANG, R.; NIELSEN, S.; HUANG, D.; THOMAS, T. Effects of different C/N ratios on bacterial compositions and processes in an organically managed soil. **Biology and Fertility of Soils**, v. 54, n. 1, p. 137–147, 2018.

ZANELA, J.; OLIVATO, J. B.; DIAS, A. P.; GROSSMANN, M. V. E.; YAMASHITA, F. Mixture design applied for the development of films based on starch, polyvinyl alcohol, and glycerol. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 132, n. 43, 2015.

CAPÍTULO 3. TANNIN IMPROVES BIODEGRADABLE THERMOSET MATERIALS PRODUCED BY INJECTION MOLDING

Abstract

The objective was to produce biodegradable thermoset materials (BTM) by injection molding using polylactic acid, starch, sugarcane fiber, nutrients, and tannin as an additive. The BTM can be used to develop biodegradable products in substitution to those based on petroleum feedstock, with potential to achieve positive environmental impacts after its disposal when useful lifetime ends. The influence of tannin as additive of BTM was studied along biodegradation of materials in soil up to 60 days, with overall characterization by scanning electron microscopy (SEM), Fourier Transform–Infrared Spectroscopy (FT-IR), thermogravimetric analyzer (TGA) and X-Rays Diffraction (XRD). The incorporation of tannin increased production yield of injection molding materials by 60%, improved the processability and the mechanical properties of the BTM, and reduced by 10% the biodegradation rate in soil. Colonization of soil microorganisms was decreased in BTM supplemented with 1% tannin, as observed from micrographs. The use of natural polyphenols such as tannin appear a promising advancement to reach higher processivity and useful lifetime for biodegradable composites subjected to contact with substrates of high microbial load, such as pots and buckets used to growth plants.

Keywords: Bio-based materials. Biotechnology. Sustainability. Additive.

1. INTRODUCTION

Thermoset materials (BTM) are polymers in a soft solid or viscous state that changes irreversibly into an infusible, insoluble polymer network by the action of heat or suitable radiation, or both (IUPAC, 2008). Thermoset include bio-based plastics, which according to ASTM-D6866-16 (2016) is defined as materials containing organic carbon from renewable resources obtained from organisms living in natural environments in equilibrium with the atmosphere, like agricultural, plant, animal, fungi, microorganisms, marine, or forestry materials. Due to their excellent biocompatibility and biodegradability, BTM materials have been widely considered for use in agricultural, industrial, and medical applications in substitution to non-renewable fossil sources (LAMBERT; WAGNER, 2017; YANG et al., 2013).

The use of petrochemical plastics is extensive, therefore there is a need to develop new biodegradable materials with compostable characteristics, aiming to improve the chemical and biological soil characteristics. The development of bio-based plastic using polylactic acid (PLA), starch, sugarcane fiber, among others, can

be used for such purpose. PLA has similar properties to polystyrene (PS) and polyethylene terephthalate (PET) and is produced by the polymerization of lactic acid from fermentation (AL-ITRY; LAMNAWAR; MAAZOUZ, 2012). PLA can biodegrade into water, carbon dioxide, and other small molecules (WENG et al., 2013). However, its biodegradation rate is very slow and no weight loss was observed for PLA-based products buried in soil over 42 days (OHKITA; LEE, 2006). Considering this, modification of PLA-based formulations by adding starch and fibers, among other bio-based components, could improve not only the biodegradability of the resulting material, but also helps to reduce the production costs since PLA is still at higher cost than petroleum-based plastics (ZHU; LIU; ZHANG, 2012).

Among the most popular biopolymers used in composition with PLA, starches are found abundant and low cost worldwide. This plant-based polymer harbors two different macromolecules: amylose and amylopectin, whose relative amount of each other varies according to its source and imparts different properties to the starch grain. The materials produced with starch are brittle, highly hygroscopic and are difficult to process (GÁSPÁR et al., 2005; PRABHU; PRASHANTHA, 2016), although the mechanical properties of starch-based materials can be improved by the addition of plasticizers such as glycerol or ethylene glycol (GÁSPÁR et al., 2005). The plasticized starch can be blended to a wide range of other polymers, including biodegradable such as PLA or recalcitrant as PET (MOGHADDAM; RAZAVI; JAHANI, 2018).

The addition of plant fibers to the biodegradable PLA-based materials can both reduce its cost and improve the mechanical properties. The incorporation of tannin into biodegradable materials can influence the physical-chemical and mechanical properties of thermoplastic blends with PLA (LEE et al., 2010). The longer chain esters of tannin can act as plasticizers and enhance PLA (GRIGSBY et al., 2013). The antimicrobial characteristics and UV resistance of tannin can promote longer durability and delay in the biodegradation process (FRANCISCO, 1995), being possible to use lower levels of PLA with cost reduction, since the tannin presents a lower cost compared to PLA and Brazil has representativeness of tannin extraction (TANAC, 2019).

This study presents the development of a BTM using polylactic acid, starch, sugarcane fiber, nutrients, and tannin as additive, as well as its use to produce injection-mold samples. The biodegradation of the materials in soil burial was

evaluated up to 60 days, in addition to its characterization by scanning electron microscopy (SEM), Fourier Transform–Infrared Spectroscopy (FT-IR), thermogravimetric analyzer (TGA) and X-Rays Diffraction (XRD). The effect of the formulations at the different stages of biodegradation on the properties of the materials was determined.

2. MATERIAL AND METHODS

2.1. Materials

Sugarcane bagasse was obtained from Usiban (Bandeirantes-PR, Brazil); cassava starch (amylose 20.8 ± 0.6 wt%; protein 0.28 ± 0.1 wt%; lipids 0.11 ± 0.6 wt%; ash 0.22 ± 0.6 wt%, db) was purchased from Indemil (Paranavaí-PR, Brazil); glycerol (Dinâmica, Brazil), saccharose and skim powdered milk were acquired from local markets (Londrina-PR, Brazil). Other materials included yeast extract from Kasvi (Liofilchen, Italy); Alvorada rock phosphate (basalt powder) acquired from Socal S.A. (Registro - SP, Brazil); tannin from black wattle (*Acacia mearnsii*) from Tanac (Montenegro-RS, Brazil) and REVODE201 poly-(lactic acid) (PLA) (Zhejiang Hisun Biomaterials Co., Ltd, China). According to the manufacturer, PLA REVODE201 has a glass transition temperature of 54-60 °C, a peak melt temperature of 135-150 °C, density (g/cm³) of 1.25 ± 0.05 .

2.2. Extrusion and Injection Molding Conditions

Two biodegradable thermoset materials (BTM) (patent pending, INPI protocol no. BR 1020180072269, Brazil) were produced (with and without tannin, respectively):

BTM-TAN - 35% PLA; 23.2% starch; 20% sugarcane bagasse; 12.4% glycerol; 3.7% yeast extract; 2.5% rock phosphate; 1.5% crystal sugar; 1% tannin and 0.7% skim powdered milk;

BTM-CONT- 35% PLA; 23.7% starch; 20% sugarcane bagasse; 12.9% glycerol; 3.7% yeast extract; 2.5% rock phosphate; 1.5% crystal sugar and 0.7% skim powdered milk.

After manual homogenization of the components, the mixture was extruded in a pilot single screw extruder (BGM, EL-25 model, Brazil) to produce pellets. The

extruder had a screw diameter (D) of 25 mm, screw length (L) of 750 mm (L/D ratio of 30), five heating zones and a matrix with six 2-mm holes, and the barrel temperature profile was set at 90/175/175/165 °C with a screw speed of 35 rpm. The pellets were injected in a lab-scale injection molding machine AX16 III (AX-Plásticos, Brazil), with a temperature profile of 150/175/175 °C from feeder to injection nozzle. The mold was maintained at 50 °C and the material was molded in a dog bone shape (test specimen type 4), according to ASTM D638 (2003).

2.3 Solubility in Water (SW) and Water Absorption Capacity (WAC)

The specimens (3 cm x 1 cm) from both formulations (BTM-TAN and BTM-CONT) were dried (40 °C for 16 h), weighed, immersed in 50 mL of distilled water and placed in an orbital shaker at 200 rpm and 25 °C for 24 h. After this period, the samples were recovered and dried at 105 °C until reaching a constant weight. The SW (%) was calculated according to the following equation and expressed as the mean of five replicates:

$$SW (\%) = \frac{(W_i - W_f)}{W_i} \times 100$$

(1)

where W_i is the initial weight expressed as dry matter and W_f is the weight of the undissolved dry formulations (GONTARD; GUIBERT; CUQ, 1993).

The water absorption capacity (WAC) of the BTM was determined according to the standard ABNT NBR NM ISO 535 (1999), with 3 cm² square specimens. The specimens were soaked in 50 mL of distilled water for 0, 5, 10, 20, 30, 60 and 120 min. At each time, the specimens were collected and reweighed after the removal of excess water with the aid of paper tissue. The amount of adsorbed water was expressed in g of water g⁻¹ of material from the mean of five replicates.

2.4. Mechanical Properties

The tensile strength, Young's modulus and elongation at break were analyzed according to ASTM D638-03 method (2003) with few modifications, using a

universal testing machine (model DL2000, EMIC, Brazil) with an initial distance between grips of 60 mm, a crosshead speed of 50 mm s⁻¹ and a load cell of 50 N. Five specimens from each formulation were conditioned in a desiccator with controlled relative humidity and temperature (53 ± 2 % and 25 ± 2 °C respectively) for ten days before analysis.

2.5. Biodegradation Trial

The biodegradability of the specimens from each formulation was determined in specimens buried for 30 and 60 days in a commercial substrate (Biomix, Cotia, Brazil) used to produce forest seedlings (pH 7.3; H+Al 2.03 cmolc/dm³; K 1.14 cmolc/dm³; Ca 9.46 cmolc/dm³; Mg 3.41 cmolc/dm³; Al 0.03 cmolc/dm³; base saturation 87.21%; P 57.90 mg/kg and organic matter 7.11%), under controlled conditions of temperature (28 ± 1 °C) and humidity (50%). The specimens were placed in a non-degradable mesh bag (4 x 15 cm, pre-weighed) and set at 3 cm-depth from the surface, in a fully randomized experimental design with five replicates.

After 30 or 60 days buried, the samples were removed from the plastic bags, cleaned with the aid of tissue paper, dried at 60 ± 2 °C for 4 h and held for 24 hours at the same environmental conditions used to record the initial weights. Before reweighing the samples, the remaining substrate residues were removed with the aid of a soft brush. The weight loss was expressed as a percentage (Wloss%) calculate by the following equation:

$$W_{loss\%} = \frac{(W_0 - W_1)}{W_0} \times 100$$

(2)

where W₀ is the initial sample weight (before the biodegradation starts) and W₁ is the biodegraded sample weight for each sampling time.

The specimens were analyzed by SEM, FT-IR, TGA and DRX after 0, 30 and 60 days of immersion in a commercial substrate.

2.6. Scanning Electron Microscopy (SEM)

Specimens were cut in 1 cm² square, fixed in 3% glutaraldehyde in PBS solution, pH 7.2 for 24 h, following a wash in the same buffer and dehydration in a graded series of ethanol solutions (70%, 80%, 90% and 100% ethanol in distilled water, 15 min immersion each solution). Dehydrated samples were subjected to critical-point dry with carbon dioxide and coating with a thin gold layer using a sputter-coater (Bal-Tec Sputter Coater SDC 050, Scotia, NY, USA). Samples were observed using an FEI Quanta 200 field emission scanning electron microscope (FE-SEM) at 10.00 kV under high vacuum. The fracture and surface of the specimens were analyzed.

2.7. Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR)

Spectroscopic studies of the BTM were investigated by FTIR spectrometer (IRPrestige 21, Shimadzu, Japan). The specimens were dried, milled, and compressed into tablets with potassium bromide, analyzed with a spectral resolution of the instrument of 1 cm⁻¹ and a spectral range of 4000–500 cm⁻¹.

2.8. Thermogravimetric Analysis (TGA)

The thermal stability of the BTM was investigated with a thermogravimetric analyzer (TGA) (PerkinElmer-TGA 4000). The specimens with masses between 10-20 mg were heated from 30 to 800 °C at 20 °C/min under a nitrogen flow of 20 mL/min.

2.9. X-Ray Diffraction (XRD)

The crystallinity of each BTM was determined using X-ray diffraction (XRD) technique. The specimens were analyzed by PANalytical X'Pert PRO MPD diffractometer (Netherlands) with copper K α radiation (λ = 1.5418 Å) under the operational conditions of 40 kV, 30mA and θ -2 θ of Bragg Brentan geometry. The 2 θ scanning interval used was 2 to 60 ° with an angular step of 0.05 ° and a count time per point of 1.0 s.

2.10. Statistical Analysis

Analyses of variance (ANOVA) and Tukey's mean comparison test ($p < 0.05$) were performed with Statistica software version 10.0 (Statsoft, OK, USA).

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1. Solubility in Water (SW) and Water Absorption Capacity (WAC)

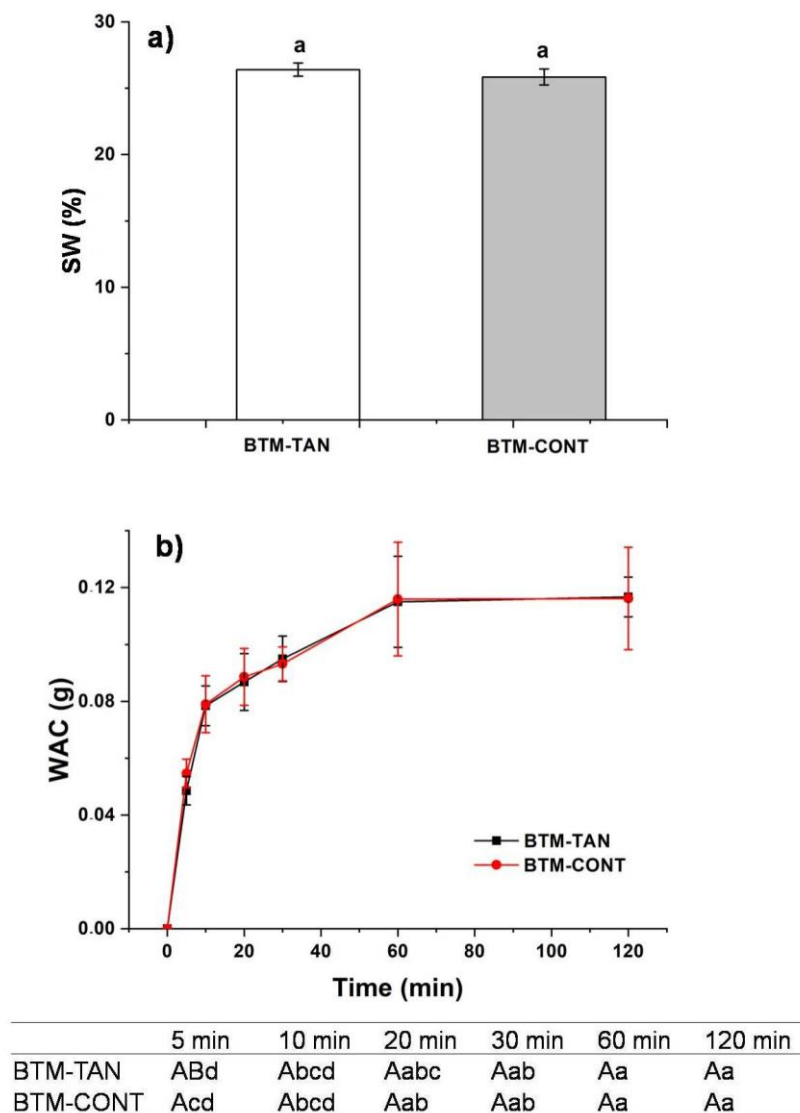
The addition of tannin in BTM formulations have not significantly influenced the solubility in water (SW) or the water absorption capacity of injection-mold specimen, as observed in Figure 1. Water solubility of BTM containing tannin (BTM-TAN) showed a mean value of 26.4% while the BTM without tannin (BTM-CONT) had mean solubility value of 25.8% (Figure 1a). All the specimens presented structural integrity at the end of SW determination, with no apparent separation between the constituents of the matrix. The similarity of SW values for BTM-TAN and BTM-CON formulations suggests that only the low mass molecules (peptides, plasticizer and saccharides) found in similar amounts in both formulations were solubilized (WITTAYA, 2009).

The WAC results (Figure 1b) reinforce the similarities between the behavior of BTM-TAN and BTM-CON materials related to their interaction with water. Both samples were found water-saturated after 60 min immersion, with the maximum value of WAC reaching up to 10% for BTM-TAN samples and up to 12% for BTM-CON samples after 120 minutes of immersion in water. The low water absorption may be related to the homogeneous dispersion of composition materials in addition to its compression by the injection-mold process, resulting in no visible agglomerates that are common in composite materials containing plant fibers.

Considering materials developed to support biological activity, such as biodegradable composites, the SW and WAC characteristics of materials denotes great importance to allow proper microbial colonization, growth and enzymatic activity (KARAMANLIOGLU; PREZIOSI; ROBSON, 2017). In addition, according to the intended application of biodegradable materials, the SW and WAC characteristics can result in additional advantages when compared to conventional petrochemical plastics. For instance, biodegradable materials with slow solubilization activity for

minerals and salts can be designed to deliver nutrients for plants when shaped as pot or containers, and provide higher hydric status for plants.

Figure 1 Effect of tannin on (a) the solubility in water (SW) and (b) water absorption capacity (WAC) of different biodegradable thermoset materials (BTM) prepared with PLA, cassava starch, crystal sugar, powdered skin milk, yeast extract and rock phosphate. BTM-TAN, BTM with tannin and BTM-CONT, BTM without tannin.



Different capital letters indicate statistically significant differences between composite materials while different small letters indicate statistically significant differences between sampling times, according to Tukey's test ($p < 0.05$).

3.2. Biodegradable Thermoset Materials (BTM) Production and Mechanical Properties

The amount of tannin in the final formulation was determined after preliminary tests (data not shown) using different tannin concentrations (0.5, 1.0, 1.5 and 3%) to produce injection-mold test specimen samples type 4 (bone-shape). We found that tannin concentration of 1% was the most efficient in injection-mold processing, while concentrations above this value results in samples without full mold filling and difficult to injection process. According to the results shown in Table 1, is clear that the supplementation of composite formulations with 1% of tannin (BTM-TAN) improved the mechanical properties of final specimens samples, which showed higher tensile strength (40%) and Young's modulus (10.6%) than those produced without tannin (BTM-CONT). The production yield (considered as the sample specimens produced without apparent visual defects) was also increased in up to 60% for the BTM-TAN when compared to BTM-CONT specimen samples . The effect of tannin in composite formulations is thought to function as a plasticizer and a material reinforcer, due to its long chain esters that tightly interact with other formulation compounds to acts as an adhesive stabilizing the blend (GRIGSBY et al., 2013; GRIGSBY; KADLA, 2014; RHAZI et al., 2017; PEÑA et al., 2010).

Table 1. Mechanical properties of the biodegradable thermoset materials (BTM) produced with composite formulations supplemented (BTM-TAN) or not (BTM-CONT) with 1% tannin.

Formulation	σ (MPa)	ε (%)	Y.M. (MPa)
BTM-TAN	2.92 ± 0.23^A	9.68 ± 0.47^A	82.10 ± 3.85^A
BTM-CONT	2.08 ± 0.05^B	9.11 ± 0.21^A	74.20 ± 8.60^B

Mean (n= 5), $\pm$ standard deviation σ : tensile strength; ε : elongation; YM: Young's modulus. Means followed by the same letter in each column are not significantly different ($p < 0.05$).

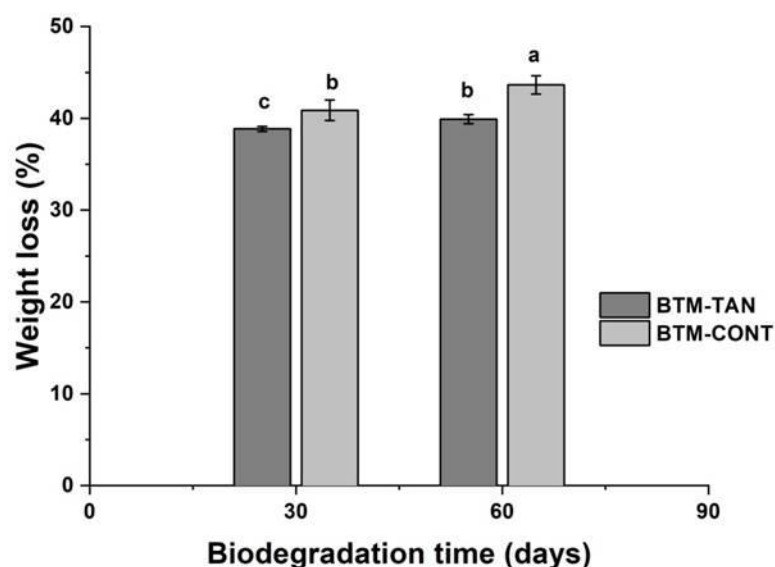
3.3. Biodegradation Trial

The weight losses of the buried BTM due to the biodegradation are presented in Figure 2, and photographs of the specimens before and after biodegradation time are shown in Figure 3. BTM-TAN materials had slower biodegradation rate than BTM-CONT materials, with a mean weight loss of 39% for

the former as compared to the BTM-CONT materials which had a mean weight loss of 44% after 60 days (Figure 2). It is noteworthy that the BTM-TAN reduced by half the biodegradation rate of injection-mold materials, reaching weight loss values ($p \leq 0.05$) similar to BTM-CONT at 30 days of biodegradation after 60 days buried in the soil substrate. The tannin is known as part of plants natural defense againsts microbial pathogens, and its antimicrobial properties may be related to the observed reduced biodegradation rate of BTM-TAN materials, even at only 1% concentration in the formulation (CHUNG et al., 1998; GE et al., 2003).

As observed in Figure 2, the BTM biodegradation was more intense at the first 30 days for both formulations, while BTM-TAN showed a lower weight loss in this period when compared to BTM-CON indicating that supplementation of 1% tannin on formulation have reduced the biodegradation rate of injection-mold specimens in soil. The increased weight loss of BTM in the first month indicates that soluble compounds used in BTM formulations could be promptly released, according to SW analysis the amount of soluble and easily metabolized compounds (starch, glycerol, yeast extract, crystal sugar and skimpowder milk) that together depict around 40% of dry weight in both formulations.

Figure 2. Weight-loss (as percentage %) of injection-mold biodegradable thermoset materials (BTM) produced with (BTM-TAN) and without tannin (BTM-CONT), after buried for 30 and 60 days in commercial soil substrate recommended for seedlings growth.



The presence of soluble and easily metabolized compounds on BTM was recently demonstrated to stimulate the soil microbiota involved on biodegradation (MOREIRA et al. 2018), and the use of 1% tannin appears to somehow interfere on the activity of such microbiota, delaying the biodegradation of injection-mold BTM specimens. The extent of this interference must be further addressed to better understand the role of tannin on microbial activity over composite formulations based on biodegradable materials.

Figure 3. Photographic images of biodegradable thermoset materials (BTM) produced with (BTM-TAN) and without tannin (BTM-CONT) in the formulation before (a) and after 30 (b) or 60 days (c) subjected to biodegradation in a commercial soil substrate recommended for seedlings growth.



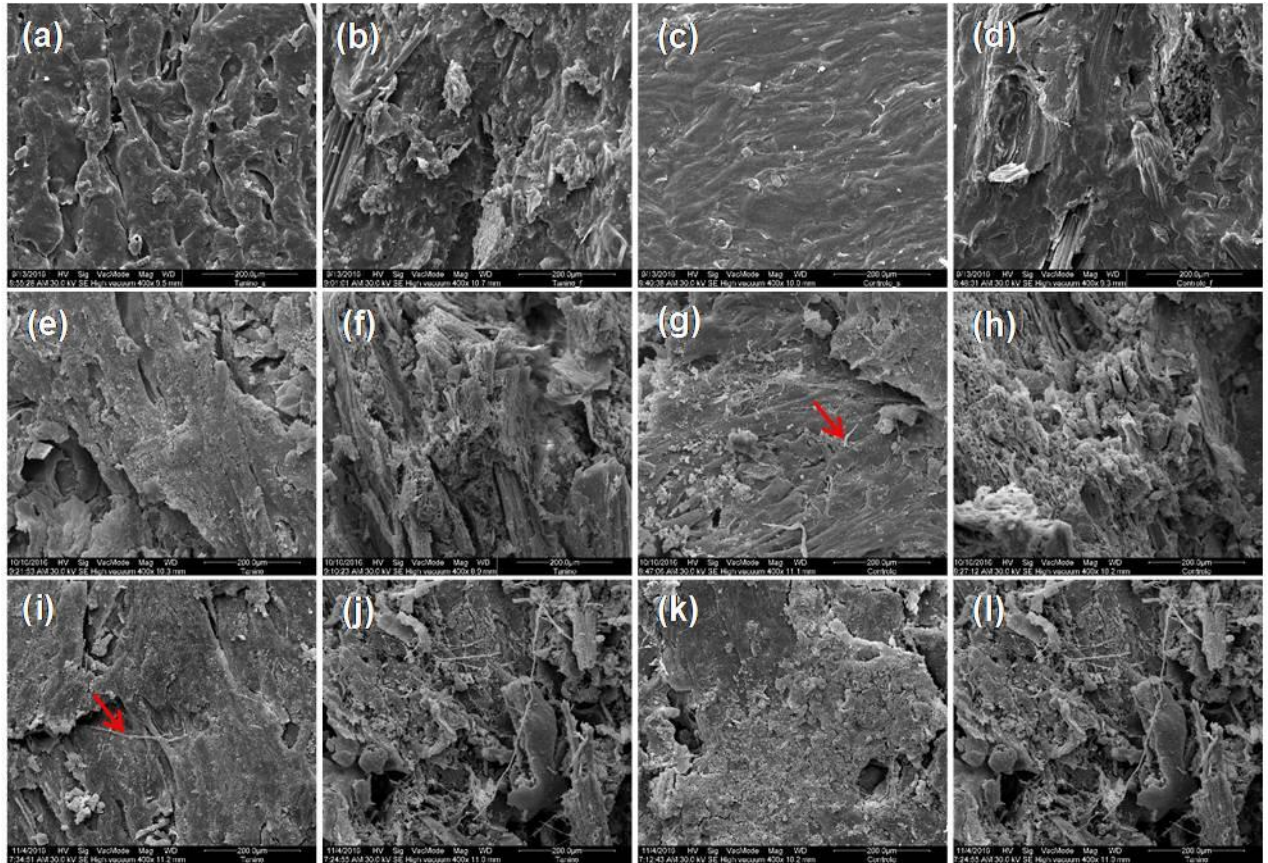
The visual appearance of the BTM specimens shown in Figure 3 indicates that the biodegradation along 60 days in a soil substrate did not result in drastic changes of external specimens appearance, although the rigidity decreased significantly. This indicates that biodegradation take place from inside to outside, in agreement of weight loss results and supporting the finding that soluble and metabolizable compounds were firstly biodegraded and structural and less-easily metabolizable compounds (PLA, sugarcane bagasse and rock phosphate) remained structured on specimens for longer periods of time. PLA is a polymer of slow biodegradation; it can take several years for its complete biodegradation in the soil (OHKITA; LEE, 2006; YANG et al., 2015). As the BTM is intended to substitute synthetic plastic materials, for example in agricultural applications, the materials cannot quickly biodegrade, and the supplementation of tannin at 1% showed potential to delay the biodegradation process. Compared to the increase in the PLA content that could also result in longer biodegradation rates, the use of tannin allows the reduction of formulation cost in addition to improve the processivity characteristics of BTM materials.

3.4. Microstructure of the Materials

The microstructure of the biodegradable thermoset materials was observed by scanning electron microscopy (SEM) (Figure 4). The micrographs of the surface and fracture of the BTM specimens before the biodegradation presented a homogeneous appearance, demonstrating that the components of the blends were compatible and equally dispersed. The surface of the BTM-TAN specimens (Figure 4a) was rougher than BTM-CONT (Figure 4c).

In the fracture images, fibers in the BTM-CONT (Figure 4d) are more discernible compared to BTM-TAN (Figure 4b) due to the action of the tannin as compatibilizer and plasticizer, as previously discussed, modifying the material morphology. In Figure 4e–4l it is possible to observe the modification on the morphology of the BTM caused by the biodegradation. After 30 days, the BTM-CONT presented higher modifications, with the presence of filamentous fungi on the surface (Figure 4g) and internal structure (fracture) with higher porosity (Figure 4h), and in BTM-TAN it was only possible to visualize the fungal activity on the surface and internally after 60 days of biodegradation (Figure 4i and 4j).

Figure 4. SEM micrographs morphology of the biodegradable thermoset materials (BTM), BTM with tannin (BTM-TAN) and BTM without tannin (BTM-CONT), before and after the biodegradation in commercial substrate for seedlings production.



BTM-TAN (a) surface and (b) fracture; BTM-CONT (c) surface and (d) fracture. After 30 days of biodegradation BTM-TAN (e) surface and (f) fracture; BTM-CONT (g) surface and (h) fracture. After 60 days of biodegradation BTM-TAN (i) surface and (j) fracture; BTM-CONT (k) surface and (l) fracture. Arrows indicate fungal hyphae (g and i).

3.5. Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR)

The FT-IR spectra (Figure 5) of the biodegradable thermoset materials (BTM-TAN and BTM-CONT) before being submitted to biodegradation are very similar because the components of the blend have similar functional groups.

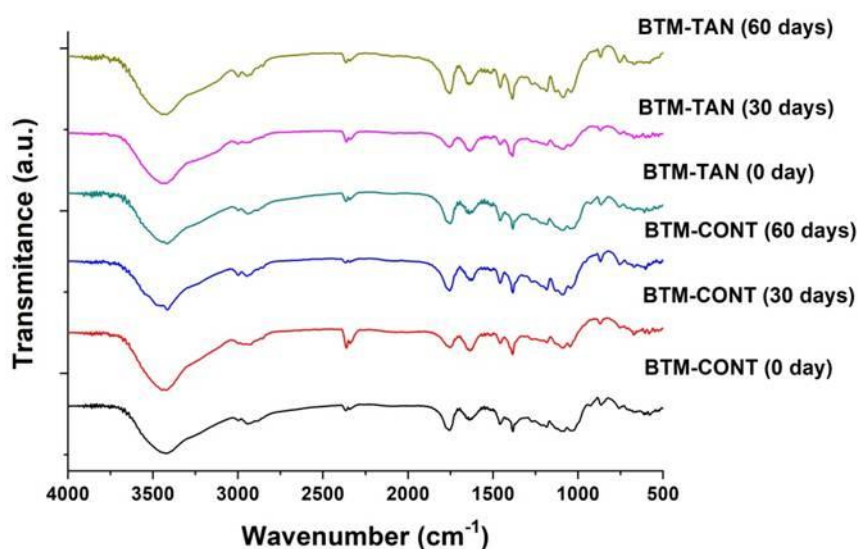
All formulations presented the main characteristic bands of starch, which are the large band between $3720\text{--}3004\text{ cm}^{-1}$ assigned to the hydrogen bond between OH, in 2922 cm^{-1} correspond to axial and angular deformation of CH_2 .

The peak at 1760 cm^{-1} is attributed to the carbonyl C=O stretching of PLA (HERRERA et al., 2017). However, it may also be related to the hemicellulose and lignin, present in the sugarcane bagasse (ARDANUY; ANTUNES; VELASCO, 2012).

The peak at 1650 cm^{-1} is associated with the angular bending of water molecules that are bound to polysaccharides (ŁOJEWSKA et al., 2005). Peaks between $1029\text{--}1162\text{ cm}^{-1}$ are associated with the O-C elongation of the anhydroglucose ring and at approximately 1157 cm^{-1} to C-O elongation (GALDEANO et al., 2009).

Bands at 1430 and 850 cm^{-1} were attributed to C-O-C stretching vibrations of the characteristic β (1 $\rightarrow$ 4) glucosidic bond, these bands can also be attributed to cellulose (CIOLACU; CIOLACU; POPA, 2011; IBRAHIM; AGBLEVOR; EL-ZAWAWY, 2010).

Figure 5. FT-IR spectra of biodegradable thermoset materials (BTM), BTM with tannin (BTM-TAN) and BTM without tannin (BTM-CONT), before and after biodegradation in commercial substrate for seedlings production.



After 30 days of biodegradation the intensity of the band at 1760 cm^{-1} decreased, and after 60 days these bands increased. The changes of this band over time are related to the degradation of the materials. Ester linkage may have undergone hydrolysis, randomly along the backbone of the polymer in the presence of water (AL-ITRY; LAMNAWAR; MAAZOUZ, 2012), and after 60 days of biodegradation the intensity increase in the 1760 cm^{-1} band may be related to the increase in the final carboxyl groups attributed to hydrolytic degradation (FORTUNATI et al., 2012). Kijchavengkul et al. (2010) studied the degradation of PLA materials in atmospheric conditions and soil and reported an increase of the band at 1760 cm^{-1} ; the left shoulder indicates the formation of free C=O, and the right shoulder

represents the formation of an ester of lower molecular weight. These molecules of lower molecular weight according to Stloukal et al. (2015) could be more easily assimilated by microorganisms and ultimately mineralized to end-products such as CO₂, H₂O, and biomass during the biodegradation.

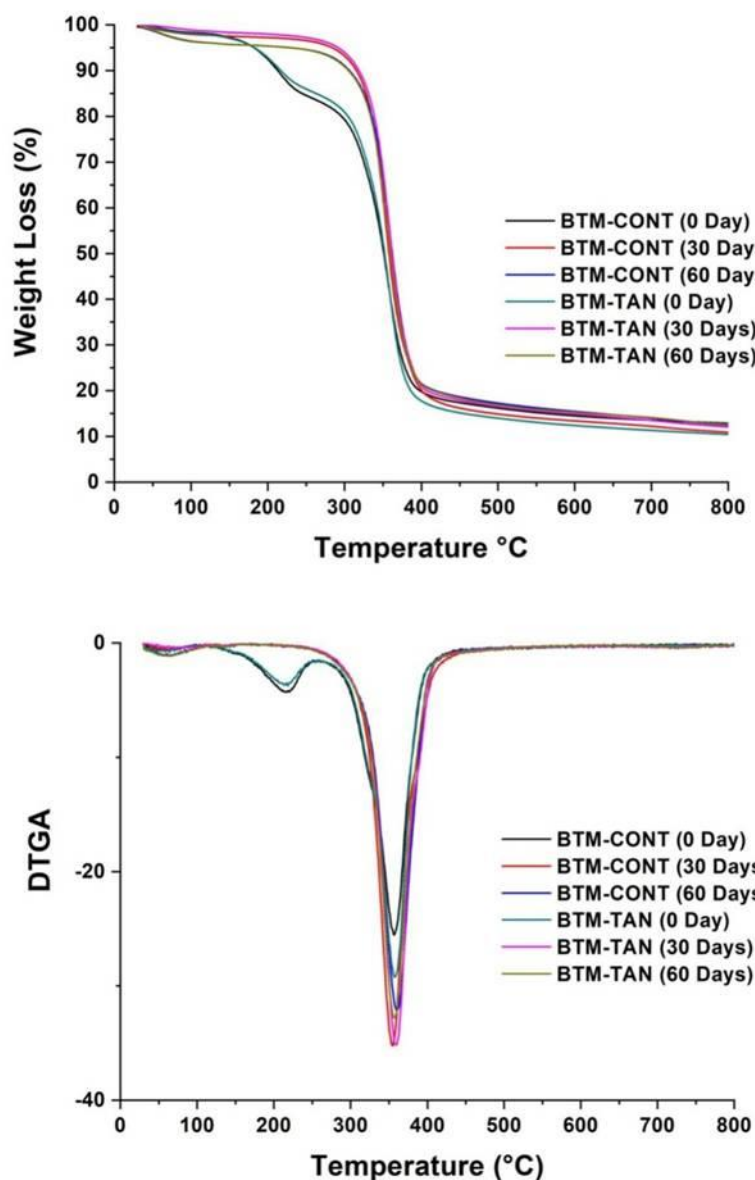
The bands related to the amide grouping during the biodegradation for both BTM showed changes in 1328 cm⁻¹ (C-N stretching in secondary amide, Amide III) and 1437 cm⁻¹ (Amide III). Similarly, bands attributed to carbohydrates showed changes at 1029-1162 cm⁻¹ related to O-C elongation of the anhydroglucose ring, at 1157 cm⁻¹ related to C-O elongation, and at 850 cm⁻¹ related to C-O-C stretching vibrations of the characteristic β (1-4) glucosidic bond. These bands decreased after 30 days of biodegradation, probably due to the microbial consumption of the soluble proteins and sugars present in the nutrients of the formulations, which were available more immediately to the microorganisms. After 60 days of biodegradation, there was an increase in intensity, indicative of microbial activity and increase of sugars obtained by the breakdown of polysaccharides present in the samples by the microorganisms as the biodegradation advanced.

3.6. Thermogravimetric Analysis (TGA) and X-Ray Diffraction (XRD)

The TGA results for biodegradable thermoset materials (BTM) before and after biodegradation are illustrated in Figure 6, and the behavior of both BTM-TAN and BTM-CONT were similar, indicating that the addition of tannin did not influence the thermal characteristics of the BTM. The initial thermal degradation occurred up to 100 °C for all samples. The observed weight loss of the compounds was between 2-5%, which is related to water loss and evaporation of volatile compounds.

The BTM that were not submitted to the biodegradation process the thermal degradation occurred in two steps, the first step at 240 °C with weight loss around 15% and the second at 357 °C with a weight loss of about 80%. Meanwhile, for the materials submitted to the biodegradation process for 30 and 60 days, it was observed only one step at 360 °C and at 358 °C, respectively, with weight loss around 85%. At these temperatures, probably, occurred the carbon burning of the components in the formulation, such as sugarcane fiber, with the decomposition of starch and PLA polymer chain (LIU et al., 2010; PETINAKIS et al., 2010).

Figure 6. Thermogravimetric analysis for biodegradable thermoset materials (BTM), BTM with tannin (BTM-TAN) and BTM without tannin (BTM-CONT), before and after biodegradation in commercial substrate for seedlings production.

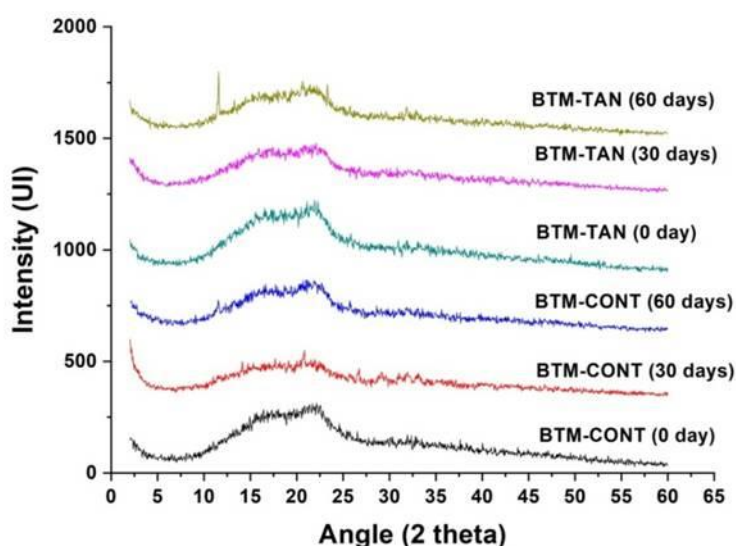


The non-biodegraded materials showed more intense thermal degradation than the biodegrade ones at the initial weight loss because of the low molecular weight components present in the formulations such as proteins and polysaccharides that were consumed by the soil microbiota. According to Colussi et al., (2014) and Oliveira et al. (2014) low molecular weight compounds are more susceptible to thermal degradation.

The BTM from different periods of biodegradation showed very similar profiles (Figure 6), and according to DTGA curve, the maximum degradation temperatures (T_{max}) ranged from 354 to 360°C. This range can be considered small demonstrating that the biodegradation process, as well as the tannin, did not influence the thermal stability of the materials. The residual mass at 800 °C was between 10–13% for all materials, this mass is related to the ashes.

According to the XRD analyzes (Figure 7) the characteristics of the two materials (BTM-TAN and BTM-CONT) as well as the biodegraded ones are very similar and are predominantly amorphous.

Figure 7. X-ray diffractograms for composites with and without tannin before and after biodegradation in soil (0, 30 and 60 days).



4. Conclusions

The biodegradable thermoset materials (BTM) produced by injection molding area sustainable alternative for the substitution of conventional plastic materials used in agriculture like seedling pots. The BTM containing tannin had better production yield and mechanical properties and lower degradation rate than those without tannin; thus the tannin is a promising additive for biodegradable materials produced by injection molding.

References

- ABNT—Associação Brasileira de Normas Técnicas. Papel e Cartão. Determinação da capacidade de absorção de água. Método de Cobb. **Associação Brasileira de Normas Técnicas**, 1999, Rio de Janeiro.
- AL-ITRY, R.; LAMNAWAR, K.; MAAZOUZ, 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**, v. 97, n. 10, p. 1898–1914, 2012.
- ARDANUY, M.; ANTUNES, M.; VELASCO, J. I. Vegetable fibres from agricultural residues as thermo-mechanical reinforcement in recycled polypropylene-based green foams. **Waste Management**, v. 32, n. 2, p. 256–263, 2012.
- ASTM. ASTM standard test method for tensile properties of plastics, ASTM D638-03; 2003.
- ASTM-D6866-16, <https://www.astm.org/Standards/D6866.htm>, 2016.
- CHUNG, K. T.; WONG, T. Y.; WEI, C. I.; HUANG, Y. W.; LIN, Y. Tannins and human health: A review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 38, n. 6, p. 421–464, 1998.
- CIOLACU, D.; CIOLACU, F.; POPA, V. Amorphous cellulose—structure and characterization. **Cellulose chemistry and**, v. 45, p. 13–21, 2011.
- COLUSSI, R.; PINTO, V. Z.; EL HALAL, S. L. M.; VANIER, N. L.; VILLANOVA, F. A.; MARQUES E SILVA, R.; DA ROSA ZAVAREZE, E.; DIAS, A. R. G. Structural, morphological, and physicochemical properties of acetylated high-, medium-, and low-amylose rice starches. **Carbohydrate Polymers**, v. 103, n. 1, p. 405–413, 2014.
- FORTUNATE, E.; PUGLIA, D.; SANTULLI, C.; SARASINI, F.; KENNY, J. M. Biodegradation of phormium tenax/Poly (lactic acid) composites. **Journal of Applied Polymer Science**, Vol. 000, 000–000, 2012.
- FRANCISCO, A. The Flavonoids: Advances in Research Since 1986 (Harborne, J. B.). **Journal of Chemical Education**, v. 72, n. 3, p. A73, 1995.
- GALDEANO, M. C.; MALI, S.; GROSSMANN, M. V. E.; YAMASHITA, F.; GARCÍA, M. A. Effects of plasticizers on the properties of oat starch films. **Materials Science and Engineering C**, v. 29, n. 2, p. 532–538, 2009.
- GÁSPÁR, M.; BENKO, Z.; DOGOSSY, G.; RÉCZEY, K.; CZIGÁNY, T. Reducing water absorption in compostable starch-based plastics. **Polymer Degradation and Stability**, v. 90, n. 3, p. 563–569, 2005.

GE, J.; SHI, X.; CAI, M.; WU, R.; WANG, M. A novel biodegradable antimicrobial PU foam from wattle tannin. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 90, n. 10, p. 2756–2763, 2003.

GONTARD, N.; GUILBERT, S.; CUQ, J. -L. Water and Glycerol as Plasticizers Affect Mechanical and Water Vapor Barrier Properties of an Edible Wheat Gluten Film. **Journal of Food Science**, v. 58, n. 1, p. 206–211, 1993.

GRIGSBY, W. J.; BRIDSON, J. H.; LOMAS, C.; ELLIOT, J. A. Esterification of condensed tannins and their impact on the properties of poly(lactic acid). **Polymers**, v. 5, n. 2, p. 344–360, 2013.

GRIGSBY, W. J.; KADLA, J. F. Evaluating poly (lactic acid) fiber reinforcement with modified tannins. **Macromolecular Materials and Engineering**, v. 299, n. 3, p. 368–378, 2014.

HERRERA, N.; SINGH, A. A.; SALABERRIA, A. M.; LABIDI, J.; MATHEW, A. P.; OKSMAN, K. Triethyl citrate (TEC) as a dispersing aid in polylactic acid/chitin nanocomposites prepared via liquid-assisted extrusion. **Polymers**, v. 9, n. 9, 2017.

IBRAHIM, M. M.; AGBLEVOR, F. A.; EL-ZAWAWY, W. K. Isolation and characterization of cellulose and lignin from steam-exploded lignocellulosic biomass. **BioResources**, v. 5, n. 1, p. 397–418, 2010.

ISHIZAKI, M. H.; VISCONTE, L. L. Y.; FURTADO, C. R. G.; LEITE, M. C. A. M.; LEBLANC, J. L. Caracterização mecânica e morfológica de compósitos de polipropileno e fibras de coco verde: influência do teor de fibra e das condições de mistura. **Polímeros**, v. 16, n. 3, p. 182–186, 2006.

JONES, D. L.; KIELLAND, K. Amino acid, peptide and protein mineralization dynamics in a taiga forest soil. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 55, n. 3, p. 60–69, 2012.

KARAMANLIOGLU, M.; PREZIOSI, R.; ROBSON, G. D. Abiotic and biotic environmental degradation of the bioplastic polymer poly(lactic acid): A review. **Polymer Degradation and Stability**, v. 137, p. 122–130, 2017.

KIJCHAVENGKUL, T.; AURAS, R.; RUBINO, M.; ALVARADO, E.; CAMACHO MONTERO, J. R.; ROSALES, J. M. Atmospheric and soil degradation of aliphatic-aromatic polyester films. **Polymer Degradation and Stability**, v. 95, n. 2, p. 99–107, 2010.

LAMBERT, S.; WAGNER, M. Environmental performance of bio-based and biodegradable plastics: the road ahead. **Chemical Society Reviews**, v. 46, n. 22, p. 6855–6871, 2017.

LEE, S. C.; HAN, J. II; JEONG, Y. G.; KWON, M. Strain-induced enthalpy relaxation in Poly(lactic acid). **Macromolecules**, v. 43, n. 1, p. 25–28, 2010.

LIU, X.; YU, L.; XIE, F.; LI, M.; CHEN, L.; LI, X. Kinetics and mechanism of thermal decomposition of cornstarches with different amylose/amylopectin ratios. **Starch/Staerke**, v. 62, n. 3–4, p. 139–146, 2010.

ŁOJEWSKA, J.; MIŚKOWIEC, P.; ŁOJEWSKI, T.; PRONIEWICZ, L. M. Cellulose oxidative and hydrolytic degradation: In situ FTIR approach. **Polymer Degradation and Stability**, v. 88, n. 3, p. 512–520, 2005.

MOGHADDAM, M. R. A.; RAZAVI, S. M. A.; JAHANI, Y. Effects of Compatibilizer and Thermoplastic Starch (TPS) Concentration on Morphological, Rheological, Tensile, Thermal and Moisture Sorption Properties of Plasticized Polylactic Acid/TPS Blends. **Journal of Polymers and the Environment**, v. 0, p. 1–14, 2018.

OHKITA, T.; LEE, S. H. Thermal degradation and biodegradability of poly (lactic acid)/corn starch biocomposites. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 100, n. 4, p. 3009–3017, 2006.

OLIVEIRA, C. S.; ANDRADE, M. M. P.; COLMAN, T. A. D.; DA COSTA, F. J. O. G.; SCHNITZLER, E. Thermal, structural and rheological behaviour of native and modified waxy corn starch with hydrochloric acid at different temperatures. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 115, n. 1, p. 13–18, 2014.

PELTOLA, H.; PÄÄKKÖNEN, E.; JETSU, P.; HEINEMANN, S. Wood based PLA and PP composites: Effect of fibre type and matrix polymer on fibre morphology, dispersion and composite properties. **Composites Part A: Applied Science and Manufacturing**, v. 61, p. 13–22, 2014.

PEÑA, C.; DE LA CABA, K.; ECEIZA, A.; RUSECKAITE, R.; MONDRAGON, I. Enhancing water repellence and mechanical properties of gelatin films by tannin addition. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 17, p. 6836–6842, 2010.

PETINAKIS, E.; LIU, X.; YU, L.; WAY, C.; SANGWAN, P.; DEAN, K.; BATEMAN, S.; EDWARD, G. Biodegradation and thermal decomposition of poly(lactic acid)-based materials reinforced by hydrophilic fillers. **Polymer Degradation and Stability**, v. 95, n. 9, p. 1704–1707, 2010.

PRABHU, T. N.; PRASHANTHA, K. A review on present status and future challenges of starch based polymer films and their composites in food packaging applications. **Polymer Composites**, v. 39, n. 7, p. 1–24, 2016.

RHAZI, N.; OUMAM, M.; SESBOU, A.; HANNACHE, H.; CHARRIER-EL BOUHTOURY, F. Physico-mechanical properties of plywood bonded with ecological adhesives from *Acacia mollissima* tannins and lignosulfonates. **The European Physical Journal Applied Physics**, v. 78, n. 3, p. 34813, 2017.

STLOUKAL, P.; PEKAŘOVÁ, S.; KALEDOVA, A.; MATTAUSCH, H.; LASKE, S.; HOLZER, C.; CHITU, L.; BODNER, S.; MAIER, G.; SLOUF, M.; KOUTNY, M. Kinetics and mechanism of the biodegradation of PLA/clay nanocomposites during thermophilic phase of composting process. **Waste Management**, v. 42, p. 31–40, 2015.

TANAC. Produtora de extratos vegetais e cavacos de acácia negra. 2019. Disponível em: < <http://www.tanac.com.br/>>.

IUPAC. Compendium of polymer terminology and nomenclature. **IUPAC recommendations**, 2008.

WENG, Y. X.; JIN, Y. J.; MENG, Q. Y.; WANG, L.; ZHANG, M.; WANG, Y. Z. Biodegradation behavior of poly(butylene adipate-co-terephthalate) (PBAT), poly(lactic acid) (PLA), and their blend under soil conditions. **Polymer Testing**, v. 32, n. 5, p. 918–926, 2013.

WITTAYA, T. Microcomposites of rice starch film reinforced with microcrystalline cellulose from palm pressed fiber. **International Food Research Journal**, v. 16, n. 4, p. 493–500, 2009.

YANG, D.; TIAN, M.; DONG, Y.; KANG, H.; GONG, D.; ZHANG, L. A high-performance dielectric elastomer consisting of bio-based polyester elastomer and titanium dioxide powder. **Journal of Applied Physics**, v. 114, n. 15, 2013.

YANG, S.; MADBOULY, S. A.; SCHRADER, J. A.; SRINIVASAN, G.; GREWELL, D.; MCCABE, K. G.; KESSLER, M. R.; GRAVES, W. R. Characterization and biodegradation behavior of bio-based poly(lactic acid) and soy protein blends for sustainable horticultural applications. **Green Chemistry**, v. 17, n. 1, p. 380–393, 2015.

ZHU, R.; LIU, H.; ZHANG, J. Compatibilizing effects of maleated poly(lactic acid) (PLA) on properties of PLA/soy protein composites. **Industrial and Engineering Chemistry Research**, v. 51, n. 22, p. 7786–7792, 2012.

CAPÍTULO 4. BIODEGRADABLE PLASTIC MATERIAL DESIGNED TO IMMOBILIZE PLANT GROWTH-PROMOTING BACTERIA IMPROVES SOIL QUALITY AND GROWTH OF TOMATO SEEDLINGS

Abstract

Based on a previous study, biodegradable material composites suitable to support immobilized PGPB bacteria were designed to produce containers for plant propagation through injection-mold process, which were further evaluated for its effect on soil microbiological and chemical parameters, as well as its performance when used to growth tomato seedlings. The *Azospirillum brasilense* Ab-V5 was used as model PGPB to evaluate different immobilization procedures of bacterial cells on the biodegradable containers (bio-pots), targeting an initial concentration of 10^9 cells cm^2 of injected-mold material. Sequential immersion of bio-pots in two different solutions (starch-xanthan gum based followed by a gelatin-starch based) was found the best strategy to immobilize Ab-V5 cells, leading high density and viability up to 56 days of storage at high population density. In addition, immobilized cells were fast and easily released from the bio-pots when immersed in water or buried in sand, even suggesting the conversion of nutritional compounds released from the bio-pots into bacterial biomass. Biodegradation study of injected-mold material demonstrated a half-life of 120 days in soil, while the incorporation of tannin in formulation delayed the biodegradation in about 30 days. Analysis of soil microbiological parameters indicates a stimulus of microbial population and activity in response to the addition of biodegradable materials, with a lower effect in soils where tannin-containing formulation was added. On the other hand, the chemical analysis of soils where biodegradation took place demonstrated that the mineralization of injected-mold material improved the soil nutritional quality, with increased values of pH, K, Ca and P for up to 180 days as compared to the soil where no material was introduced. The bio-pots proved efficient in support the growth of tomato seedlings, while bacterized bio-pots produced seedlings of superior development than bio-pots without immobilized PGPB. The materials and the processes described in the present study demonstrate the huge potential in combining the design of biodegradable materials with the biotechnological application of soil microbial diversity, moving towards the sustainability of agriculture.

Keywords: Plant propagation, polymer coating, beneficial bacteria, soil microbiota, biological input for agriculture, inoculant, sustainability.

1. INTRODUCTION

The differential influence of biodegradable materials over the composition and activity of soil microbiota, according to the composite mixtures employed on its production, indicates that plant growth-promoting bacteria (PGPB) can have increased its efficacy when carried in a well-designed material formulation.

PGPB are important for agriculture because of the possibility of reducing harmful chemical fertilizers to the environment (HERRMANN, LESUEUR, 2013). PGPB are associated to different plant species in natural environments, and its main characteristic is to favor the development of the plant through mechanisms such as: biological nitrogen fixation (FBN), phytohormonium production, phosphate solubilization, biological control of phytopathogens (DOBBELARE, VANDERLEYDERN, OKON, 2003), among others.

The inoculation in plants with PGPB requires technologies in formulations capable of protecting the cells, which are vulnerable when applied directly to the soil (BASHAN et al., 2016). Carriers designed with biodegradable materials can be an efficient strategy for provide a more suitable microenvironment, combined with physical protection for a prolonged period to prevent a rapid decline of bacteria. Among the materials available for the development of these carriers are the polyacid lactic (PLA) and starch polymers, important for injection molding, the sugarcane fiber from agroindustrial waste, which provides a significant cost reduction for PLA-based materials (ISHIZAKI et al., 2006).

In addition, the incorporation of tannin to retard the biodegradation process brings us an application in the development of seedling bio-pots, giving a greater durability to the material, as much as desirable containers for seedlings in the medium and short-term, being able to fulfill the required function and then biodegradable in the soil under natural field conditions (MADBOULY et al., 2014).

Considering that the conversion of nutrients available in the soil is largely driven by the presence of microorganisms of the soil (YE et al., 2018), the choice of the nutritional composition of the materials in formulations can be carried out to providing specific environmental responses that allow the soil conditioning and bioremediation of impacted lands, stimulated by the soil microbiota that converts the bio-pots into biomass along biodegradation process, thus contributing to increase the soil quality (MOREIRA et al., 2018) .

Soil quality is based on its ability to function within the limits of the ecosystem and land use to sustain biological productivity, maintain environmental quality, and promote animal and human health (DORAN; PARKIN, 1994). The concept of soil quality is no longer associated only with its productive capacity and management conditions, as already described (MAUSEL, 1971), but also with soil characteristics in contributing to ecosystem services, including biomass production (BOUMA et al.,

2017). Soil quality should be assessed by components that are able to contribute to the identification of a set of soil-sensitive attributes, which can be used as indicators of quality, microbiological as soil respiration and microbial biomass, and chemical as soil organic carbon content, pH, available P and K (BÜNEMANN et al., 2018).

In this work it was demonstrated the versatility of formulations developed with polymers such as polylactic acid (PLA) and starch, sugarcane bagasse, tannin and nutrients (yeast extract and sucrose) as a new biodegradable material by the extrusion processes followed by molding by injection in the form of pots. *Azospirillum brasilense* Abv5 was used as model PGPB to evaluate different immobilization procedures of bacterial cells on the bio-pots, for protection and release of the cells in water and sand. The influence of the bio-pots on soil quality was assessed using biological and chemical soil quality indicators. The bacterized bio-pots was applied in seedlings of tomato. The resulting materials served to stimulate microbial activity and improve soil quality, as well as carrier for PGPB protection and increment plant development with the bacterized bio-pots.

2. MATERIAL AND METHODS

2.1 Plant Growth-Promoting Bacterial Strain and Growth Conditions

Azospirillum brasilense strain Ab-V5, plant growth-promoting bacteria originally isolated from maize plants was used in this study. This strain is deposited at the “Culture Collection of Diazotrophic and Plant Growth Promoting Bacteria” of Embrapa Soja, Londrina, Paraná, Brazil. When needed, bacteria were grown in test tubes (15 mL volume) containing 5 mL of DYGS liquid medium (MARCELINO et al. 2016) as pre-inoculum and in Erlenmeyer flasks (250 mL volume) containing 50 mL of MCA4 (patent pending, INPI protocol no. BR1020140171746, Brazil) prepared with glycerol (46.6%), sucrose (23.3%), yeast extract (23.3%), xanthan gum (0.47%), polyvinylpyrrolidone (0.47%), minerals (K_2HPO_4 , KH_2PO_4 , NH_4NO_3 , $MgSO_4$, Fe-EDTA), and micronutrients (Mo, Mn, B, Cu, Zn). All bacterial cultures were grown in a rotary shaker for 72 h at 180 rpm and 28 ± 2 °C.

2.2 Materials, Extrusion and Injection Molding Conditions

Table 1 presents the composition of formulations designed to support the viability of gram-negative PGPB bacteria along time and to evaluate the maximum tannin concentration that cause no harm to bacteria survival (patent pending, INPI protocol no. BR 1020180072269, Brazil). These formulations were used to produce containers for plant propagation through extrusion followed by injection-molding. Materials specifications are the following: polylactic acid (PLA) REVODE201 from Hisun (China) with glass transition temperature of 54–60 °C, peak melt temperature of 135–150 °C, density (g/cm³) of 1.25 ± 0.05 ; glycerol (w/w) from Dinâmica Química (Diadema, Brazil); native cassava starch (amylose 20.8 ± 0.6 wt%; protein 0.28 ± 0.1 wt%; lipids 0.11 ± 0.6 wt%; ash 0.22 ± 0.6 wt%, db) from Indemil (Paranavaí, Brazil); sugarcane bagasse (residue from sugar and alcohol plant - Usiban, Bandeirantes, Brazil); rock phosphate (basalt powder) as fosforita Alvorada, from Socal S.A. (Registro, Brazil); yeast extract from Kasvi (Liofilchen, Italy); crystal sugar and skim powdered milk; these two last were acquired from a local market (Londrina, Brazil) and tannin extracted from black wattle (*Acacia mearnsii*) from Tanac S. A. (Montenegro, Brazil).

Table 1. Composition of the formulation mixtures used to produce containers for plant propagation by extrusion followed by injection-molding.

Materials	Formulations (g/100 g solids)				
	1	2	3	4	5
Tannin	0	0.5	1	1.5	3
Polylactic acid (PLA)	35	35	35	35	35
Sugarcane bagasse	20	20	20	20	20
Cassava starch	23.7	23.4	23.2	23	22.3
Glycerol	12.9	12.7	12.4	12.1	11.3
Yeast extract	3.7	3.7	3.7	3.7	3.7
Rock phosphate	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5
Crystal sugar	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5
Powdered skim milk	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7

Mixing of materials, extrusion and injection-mold conditions were the same as described in Moreira et al. (2018). Based on the preliminary results of immobilized PGPB survival according to tannin concentration on composite formulation (Supplementary material.1), two formulations were selected for further studies, named as WT (formulation 3 with 1% tannin) and NT (formulation 1 without tannin in its composition). These formulations were further modified by addition of 4.68 g of NaH_2PO_4 and 8.66 g of Na_2HPO_4 per kg of formulation, aiming to buffer the composites at pH 7. The formulations WT and NT followed the mixture, extrusion and injection mold processes described by Moreira et al. (2018), except that it was molded as a conical tube of 31 cm^3 volume, with 117 mm height, 30 mm top radius, 15 mm bottom radius, a 10 mm nozzle and 3 splines, proper to plant propagation and seedlings growth. The final material is named as bio-pots throughout the manuscript.

2.3 Immobilization of *A. brasilense* Ab-V5 on Bio-Pots

Immobilization of Ab-V5 cells were performed only in bio-pots produced with the formulation WT (with 1% tannin). Previously to the immobilization, 12 cm^2 samples from injection-mold bio-pots were weighted, individually wrapped in brown paper and sterilized by moist heat (autoclaved at 121 °C for 15 min). Bacterial immobilization was performed by immersion of sterilized bio-pots into bacterial solutions containing natural polymers, prepared in a population density of 10^9 cells mL^{-1} . Solution A (gelatin-starch based) was prepared with 1.5% gelatin, 1.5% starch, 0.6% glycerol and 0.02% of Na-montmorillonite (Closite, Southern Clay Products, USA). Solution B (starch-xanthan gum based) was prepared with 20% glycerol, 5% starch, 0.6% K_2HPO_4 , 0.5% sucrose, 0.5% maltose, 0.4% KH_2PO_4 , 0.16% NH_4NO_3 , 0.2% Fe-EDTA (sol.0.5 M), 0.1% yeast extract, 0.1% xanthan gum, 0.1% polyvinylpyrrolidone, 0.1% MgSO_4 , 0.005% NaCl and 2% micronutrients (0.1% $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 0.118% $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$; 0.14% H_3BO_3 ; 0.004% $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$; 0.12% $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$).

A total of six immobilization procedures were tested using different combinations with the solutions A and B, by immersing the samples in a single solution or a combination of two-step immersion in both solutions. Procedures were performed under aseptic conditions at room temperature. At the end of the

processes, after drying, stored in sterilized cellophane bags at room temperature (26 ± 4 °C). The procedures were composed of one or two steps of immobilization according to Table 2.

Table 2. Different procedures and respective sequential steps applied over bio-pots injected-mold samples to immobilize *Azospirillum brasilense* Ab-V5 cells.

Procedures	Immobilization steps					
	Immersion 10^9 cells mL^{-1} (1 hour)	Dry (1 hour)	Immersion No cells (5 min)	Dry (1 hour)	Immersion 10^9 cells mL^{-1} (1 hour)	Dry (1 hour)
Procedure 1	Sol. A ¹	(X)		()		()
Procedure 2	Sol. B ¹	(X)		()		()
Procedure 3	Sol. A	(X)	Sol. B	(X)		()
Procedure 4	Sol. A	(X)		()	Sol. B	(X)
Procedure 5	Sol. B	(X)	Sol. A	(X)		()
Procedure 6	Sol. B	(X)		()	Sol. A	(X)

¹Solution A, gelatin-starch based; solution B, starch-xanthan gum based.

2.3.1 Survival of immobilized *A. brasilense* Ab-V5 on bio-pots

Aiming to determine which procedures resulted in best capacity in sustain the viability of immobilized Ab-V5 cells, determinations of colony forming unities (CFU) counts were carried out for all six procedures, using bio-pots containing immobilized bacteria and stored for 1 and 7 days at room temperature. The CFU counts were obtained after production of manual homogenates of the bio-pots in sterile saline solution (0.86% NaCl), with the aid of mortar and pestle (dillution 10^{-1}). From this solution, a serial 1:10 dillution series was prepared in sterile saline to a 10^{-5} dillution, and 100 μL of dilutions 10^{-3} to 10^{-5} were inoculated in plates containing RC-red gongo solid medium (CÁCERES, 1982). Inoculated plates were incubated at 30 °C $\pm$ 2 °C for 72 h, and after this incubation period the most suitable plate dillution was selected and the number of *Azospirillum*-like bacterial colonies was determined. The results were expressed as the mean number of CFU per cm^2 of bio-pots in a Log_{10} base ($Log_{10}CFUcm^{-2}$). Procedures that resulted in higher bacterial viability were selected for further evaluation of the survival of immobilized bacteria up to 56 days of storage (1, 7, 14, 28 and 56 days of storage).

2.3.2 Release of immobilized *A. brasilense* Ab-V5 cells from the bio-pots

The release of the immobilized bacteria from the bio-pots was studied in samples immersed in water and samples immersed in sterilized sand, using 1-day stored immobilized samples. The analysis of cell-release in water was performed for all six immobilization procedures, while the analysis of cell-release in sand was carried out only for the processes selected after the analysis of immobilized bacterial viability. The release of immobilized cells was performed by transferring bio-pots to plastic tubes (50 mL volume) filled with 10 mL of distilled sterilized water or 25 g of sterilized sand at 30% moisture, and performing the CFU counts at different incubation times: 0 (control), 3, 6, 12 and 24 h of contact with water or sand. To this aim, serial dilutions of water or sand were prepared up to 10^{-5} dilution and plated in RC-red gongo solid medium to determine the CFU counts, as indicated in previous section. The determinations were performed in triplicate for each sample, sampling time and dilution and results were expressed as $\text{Log}_{10}\text{CFU}$ per cm^2 of bio-pots.

2.3.3 Scanning electron microscopy (SEM)

Bio-pots WT sterilized before and after cells immobilization procedure 6 and procedure 6 without bacteria used with control of up to 1 cm^2 were fixed in 3% glutaraldehyde in PBS solution, pH 7.2 to 24 h, washed in the same buffer without glutaraldehyde and dehydrated in a series of increasing ethanol concentrations and subjected to critical point drying. The samples were fixed on the SEM holders, coated with gold and observed using an FEI Quanta 200 Field Emission Scanning Electron Microscope (FE-SEM) at 10 kV.

2.4 Biodegradation of Bio-Pots and Resulting Impacts on Soil Microbiological and Chemical Parameters

Glass flasks (200 mL volume) filled with 50 g of a mixture of bulk soil (Alfisol) and sand (1:2 w/w, respectively), disposed in dissectors and containing samples of bio-pots (12 cm^2 , $3 \times 4 \text{ cm}$) buried at 3 cm depth were used as microcosms. In these microcosms, the biodegradation kinetics and determinations of soil basal respiration (R_B), soil microbial biomass carbon (MBC), total organic carbon (TOC), microbial

biomass nitrogen (MBN), total organic nitrogen (TON) and metabolic quotient (qCO_2) were carried out. A set of microcosms were prepared under the same conditions except no bio-pots was added, to be used as control for the determinations given below. Microcosmos were kept in a complete randomized design, under room temperature ($24 \pm 3^\circ C$) and 30% soil moisture by adding sterilized distilled water each 4 days along 180 days of trial.

2.4.1 Biodegradation of bio-pots

The biodegradation was defined as the weight loss of the materials under microcosms conditions, by subtracting the initial weight of samples to the samples weight obtained after different buried time periods (30, 60, 90, 120, 150 and 180 days). For each sampling, the bio-pots were removed out from the microcosms and gently washed in tap water and moist tissue paper to remove soil particles added, dried at $60 \pm 2^\circ C$ for 4 h and incubated for 24 hours at room conditions before weighing. The weight loss was expressed as percentage ($W_{loss}\%$) as determined by the following equation:

$$W_{loss}\% = \frac{(W_0 - W_i)}{W_0} \times 100$$

(1)

Where W_0 is the sample initial weight and W_i is the sample weight at the sampling time.

2.4.2 Impact of biodegradation of bio-pots on microbiological and chemical properties of soil microcosms

The impact of biodegradation of bio-pots on microbiological soil properties were evaluated through determinations of soil basal respiration (R_B), soil microbial biomass carbon (MBC), microbial biomass nitrogen (MBN) and metabolic quotient (qCO_2) at 30 days intervals up to 180 days of microcosm incubation. The R_B was determined by quantifying the carbon dioxide (CO_2) trapped in NaOH solution (1.0 M, 10 mL

volume) according to Silva et al. (2007a), with determinations performed each 4 days to avoid the solution saturation. The MBC and TOC were determined in 25 g subsamples, according to Vance et al. (1987) modified by Silva et al. (2007b) and using the conversion factor $k_{EN} = 0.33$ (SPARLING; WEST, 1988). The metabolic quotient was calculated as the ratio of basal respiration to microbial biomass carbon (ANDERSON; DOMSCH, 1993). The MBN was determined in the same fumigated and non-fumigated extracts produced to MBC determinations by the method of the ninhydrin-reactive compounds (JOERGENSEN; BROOKES, 1990) using the conversion factor $k_{EN} = 0.54$ (BROOKES et al., 1985), with the total organic nitrogen (TON) being obtained from non-fumigated samples. The impact of biodegradation of bio-pots on soil chemical parameters were obtained from dried and sieved (2 mm) subsamples (25 g), by determination of pH (CaCl_2), H + Al and Al (SMP - Shoemaker, McLean and Pratt - buffer), Ca and Mg (KCl), P and K (Mehlich) (PAVAN et al., 1992).

2.5 Application of Bio-Pots with the Immobilized Plant Growth-Promoting Bacterial to Growth Tomato Seedlings

Tomato seeds (Santa Cruz Paulista) were set to germinate under controlled conditions ($25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 3 days), and seedlings with normal development were planted in mold-injected bio-pots (31 cm^3 volume), containing Ab-V5 cells immobilized by the procedure 6 and 7 days after the immobilization take place. Bio-pots were filled with commercial substrate (pH 5.7; H + Al, $6.21\text{ cmol}_c\text{dm}^{-3}$; K, $0.26\text{ cmol}_c\text{dm}^{-3}$; Ca, $33.66\text{ cmol}_c\text{dm}^{-3}$; Mg, $10\text{ cmol}_c\text{dm}^{-3}$; Al, $0.45\text{ cmol}_c\text{dm}^{-3}$; P 19.37 mgKg^{-1} ; base saturation 86.85% and organic matter 13.93%). Plants were grown for 35 days in nursery, covered with a polypropylene screen (60% shadow) and 30 min irrigation four times per day, in a completely randomized experimental design. After the growth period, the length of seedlings, number of leaves, stem diameter, root volume, dry weight of shoots and roots were determined. Plants grown in bio-pots without immobilized bacteria were used as control.

2.6. Statistical Analysis

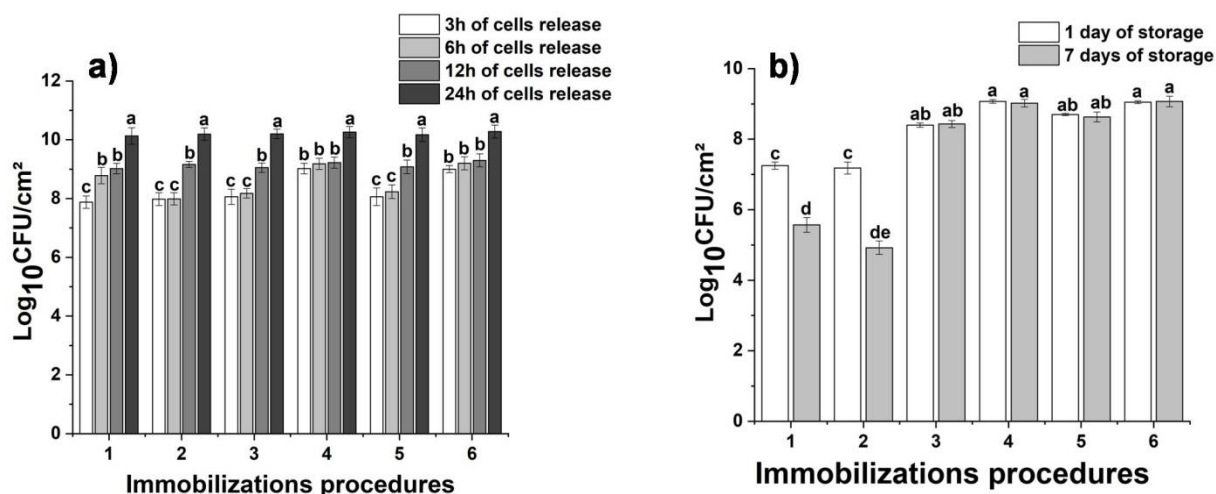
Analyses of variance (ANOVA) and Tukey's mean comparison test ($p < 0.05$) were performed with Statistica software version 10.0 (Statsoft, OK, USA).

3. RESULTS

3.1. Release, Survival and SEM of *A. brasilense* Ab-V5 Immobilized in Bio-Pots

The study of release and short-term survival of *A. brasilense* Ab-V5 cells immobilized on bio-pots, according to different immobilization procedures, is presented in Figure 1. Only materials produced with tannin were evaluated, since the concentration used was determined in a preliminary immobilization assay (Supplementary material 1) and due to the need to delay the biodegradation process to increase the bio-pots life-time. All immobilization procedures showed to release the bacterial cells in water after 3 hours of immersion of materials, although at different intensity (Figure 1a). Furthermore, the survival of immobilized Ab-V5 cells varied according to the procedure, indicating that the application of a second immobilization step allowed cells to have its viability increased (Figure 1b).

Figure 1. Release of immobilized *A. brasilense* Ab-V5 cells from bio-pots immersed in water, according to different immobilization procedures (a) and short-term survival (up to 7 days of storage) of immobilized cells in materials stored at room temperature (b). Values of colony forming units (CFU) are presented as $\log_{10}$. Different letters indicate statistically significant differences according to Tukey's test ($p < 0.05$). $n = 4$.



Immobilization procedures 4 and 6 (two-steps immobilization of 1-hour immersion on bacterial solutions each step) allowed the prompt release of up to 100% of the initial Ab-V5 population density (around 10^9 Ab-V5 cells cm^{-2} bio-pots) after 3 hours of immersion in water. Furthermore, these two-step procedures were found to better promote the viability of immobilized Ab-V5 cells, which showed no decay on counts from materials stored up to seven days at room temperature. Immobilization procedures 3 and 5 (two-steps immobilization of 1-hour immersion on bacterial solutions followed by 5-min immersion on solutions without bacterial) showed intermediate count values for bacterial release and survival, when compared to single or two-step procedures with longer immersion time.

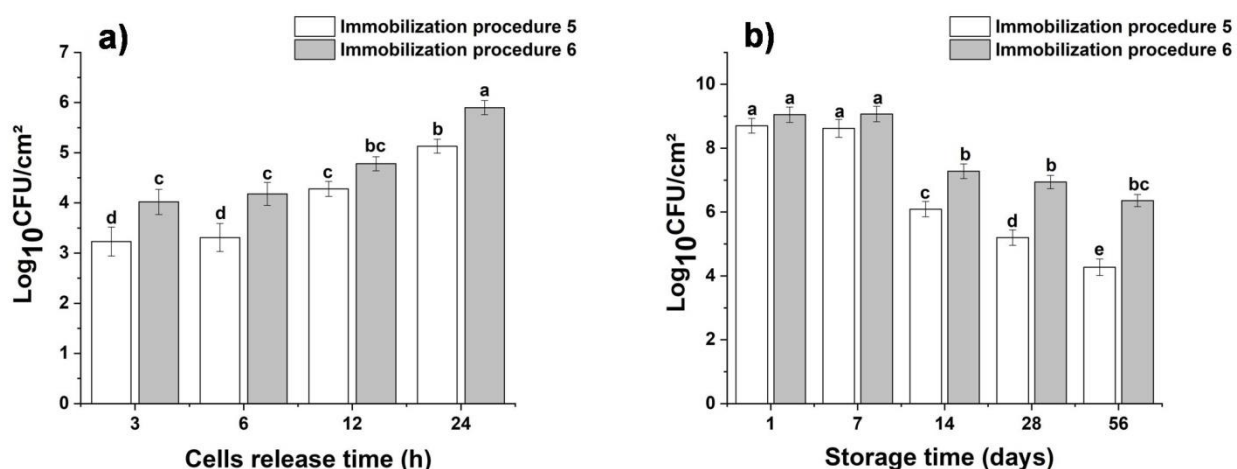
It is interesting to note that bacterial counts carried out after 24 hours of immersion of materials in water, regardless the immobilization procedure, showed values much higher than expected if considering the population density initially immobilized, evidencing that Ab-V5 was able to convert part of nutrients released by the bio-pots into biomass. Further evaluation of survival and release of immobilized Ab-V5 cells in sterile sand were studied for bio-pots submitted to bacterial immobilization according to procedures 5 and 6, shown in Figure 2.

These procedures differ only in the period extend of the second immersion step; while procedure 5 consider the second immersion of bio-pots for 5 min without bacteria (only to confer protection to the cells immobilized in the first step), procedure 6 takes 1-hour immersion with bacterial for this step (complementing the number of immobilized cells in the first step).

The release of bacteria in sand (Figure 2a) was a faster release of immobilized cells from bio-pots submitted to the procedure 6. Possibly the second step of immobilization with the application of polymeric material without bacteria in the procedure 5 occurred a greater protection to the bacteria and consequently the release to the medium was smaller to the procedure 6.

The survival of Ab-V5 cells showed to be similar at the beginning in both procedures (first 7 days of storage) (Figure 2b). Demonstrating that the second step of immobilization procedure with bacteria made the difference in the medium-term.

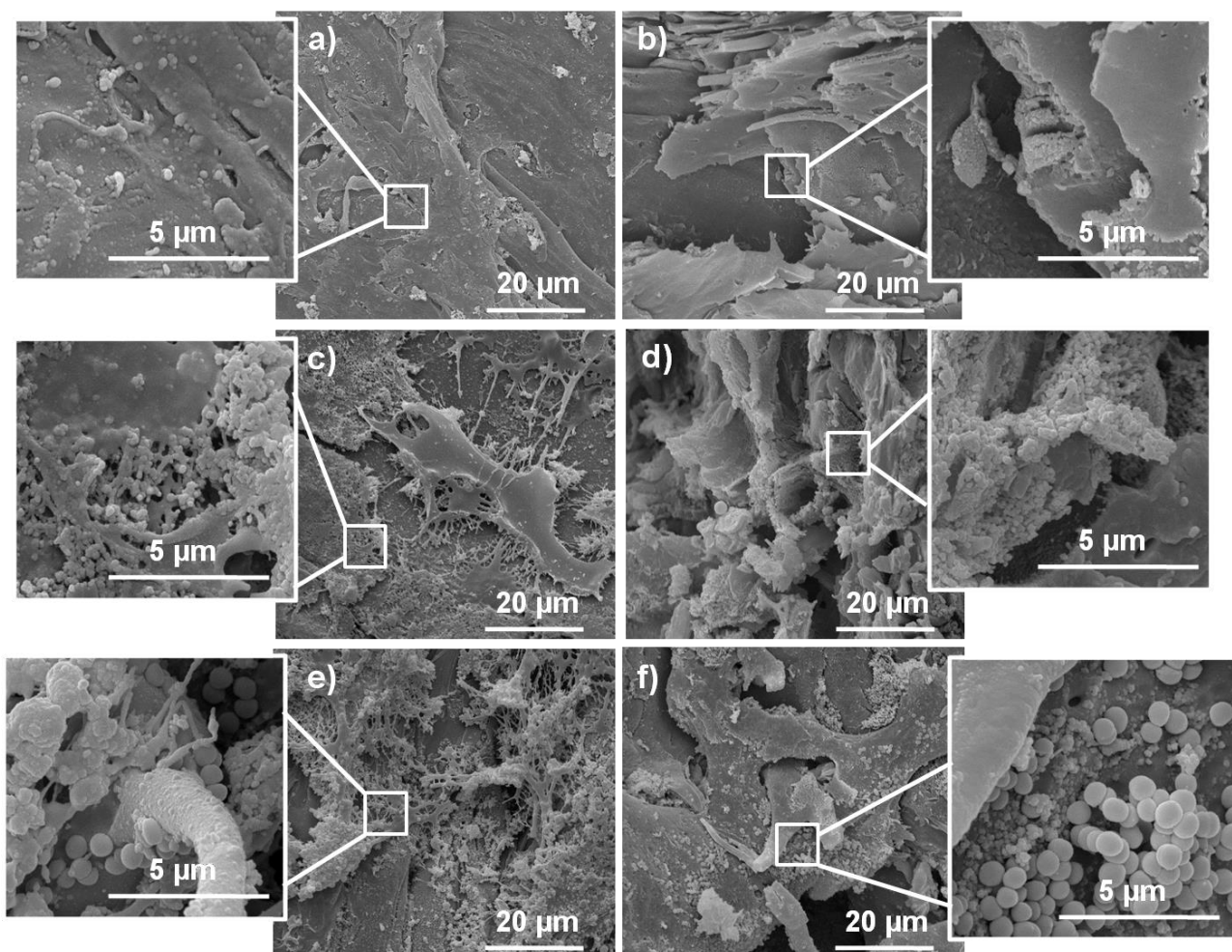
Figure 2. Release of immobilized *A. brasilense* Ab-V5 cells from bio-pots buried in sterilized sand at 30% umidity, according to different immobilization procedures (a) and respective survival when stored at room temperature 56 days (b). Values of colony forming units (CFU) are presented as $\log_{10}$. Different letters indicate statistically significant differences according to Tukey's test ($p < 0.05$). $n = 4$.



The micrographs of the surface and fracture of the bio-pots with immobilized *A. brasilense* Ab-V5 by procedure 6 after 7 days of storage were evaluated by SEM (Figure 3). Bio-pots sterilized produced with the formulation WT (with 1% tannin) before the the immobilization procedure (Figure 3a and 3b) presented a homogeneous appearance, demonstrating that the components of the blends were compatible and equally dispersed. In Figure 3c and 3d is possible to observe the modification on the morphology of the bio-pots caused by the polymeric solutions.

In the surface images of the Figure 3e it is noted that the use of the polymeric solutions in the immobilization procedure contributed to the fixing of bacteria in the material. In the fracture (Figure 3f) images of bacterial colonies can be visualized more internally in the material, this characteristic is important for the protection and maintenance of cells in the bio-pots evidencing that the immobilization procedure was efficient.

Figure 3. SEM micrographs (a-surface) and (b-fracture) of biodegradable containers (injection-mold bio-pots sterilized). Micrographs (c-surface) and (d-fracture) of bio-pots immersed in solution B (starch-xanthan gum based) and solution A (gelatin-starch based) for 1-hour each without bacteria. Micrographs (e-surface) and (f-fracture) of bio-pots with immobilized *Azospirillum brasilense* Ab-V5 cells (2×10^9 cells cm^{-2} material). Immobilization procedures were performed one week before use in a two-step process using solution B and solution A with bacterial suspensions, by immersion of materials 1-hour each solution. $n = 3$.



3.2. Biodegradation and Effect of Bio-Pots in Soil Microbiological Indicators

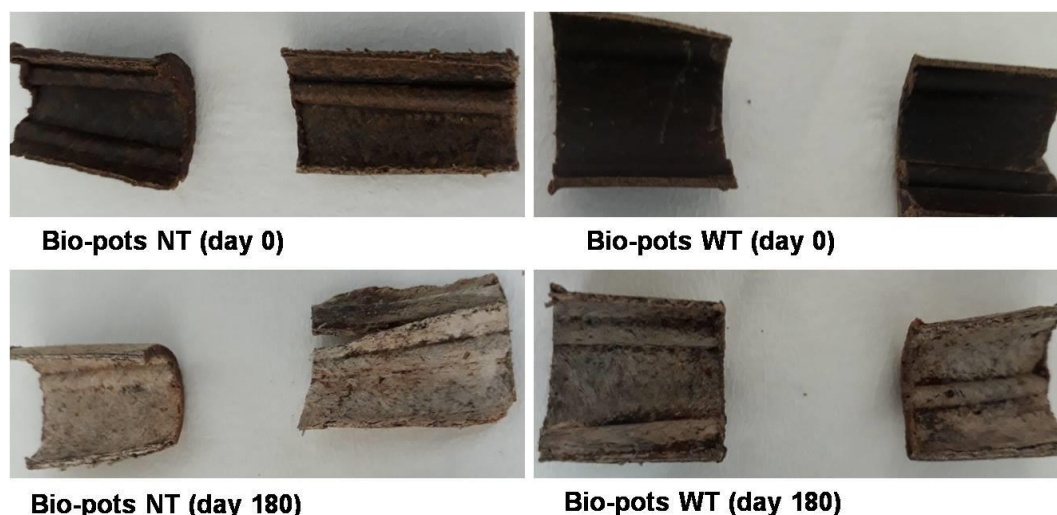
The biodegradation of bio-pots formulated with (WT) and without tannin (NT), as well as respective effects on soil microbiological indicators in response to biodegradation are presented in Table 3, and photographs of the bio-pots before and after biodegradation time are shown in Figure 4.

Table 3. Biodegradation kinetics of bio-pots produced with (WT) and without tannin (NT) as formulation additive, and respective microbiological indicators from soils where biodegradation take place, including a reference control soil (CS) where no material was added. Sampling time indicates the elapsed time which samples remained in the microcosms filled with a mixture of sand and Alfisol (2:1) as substrate. $n = 3$.

Sampling time (days)	Weight loss (%)		TOC ³ (g kg ⁻¹ soil)			TON ⁴ (g kg ⁻¹ soil)			MBN ⁵ (mg kg ⁻¹ soil)		
	WT	NT	WT	NT	CS	WT	NT	CS	WT	NT	CS
0 ¹	NA ²		42.0 ^{Ad}	42.0 ^{Ad}	42.0 ^{Aa}	8.3 ^{Ad}	8.3 ^{Ad}	8.3 ^{Aa}	3.4 ^{Ae}	3.4 ^{Af}	3.4 ^{Ab}
30	36.3 ^{Be}	39.3 ^{Ae}	63.0 ^{Ac}	65.0 ^{Ac}	37.0 ^{Ba}	33.3 ^{Ab}	41.9 ^{Ab}	5.2 ^{Bb}	160.8 ^{ABa}	168.1 ^{Aab}	2.3 ^{Bc}
60	40.4 ^{Bd}	43.5 ^{Ad}	60.0 ^{Ac}	61.0 ^{Ac}	42.0 ^{Ba}	37.4 ^{Aa}	49.6 ^{Aa}	2.0 ^{Bc}	155.7 ^{Aa}	160.6 ^{Ab}	2.7 ^{Bc}
90	44.0 ^{Ac}	45.6 ^{Ad}	77.0 ^{Ab}	73.0 ^{Ab}	26.0 ^{Bb}	37.8 ^{Aa}	49.7 ^{Aa}	1.8 ^{Bc}	157.9 ^{Ba}	179.7 ^{Aa}	1.6 ^{Cd}
120	45.5 ^{Bc}	48.0 ^{Ac}	28.0 ^{Ae}	29.0 ^{Ae}	12.0 ^{Bc}	13.2 ^{Ac}	19.7 ^{Ac}	2.7 ^{Bc}	52.6 ^{Ab}	54.1 ^{Ac}	8.1 ^{Ba}
150	49.4 ^{Bb}	55.7 ^{Ab}	136.0 ^{Aa}	139.7 ^{Aa}	38.0 ^{Ba}	10.4 ^{Ac}	11.0 ^{Ac}	2.1 ^{Bc}	37.3 ^{Ac}	32.1 ^{Ad}	7.9 ^{Ba}
180	52.0 ^{Ba}	59.1 ^{Aa}	55.0 ^{Ad}	53.0 ^{Ad}	38.0 ^{Ba}	4.2 ^{Ae}	4.9 ^{Ae}	2.4 ^{Bc}	18.4 ^{Ad}	11.1 ^{Be}	1.2 ^{Bd}
CV (%)	2.70	2.84	9.22	9.20	8.88	6.03	5.80	3.01	7.99	7.55	3.51
Sampling time (days)	MBC ⁶ (mg kg ⁻¹ soil)			R _B ⁷ (mg C-CO ₂ kg ⁻¹ soil h ⁻¹)			qCO ₂ ⁸ (mg C-CO ₂ mg ⁻¹ MBC h ⁻¹)				
	WT	NT	CS	WT	NT	CS	WT	NT	CS		
0	109.4 ^{Ae}	109.4 ^{Ae}	109.4 ^{Aa}	0.90 ^{Ad}	0.90 ^{Ad}	0.90 ^{Ab}	6.5 ^{Ab}	6.5 ^{Ab}	6.5 ^{Ab}		
30	412.1 ^{Bab}	697.0 ^{Aa}	90.9 ^{Cb}	1.63 ^{Bb}	2.52 ^{Aa}	0.39 ^{Cd}	3.9 ^{Ac}	3.6 ^{Ac}	4.3 ^{Ac}		
60	481.1 ^{Ba}	551.5 ^{Ab}	112.8 ^{Ca}	1.72 ^{Bb}	1.96 ^{Ab}	0.51 ^{Ccd}	3.6 ^{Ac}	3.6 ^{Ac}	3.9 ^{Ac}		
90	239.4 ^{Ac}	263.6 ^{Ac}	104.0 ^{Ba}	1.08 ^{Ac}	1.06 ^{Ac}	0.58 ^{Bcd}	4.5 ^{Abc}	4.2 ^{Ac}	3.3 ^{ABc}		
120	139.4 ^{Bd}	254.4 ^{Ac}	100.0 ^{Ca}	1.01 ^{Ac}	1.04 ^{Ac}	0.70 ^{Bbc}	7.3 ^{Ab}	3.9 ^{Bc}	7.2 ^{Ab}		
150	136.4 ^{Ad}	134.3 ^{Ad}	78.8 ^{Bc}	1.93 ^{Aa}	1.94 ^{Ab}	1.74 ^{Ba}	14.2 ^{Ba}	15.5 ^{Ba}	22.1 ^{Aa}		
180	233.3 ^{Ac}	221.2 ^{Ac}	106.1 ^{Ba}	0.57 ^{Be}	0.66 ^{Be}	0.86 ^{Ab}	2.5 ^{Bd}	3.0 ^{Bc}	8.2 ^{Ab}		
CV (%)	9.35	8.86	8.55	1.08	1.66	1.27	3.55	3.44	3.67		

¹Reference control values from materials not submitted to biodegradation and values for TOC, TON, MBN, MBC, R_B, qCO₂ recorded on substrate before the experiment begin. ²Not applicable. ³Total organic carbon (TOC). ⁴Total organic nitrogen (TON). ⁵Microbial biomass nitrogen (MBN). ⁶Microbial biomass carbon (MBC). ⁷Basal respiration (R_B). ⁸Metabolic quotient (qCO₂). Different capital letters in the row and different small letters in the column indicate statistically significant differences ($p < 0.05$) according to the Tukey test.

Figure 4. Photographs of bio-pots produced without tannin (NT) and with tannin (WT), before and after 180 days the biodegradation in a mixture of sand and Alfisol (2:1) as substrate.



Injection-mold bio-pots produced with WT formulation resulted in as lower biodegradation rate (maximum weight loss of 52% after 180 days buried in soil) when compared to bio-pots produced with the NT formulation (59% of weight loss at the same conditions), demonstrating that tannin postponed the material mineralization, mostly at late biodegradation times. The biodegradation rate in soil showed to be gradual and linear for both formulations after 30 and up to 180 days (slope of the WT formulation of 0.102 and $R^2 = 0.988$, while slope of NT was 0.131 with $R^2 = 0.963$), although the initial biodegradation of materials (0 to 30 days) was more intense and may not fit into a linear regression curve.

Alterations in soil microbiological parameters were observed along the course of bio-pots biodegradation (Table 3), as expected for soils that received biodegradable inputs. Increases in the total organic carbon (TOC) and total organic nitrogen (TON) contents were apparent after 30 days of materials biodegradation, while in the reference control soil (CS-soil) these parameters not differ (TOC) or decreased (TON) in comparison to the initial values (day 0). Increases in TOC and TON in soils added with WT or NT were accompanied by the microbial biomass carbon (MBC) and microbial biomass nitrogen (MBN) at this sampling time (day 30), although the amount of MBC and the ratio of microbial biomass carbon to total organic carbon was higher in NT-soils ($1.07 C_{mic-to-C_{org}}$) than in WT-soils ($0.65 C_{mic-to-C_{org}}$). In a timescale, TOC, TON, MBC and MBN remained much higher in WT-

and NT-soils than in CS-soils up to 180 days, although a severe drop in these values was observed around 120 days after biodegradation starts, with variations in the values there after.

Analysis of soil respiration (R_B) agreed with the total and microbial carbon and nitrogen measurements, being higher in WT- and NT-soils than in CS soils along the experimental time except for the analysis at 180 days of biodegradation, where CS-soil showed higher R_B . In addition, differences between WT and NT R_B values occur until 60 days of biodegradation, when values had converged and become similar up the end of the experiment. In complement to R_B , qCO_2 analysis showed variation between soils only after 120 days of biodegradation starts where values of CS-soils become higher than those observed in WT- and NT-soils. We also found differences in the correlations between MBC and R_B among treatments, with positive values for $MBC \times R_B$ for WT- and NT-soils and negative values for CS-soils, while this last also had presented high positive correlation between R_B and qCO_2 which was not observed for the other two treatments.

All the microbiological parameters evaluated were in agreement with the biodegradation kinetics (weight loss analysis), indicating that the soil microbial community was involved on the biodegradation of materials described here, and that introduction of tannin on formulations results in a slower biodegradation rate due to its impact on the microbial community involved on the biodegradation activity.

Furthermore, observations of the MBC-to-MBN ratio are also indicative of the size of microbial community, hence influence the biodegradation rate of bio-pots in soil. From Table 3 data, one can note that MBC-to-MBN ratio remained quite low in both WT- and NT-soils along the experimental time, with mean values of 4.4 and 6.3 respectively, whereas the mean C/N ratio for CS-soils was 42.8. In a timescale, the microbial C/N ratio drops on soils added with bio-pots from an initial value of 32.2 to a mean value of 3.4 after 30 days, and remained close to this value up to 150 days after biodegradation starts. Meanwhile, CS-soils had increased its microbial C/N to 65 after 90 days of experiment starts, followed by a severe drop to mean value of 11.2 from 120 to 150 days followed by an increase to a value of 88.4 at 180 days of experimentation.

In Figure 4 it is observed that the time of biodegradation altered the external appearance of the bio-pots, however in the format did not show great changes. This

may be related to the blend components of the formulations, one more easily degraded than others.

Likewise observed for microbiological parameters, soil chemical parameters were also influenced by the presence and biodegradation of bio-pots. All the soil chemical indicators showed differences from WT- and NT-soil in comparison to CS-soil at some extent (Table 4).

The presence of bio-pots, regardless the formulation used, appears to conditionate the substrate in higher pH values, lower Al and Mg content and increased amounts of K, Ca and P. This reflects the input of compounds currently found in the raw materials that constitutes the bio-pots (sugarcane bagasse, yeast extract, rock phosphate and powdered skim milk). Interestingly, the amount of available phosphorus increased as the biodegradation of bio-pots occurs, presenting maximum values after 180 days of biodegradation.

Table 4. Chemical analysis of substrates where the biodegradation of bio-pots produced with (WT) and without tannin (NT) as formulation additive has developed, including a reference control soil (CS) where no material was added. Sampling time indicates the elapsed time which samples remained in the microcosms filled with a mixture of sterilized sand and Alfisol (2:1) as substrate. $n = 3$.

Sampling time (days)	pH			H + Al (cmol _c /dm ³)			Al (cmol _c /dm ³)					
	WT	NT	CS	WT	NT	CS	WT	NT	CS			
0 ¹	5.9 ^{Aa}	5.9 ^{Aa}	5.9 ^{Aa}	2.4 ^{Ac}	2.4 ^{Ad}	2.4 ^{Ac}	0.06 ^{Ab}	0.06 ^{Ab}	0.06 ^{Ab}			
60	5.6 ^{Ab}	5.7 ^{Ab}	4.6 ^{Bb}	2.6 ^{Cb}	3.4 ^{Aa}	2.8 ^{Bb}	0.08 ^{ABab}	0.05 ^{Bb}	0.15 ^{Aab}			
120	5.2 ^{Ac}	5.2 ^{Ac}	4.3 ^{Bb}	2.8 ^{Ca}	3.0 ^{Bb}	3.2 ^{Aa}	0.12 ^{Bab}	0.12 ^{Bab}	0.25 ^{Aa}			
180	5.2 ^{Ac}	5.4 ^{Abc}	4.5 ^{Bb}	2.8 ^{Aa}	2.6 ^{Bc}	2.8 ^{Ab}	0.20 ^{Aab}	0.21 ^{Aab}	0.22 ^{Aab}			
CV (%)	1.09	1.12	1.18	0.95	0.99	0.89	0.78	0.76	0.77			
Sampling time (days)	K (cmol _c /dm ³)			Ca (cmol _c /dm ³)			Mg (cmol _c /dm ³)			P (mg/Kg)		
	WT	NT	CS	WT	NT	CS	WT	NT	CS	WT	NT	CS
0	0.35 ^{Aa}	0.35 ^{Aa}	0.35 ^{Aa}	1.63 ^{Aa}	1.63 ^{Aa}	1.63 ^{Aa}	0.77 ^{Aa}	0.77 ^{Aa}	0.77 ^{Aa}	11.8 ^{Ad}	11.8 ^{Ad}	11.8 ^{Aa}
60	0.41 ^{Aa}	0.38 ^{Aa}	0.09 ^{Bb}	0.55 ^{Ac}	0.52 ^{Ac}	0.46 ^{Bc}	0.36 ^{Bc}	0.28 ^{Bd}	0.45 ^{Ac}	15.0 ^{Ac}	13.8 ^{ABc}	3.2 ^{Cb}
120	0.39 ^{Aa}	0.39 ^{Aa}	0.07 ^{Bb}	0.66 ^{Ab}	0.55 ^{Abc}	0.42 ^{Bcd}	0.55 ^{ABb}	0.56 ^{ABb}	0.63 ^{Ab}	22.2 ^{Ab}	21.1 ^{Aa}	3.2 ^{Bb}
180	0.38 ^{Aa}	0.41 ^{Aa}	0.09 ^{Bb}	0.65 ^{Ab}	0.64 ^{Ab}	0.61 ^{Ab}	0.21 ^{Bd}	0.39 ^{Ac}	0.23 ^{Bd}	24.6 ^{Aa}	21.5 ^{Ba}	3.4 ^{Cb}
CV (%)	2.04	2.03	3.09	3.01	3.11	3.09	5.09	5.33	5.40	6.09	5.89	7.01

¹Reference control values recorded on substrate before the experiment begin. Different capital letters in the row and different small letters in the column indicate statistically significant differences ($p < 0.05$) according to the Tukey test.

3.3. Growth of Tomato Seedlings on Bio-Pots with Immobilized Ab-V5 Cells

The fitness of bio-pots to substitute plastic containers used to growth plant seedlings were evaluated using tomato, along 35 days of growth under nursery conditions. Biometric parameters are shown in Table 5, for plants grown in bio-pots produced with WT formulation with and without immobilized Ab-V5 cells using the procedure 6 and filled with commercial substrate.

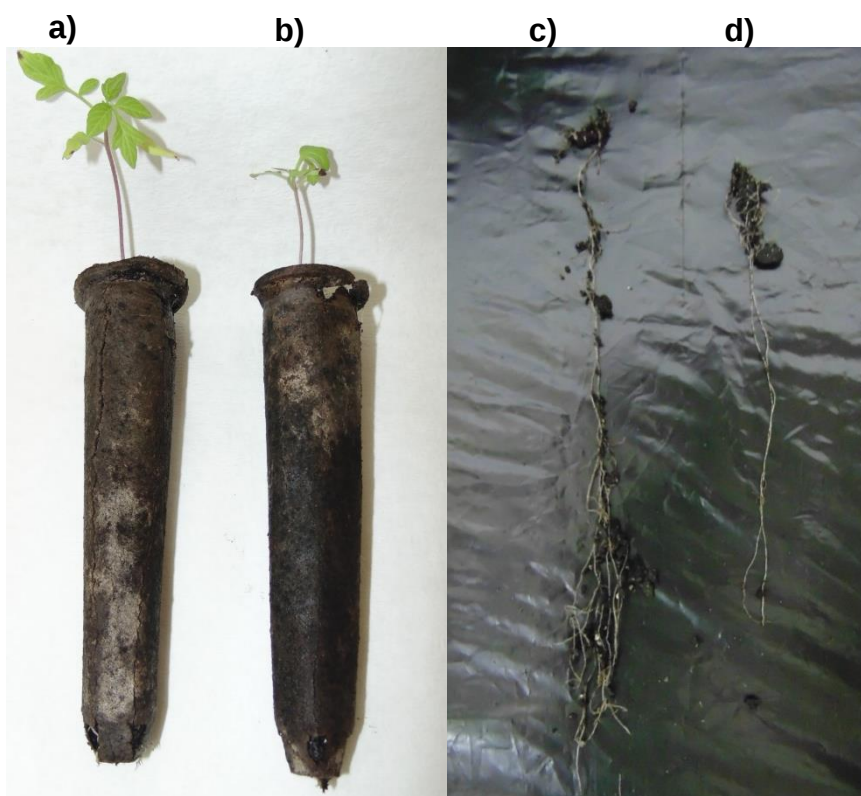
Is clear from the results that the growth parameters were farther improved when tomato seedlings were cultivated on bacterized bio-pots (Figure 5). This indicates that immobilized Ab-V5 cells were active in colonize tomato seedlings and express its growth-promotion potential, resulting significant increases in all the evaluated parameters in the same bio-pots, but without immobilized Ab-V5 cells. This reinforces the potential of bio-pots as alternative container to produce high-quality plant seedlings and improve the soil quality in agricultural ecosystems.

Table 5. Biometric parameters of tomato seedlings grown for 35 days in biodegradable containers (injection-mold bio-pots) produced with 35% PLA, 23.2% cassava starch, 20% sugarcane bagasse, 12.4% glycerol, 3.7% yeast extract, 2.5% rock phosphate, 1.5% crystal sugar, 1.0% tannin and 0.7% powdered skim milk. Bio-pots were evaluated with and without immobilized *Azospirillum brasilense* Ab-V5 cells (2×10^9 cells cm^{-2} material). Immobilization procedures were performed one week before use in a two-step process using different bacterial suspensions, by immersion of materials 1-hour each solution. $n = 3$.

Growth parameters	Bio-pots	
	Bacterized	Unbacterized
Length (cm)	22.48 ± 2.12^A	16.46 ± 0.73^B
Leaves (number)	4 ± 0.55^A	2 ± 0.45^B
Stem diameter (mm)	0.4 ± 0.05^A	0.3 ± 0.08^B
Root volume (cm^3)	0.19 ± 0.09^A	0.08 ± 0.08^B
Root dry weight (mg)	80 ± 10^A	40 ± 10^B
Shoot dry weight (mg)	90 ± 20^A	50 ± 20^B

Different capital letters in the row indicate statistical differences ($p < 0.05$) according to the Tukey test.

Figure 5. Visual aspect of tomato seedlings and respective root system after 35 days of growth in biodegradable containers (injection-mold bio-pots) under nursery conditions. Plant grown in bio-pot containing immobilized *Azospirillum brasilense* Ab-V5 cells (2×10^9 cells cm^{-2} material; Fig 4a and 4c) and plant grown in bio-pot without immobilized bacteria (Figure 4b and 4d) are shown.



4. DISCUSSION

4.1. Survival of *A. brasilense* Ab-V5 Immobilized in Bio-Pots and Controlled Release of Cells in Water and Sand

The greatest influence observed on the viability and survival of PGPB was the use of the second bacterial incubation observed in procedures 4 and 6, which showed the best immobilization efficiency. Starch as well as gelatin, present in the immobilization solutions, are commonly used in cell immobilization processes (LIU et al., 2017; ETEMADI et al., 2018).

Even so, both procedures 5 and 6 showed to a drastic reduction in population density after 14 days of storage, however the cells immobilized by procedure 6

remained with higher viability and holding up to 56 days of storage. The population reduction of cells may be related to desiccation of the material. A low water activity reduces the metabolism of microorganisms (BOSSIO; SCOW, 1995) preventing a broad utilization of the bio-pots constituents by the *A. brasilense* cells. In addition, cellular protection mechanisms may have been triggered related to desiccation, modulating cellular physiology to adapt to perceived environmental stress (BERNINGER et al., 2018), making it difficult to detect viable cells.

In release the bacterial cells in water it can be observed that there was an increase in population density according to the contact time, which indicates that water was a facilitator to access the nutrients present in the bio-pots and allowed microbial growth. These nutrients (sugar, skim powdered milk and yeast extract) provided high quality formulations, since they may play a protective role for the cells (STREETER, 2003; BERNINGER et al., 2018). Marcelino et al. (2016) attributed to rock phosphate and sugarcane bagasse the maintenance of viability in Ab-V5 cells immobilized in biocomposite formulations.

In addition to the viability that the nutritional components of the carrier can promote during the storage time, the immobilization of PGPB provides a protective role for the microorganism against stressful soil conditions, competing microorganisms, as well as predators (BASHAN; BASHAN; PRABHU, 2016). Immobilized cells need to be released gradually in order to enable the successful colonization of plants, and its release should preferentially occurs when plants are able to associate with beneficial microorganisms (BASHAN et al., 2014; BASHAN; BASHAN; PRABHU, 2016). To simulate a controlled soil release of the PGPB immobilized in the bio-pots, an experiment was carried out in wet sterile sand, whose elements present did not interfere in the evaluations. The observed release was higher at the beginning, being appropriate, since for the expression of plant growth-promoting traits a high cell density at the time of plant development is desirable (PII et al., 2015).

One of the advantages of this proposed immobilization system is its shape, the tubes stay in direct contact with the plant, facilitating the movement of the bacteria to the root. In conventional agricultural systems the release of inoculant bacteria may occur far from the desired site, thus bacteria need to migrate through the soil, facing difficulties with respect to the more adapted native microflora and

often the absence of required water flow which limits the application of many inoculants (BASHAN; LEVANONY, 1987; BASHAN et al., 2014).

The results presented in this work introduce an innovative bacterial carrier which works as an immobilizer matrix able to sustain the viability of *A. brasilense* cells for up to 56 days of storage at room temperature. Bacteria immobilized in the bio-pots contributed to the growth of tomato seedlings. The increase of the evaluated parameters of the tomato plant in comparison to the one that did not receive the bacteria shows the high efficiency and quality of the use of the bio-pots bacterized as inoculated, considering a partial substitution of industrial fertilizers by PGPB inoculants, strengthening its value as an agricultural input suitable for use in agricultural systems.

4.2. Biodegradation and Increase Soil Quality

Alternative environmental-friendly materials aimed to substitute non-biodegradable plastics are available worldwide, although some of presented alternatives are impaired to a broad application due to the high economical cost of its production. The present study introduces a new biodegradable plastic material suitable to injection-mold applications, based on low-cost raw materials and that was shown to successfully replace polypropylene containers used to produce plant seedlings, with the advantage to support the immobilization of plant growth-promoting bacteria such as *Azospirillum brasilense*.

The characterization of this new material included the biodegradation in soil, which was shown to interfere on soil microbiological and chemical parameters. The presence of readily metabolized substrates and minerals in the material formulation, such as proteins, polysaccharides and phosphate (JONES; KIELLAND, 2012) seemed to account for the high impact on soil bio-chemical properties, as well as for the apparent high biodegradation rate observed after 30 days of introduction of materials into soil.

The tannin was added in the formulation with the aim of retarding the biodegradation process, due to its antimicrobial properties, because it inhibits the growth of fungi, bacteria and viruses and serves as a natural defense mechanism (CHUNG et al., 1998; GE et al., 2003). However, to avoid affecting the survival of *A.*

brasiliense Ab-V5 in the material, it was necessary to perform concentration tests for less resistance. The incorporation of tannin in the material is explained by the need to add a material with the capacity to provide greater durability for use in plant containers (bio-pots), which need a moderate rate of biodegradation to fulfill its function and to finish its cycle of life as biodegraded organic matter in the soil (MADBOULY et al., 2014; YANG et al., 2015).

The role of readily metabolizable compounds in the stimulus of the activity and size of the soil microbiota has been addressed. PLA-based formulations with starch, sugarcane bagasse and nutrient minerals, can operate as nutritional support for microbial growth (TAN et al., 2016; CASTRO-AGUIRRE et al., 2018). The influence of organic materials on the biodegradation rate of the bio-pots described in this study can be associated with the priming effect, because changes in soil microbial characteristics are expected when adding substrates that are rich in C and N content (WANG et al., 2015; TAKRITI et al., 2018). This finding was evidenced by the increases in the soil TOC and TON (Table 3), which made it possible to obtain C/N ratio, one of the most important parameters affecting the biodegradation of organic materials in soil. This parameter acts by lowering the biodegradation rate as the C/N ratio of the materials increases (YE et al., 2018; SALEHPOUR et al., 2018).

The transformations of the bio-pots materials into microbial biomass and energy is expected as a result of the biodegradation activity as well as the colonization of the surface and inner spaces of the samples subjected to biodegradation (MOREIRA et al., 2018). The MBC and MBN values are indicative of microbial activity and their application within monitoring biological indicators related to soil quality have been put to broad use, because they promptly respond to small changes in soil. In addition, practices that increase these indicators contribute to the conservation of agriculture through improved soil quality activity (BÜNEMANN et al., 2018; LI et al 2018).

The release of CO₂ by microorganisms from R_B provides information on the activity of microbial populations (BANEGAS et al., 2007) and their results did not show large increases compared to MBC. Small changes in soil respiration may cause ecosystems to switch from a sink to a source of C. One of the indicators of this soil balance C is the metabolic quotient (qCO₂) which indicates the microbial energy demand and its potential to use C-sources (ISLAM; WEIL, 2000; PABST et al., 2016). Disturbances (or any other stress) apparently cause an elevation of qCO₂ as the

microorganisms become less efficient at conserving C (ANDERSON; DOMSCH, 1993). In the majority of the biodegradation periods evaluated, it was possible to observe that the samples buried in the soil did not increase the qCO_2 , even providing high concentrations of C, evidenced by TOC and MBC. The low loss of C to the atmosphere indicates a high efficiency of the microorganisms in convert C-nutrient into C-biomass.

Creamer et al. (2007) reported that microorganisms under N enrichment may slow decomposition of recalcitrant C due to their lowered N requirements by microorganisms. In this study we observed large increases in TON, as well as MBN (Table 3). Microbial use of organic N in the forms of amino acids and peptides has been observed to be universally rapid across ecosystems (JONES et al., 2009; FARRELL et al., 2013).

The data presented here demonstrated efficiency in the incorporation of the organic N by the high values obtained of MBN and constitute an important mechanism of conservation of N in the ecosystems by the continuous process of growth and microbial death. Mooshammer et al. (2014) attributed an efficient incorporation of organic N in systems with high values of biomass, reducing the losses of N in the soil. However, the results obtained were influenced by the microbial communities according to the type of substrate present in the soil.

The materials subjected to biodegradation in this work influenced the maintenance of pH values, which did not decrease as observed in the control soil and provided increase P availability in soil (Table 4). Variations in pH of materials submitted to biodegradation are related to the metabolic activity of associated microbiota, which buffers the local environment to reach optimal pH values for its metabolic activity (ROUSK et al., 2010; BOWLES et al., 2014). Regarding the high values of P available in the soil the explanation for this increase is due to the components of the formulation, among them rock phosphate. This mineral has been recognized as a valuable alternative for P fertilizers, however its application has resulted in accumulation of P in the soil, which requires mobilization (SOLTANGHEISI et al., 2018), which can be performed by the phosphate-solubilizing microorganisms (PSM). However, the process of P-solubilization is a complex phenomenon, which is severely affected by many factors. The impacts of environmental factors, such as temperature, pH, oxygen concentration on microbial P-solubilizing capability have been investigated (ZHU et al., 2012; CHEN et al.,

2006), but there is no study on the influence of the interaction of biodegradable polymeric materials with microbial communities and PSM on solubilizing phosphate.

5. CONCLUSIONS

The materials developed with fully renewable components by mold-inject, has proven to be a versatile product with use in several areas. Suitable for replacing non-biodegradable plastics with the possibility of the addition of tannin, which slows the rate of biodegradation, which when used in the form of pots has shown that it can provide nutrient release to the soil, influencing the microbial community involved in its soil biodegradation, acting as biotechnological input to improve the soil quality. The pots can also be considered as good support for PGPB immobilization by the adequate maintenance of cell density and for improving the performance of cultivated plants in these pots.

REFERENCES

- ANDERSON, T. H.; DOMSCH, K. H. The metabolic quotient for CO₂ (qCO₂) as a specific activity parameter to assess the effects of environmental conditions, such as pH, on the microbial biomass of forest soils. **Soil biology and biochemistry**, v. 25, n. 3, p. 393–395, 1993.
- BANEGAS, V.; MORENO, J. L.; MORENO, J. I.; GARCÍA, C.; LEÓN, G.; HERNÁNDEZ, T. Composting anaerobic and aerobic sewage sludges using two proportions of sawdust. **Waste Management**, v. 27, n. 10, p. 1317–1327, 2007.
- BASHAN, Y.; DE-BASHAN L. E.; PRABHU, S. R. Superior polymeric formulations and emerging innovative products of bacterial inoculants for sustainable agriculture and the environment. **Agriculturally Important Microorganism**, p. 15–46, 2016.
- BASHAN, Y.; DE-BASHAN, L. E.; PRABHU, S. R.; HERNANDEZ, J. P. Advances in plant growth-promoting bacterial inoculant technology: formulations and practical perspectives (1998–2013). **Plant Soil**, v. 378, p. 1–33, 2014.
- BASHAN, Y. Alginate beads as synthetic inoculant carriers for the slow release of bacteria that affect plant growth. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 51, p. 1089–1098, 1986.
- BERNINGER, T.; LÓPEZ, O. G.; BEJARANO, A.; PREININGER, C.; SESSITSCH, A. Maintenance and assessment of cell viability in formulation of non-sporulating bacterial inoculants. **Microbial Biotechnology**, v. 11, n. 2, p. 277–301, 2018.

BOSSIO, D. A.; SCOW, K. M. Impact of carbon and flooding on the metabolic diversity of microbial communities in soil. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 61, p. 4043–4050, 1995.

BOUMA, J.; VAN ITTERSUM, M. K.; STOORVOGEL, J. J.; BATJES, N. H.; DROOGERS, P.; PULLEMAN, M. M. Soil capability: exploring the functional potentials of soils. In: Field, D.J.e.a. (Ed.), *Global Soil Security*. **Springer International Publishing**, Switzerland, p. 27–44, 2017..

BOWLES, T. M.; ACOSTA-MARTÍNEZ, V.; CALDERÓN, F.; JACKSON, L. E. Soil enzyme activities, microbial communities, and carbon and nitrogen availability in organic agroecosystems across an intensively-managed agricultural landscape. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 68, n. September 2014, p. 252–262, 2014

BROOKES, P. C.; LANDMAN, A.; PRUDEN, G.; JENKINSON, D. S. Chloroform fumigation and the release of soil nitrogen: a rapid direct extraction method to measure microbial biomass nitrogen in soil. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 17. P. 837–842, 1985.

BÜNEMANN, E. K.; BONGIORNO, G.; BAI, Z.; CREAMER, R. E.; DEYN, G.; GOEDE, R.; FLESKENS, L.; GEISSEN, V.; KUYPER, T. W.; MÄDER, A.; PULLEMAN, M.; SUKKE, W.; GROENIGEN, J. W. V.; BRUSSAARD, L. Soil quality – A critical review. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 120, p. 105–125, 2018.

CÁCERES, E. A. R. Improved Medium for Isolation of *Azospirillum* spp. **Applied and environmental microbiology**, v. 44, n. 4, p. 990-991, 1982.

CASTRO-AGUIRRE, E.; AURAS, R.; SELKE, S.; RUBINO, M.; MARSH, T. Impact of nanoclays on the biodegradation of poly (lactic acid) nanocomposites. **Polymers**, v. 10, n. 2, p. 202, 2018.

CHEN, Y. P.; REKHA, P. D.; ARUN, A. B.; SHEN, F. T.; LAI, W. A.; YOUNG, C. C. Phosphate solubilizing bacteria from subtropical soil and their tricalcium phosphate solubilizing abilities. **Applied Soil Ecology**, v. 34, p. 33–41, 2006.

CHUNG, K. T.; WONG, T. Y.; WEI, C. I.; HUANG, Y. W.; LIN, Y. Tannins and human health: A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, v. 38, n. 6, p. 421–464, 1998.

CRAINE, J. M.; MORROW, C.; FIERER, N. Microbial nitrogen limitation increases decomposition. **Ecology**, v. 88, p. 2105–2113, 2007.

DOBBELARE, S.; VANDERLEYDERN, J.; OKON, Y. Plant-growth promoting effects of diazotrophs in the rhizosphere. **Critical Reviews in Plant Sciences**, 22:107-149, 2003.

DORAN, J. W.; PARKIN, T. B. Defining and assessing soil quality. In: DORAN, J. W.; COLEMAN, D. C.; BEZDICEK, D. F.; STEWART, B.A. (Eds.), **Defining Soil Quality for a Sustainable Environment**. SSSA, Madison, WI, p. 3–21, 1994.

ETEME, N.; SEPAHY, A. A.; MOHEBALI, G.; YAZDIAN, F.; MEISAM, O. Enhancement of bio-desulfurization capability of a newly isolated thermophilic bacterium using starch/iron nanoparticles in a controlled system. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 120, p. 1801–1809, 2018.

FARRELL, M.; PRENDERGAST-MILLER, M.; JONES, D. L.; HILL, P. W.; CONDRON, L. M. Soil microbial organic nitrogen uptake is regulated by carbon availability. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 77, p. 261–267, 2014.

GE, J.; SHI, X.; CAI, M.; WU, R.; WANG, M. A novel biodegradable antimicrobial PU foam from wattle tannin. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 90, n. 10, p. 2756–2763, 2003.

HERRMANN, L.; LESUEUR, D. Challenges of formulation and quality of biofertilizers for successful inoculation. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 97, n. 20, p. 8859–73, out. 2013.

ISHIZAKI, M. H.; VISCONTE, L. L. Y.; FURTADO, C. R. G.; LEITE, M. C. A. M.; LEBLANC, J. L. Caracterização mecânica e morfológica de compósitos de polipropileno e fibras de coco verde: influência do teor de fibra e das condições de mistura. **Polímeros**, v. 16, n. 3, p. 182–186, 2006.

ISLAM, K. R.; WEIL, R. R. Soil quality indicator properties in mid-Atlantic soils as influenced by conservation management. **Journal of Soil and Water Conservation**, v. 55, n. 1, p. 69–78, 2000.

JOERGENSEN, R.G.; BROOKES, P.C. Ninhydrin-reactive nitrogen measurements of microbial biomass in 0.5 M K₂SO₄ soil extracts. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 22, p. 1023–1027, 1990.

JONES, D. L.; KIELLAND, K.; SINCLAIR, F. L.; DAHLGREN, R. A.; NEWSHAN, K. K.; FARRAR, J. F.; MURPHY, D. V. Soil organic nitrogen mineralization across a global latitudinal gradient. **Global Biogeochemical Cycles**, v. 23, GB1016, 2009.

JONES, D. L.; KIELLAND, K. Amino acid, peptide and protein mineralization dynamics in a taiga forest soil. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 55, n. 3, p. 60–69, 2012.

LI, Y.; CHANG, S. X.; TIAN, L.; ZHANG, Q. Conservation agriculture practices increase soil microbial biomass carbon and nitrogen in agricultural soils: A global meta-analysis. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 121, p. 50–58, 2018.

LIU, C.; XU, Y.; HAN, X.; CHANG, X. The fabrication and the use of immobilized cells as test organisms in a ferricyanide-based toxicity biosensor. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 37, n. 2, p. 329–335, 2017.

MADBOULY, S. A.; SCHRADER, J. A.; SRINIVASAN, G.; LIU, K.; MCCABE, K. G.; GREWELL, D.; GRAVES, W. R.; KESSLER, M. R. Biodegradation behavior of bacterial-based polyhydroxyalkanoate (PHA) and DDGS composites. **Green Chemistry**, v. 16, p. 1911–1921, 2014.

MARCELINO, P. R. F.; MILANI, K. M. L.; MALI, S.; SANTOS, O. J. A. P. dos; DE OLIVEIRA, A. L. M. Formulations of polymeric biodegradable low-cost foam by melt extrusion to deliver plant growth-promoting bacteria in agricultural systems. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 100, n. 16, p. 7323–7338, 2016.

MAUSEL, P. W. 1971. Soil quality in Illinois—an example of a soils geography resource analysis. **The Professional Geographer**, v. 23, p. 127–136, 1971.

MOOSHAMMER, M.; WANEK, W.; HAMMERLE, I.; FUCHSLUEGER, L.; HOFHANSL, F.; KNOLTSCH, A.; SCHNECKER, J.; TAKRITI, M.; WATZKA, M.; WILD, B.; KEIBLINGER, K. M.; ZECHMEISTER-BOLTENSTERN, S.; RICHTER, A. Adjustment of microbial nitrogen use efficiency to carbon:nitrogen imbalances regulates soil nitrogen cycling. **Nature Communications**, v. 5, n. 3694, 2014.

MOREIRA, A. A.; MALI, S.; YAMASHITA, F.; BILCK, A. P.; PAULA, M. T.; MERCI, A.; OLIVEIRA, A. L. M. Biodegradable plastic designed to improve the soil quality and microbiological activity. **Polymer Degradation and Stability**, v. 158, p. 52–63, 2018.

PABST, H.; GERSCHLAUER, F.; KIESE, R.; KUZYAKOV, Y. Land use and precipitation affect organic and microbial carbon stocks and the specific metabolic quotient in soils of eleven ecosystems of MT. Kilimanjaro, Tanzania. **Land Degradation and Development**, v. 27, p. 592–602, 2016.

PAVAN, M. A.; BLOCH, M. F.; ZEMPULSKI, H. D. C.; MIYAZAWA, M.; ZOCOLER, D. C. Manual de análise química do solo e controle de qualidade. Londrina, Brazil, **IAPAR-circular 76**, 1992.

PII, Y.; MIMMO, T.; TOMASI, N.; TERZANO, R.; CESCO, S.; CRECCHIO, C. Microbial interactions in the rhizosphere: beneficial influences of plant growth-promoting rhizobacteria on nutrient acquisition process. **Biology and Fertility of Soils**, v. 51, p. 403–415, 2015.

ROUSK, J.; BÅÅTH, E.; BROOKES, P. C.; LAUBER, C. L.; LOZUPONE, C.; CAPORASO, J. G.; KNIGHT, R.; FIERER, N. Soil bacterial and fungal communities across a pH gradient in an arable soil. **The ISME Journal**, v. 4, n. 10, p. 1340–1351, 2010.

SALEHPOUR, S.; JONOBI, M.; AHMADZADEH, M.; SIRACUSA, V.; RAFIEIAN, F.; OKSMAN, K. Biodegradation and ecotoxicological impact of cellulose nanocomposites in municipal solid waste composting. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 111, n. 2017, p. 264–270, 2018.

SILVA, E. E.; AZEVEDO, P. H. S.; DE-POLLI, H. **Determinação da Respiração Basal (RBS) e cociente metabólico do solo (qCO₂)**, Comunicado Técnico 99, EMBRAPA Agrobiologia, p.4, 2007a.

SILVA, E. E.; AZEVEDO, P. H. S.; DE-POLLI, H. **Determinação do Carbono da Biomassa Microbiana do Solo (BMS-C)**, Comunicado Técnico 98, EMBRAPA Agrobiologia, p. 6, 2007b.

SOLTANGHEISI, A.; RODRIGUES, M.; COELHO, M. J. A.; GASPERINI, A. M.; SARTOR, L. R.; PAVINATO, P. S. Changes in soil phosphorus lability promoted by phosphate sources and cover crops. **Soil and Tillage Research**, v. 179, p. 20–28, 2018.

SPARLING, G. P.; WEST, A. W. A direct extraction method to estimate soil microbial-C calibration in situ using microbial respiration and ^{14}C -labeled cells. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 20, n. 3, p. 337–343, 1988.

STREETER, J. G. Effect of trehalose on survival of *Bradyrhizobium japonicum* during desiccation. **Journal of Applied Microbiology**, v. 95, p. 484–491, 2003.

TAKRITI, M.; WILD, B.; SCHNECKER, J.; MOOSHAMMER, M.; KNOLTSCH, A.; LASHCHINSKIY, N.; ALVES, R. J. E.; GENTSCH, N.; GITTEL, A.; MIKUTTA, R.; WANEK, W.; RICHTER, A. Soil organic matter quality exerts a stronger control than stoichiometry on microbial substrate use efficiency along a latitudinal transect. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 121, p. 212–220, 2018.

TAN, Z.; YI, Y.; WANG, H.; ZHOU, W.; YANG, Y.; WANG, C. Physical and degradable properties of mulching films prepared from natural fibers and biodegradable polymers. **Applied Sciences**, v. 6, n. 5, 2016.

VANCE, E. D.; BROOKES, P. C.; JENKINSON, D. S. An Extraction Method for Measuring Microbial Biomass C. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 19, n. 6, p. 703–707, 1985.

WANG, H.; BOUTTON, T. W.; XU, W.; HU, G.; JIANG, P.; BAI, E. Quality of fresh organic matter affects priming of soil organic matter and substrate utilization patterns of microbes. **Scientific Reports**, v. 5, n. March, p. 1–13, 2015.

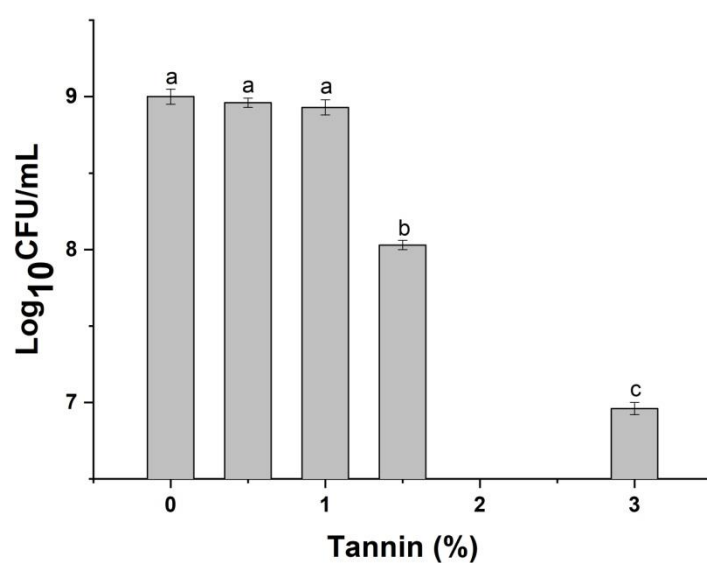
YANG, S.; MADBOULY, S. A.; SCHRADER, J. A.; SRINIVASAN, G.; GREWELL, D.; MCCABE, K. G.; KESSLER, M. R.; GRAVES, W. R. Characterization and biodegradation behavior of bio-based poly(lactic acid) and soy protein blends for sustainable horticultural applications. **Green Chemistry**, v. 17, n. 1, p. 380–393, 2015.

YE, J.; PEREZ, P. G.; ZHANG, R.; NIELSEN, S.; HUANG, D.; THOMAS, T. Effects of different C/N ratios on bacterial compositions and processes in an organically managed soil. **Biology and Fertility of Soils**, v. 54, n. 1, p. 137–147, 2018.

ZHU, H.; SUN, L.; ZHANG, Y.; ZHANG, X.; QIAO, J. Conversion of spent mushroom substrate to biofertilizer using a stress-tolerant phosphate-solubilizing *Pichia farinose* FL7. **Bioresource Technology**, v. 111, p. 410–416, 2012.

SUPPLEMENTARY MATERIAL 1

Supplement material 1. Survival of *A. brasiliense* Ab-V5 in composite materials formulated with 0; 0.5; 1; 1.5 and 3% of concentrations of tannin. Values of colony forming units (CFU) are presented as $\log_{10}$. Different letters indicate statistically significant differences according to Tukey's test ($p < 0.05$). $n = 4$.



ANEXOS

ANEXO A – PATENTE 1: Número do Processo BR 1020180072269

10/04/2018 870180028823
15:35

29409161802309496

Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT

Número do Processo: BR 10 2018 007226 9

Dados do Depositante (71)

Depositante 1 de 1

Nome ou Razão Social: UNIVERSIDADE ESTADUAL DE LONDRINA

Tipo de Pessoa: Pessoa Jurídica

CPF/CNPJ: 78640489000153

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Jurídica: Órgão Público

Endereço: RODOVIA CELSO GARCIA CD, KM 380 S/N CAMPUS
UNIVERSITARIO

Cidade: Londrina

Estado: PR

CEP: 86055-900

País: Brasil

Telefone: (043) 3371 5812

Fax: (043) 3371 5812

Email: aintecpi@uel.br

Dados do Pedido

Natureza Patente: 10 - Patente de Invenção (PI)

Título da Invenção ou Modelo de Utilidade (54): BIOFERTIPLÁSTICO: MATERIAL TERMOPLÁSTICO MOLDÁVEL A QUENTE PARA USO EM SUBSTITUIÇÃO AOS PLÁSTICOS SINTÉTICOS CONVENCIONAIS

Resumo: A presente invenção se refere ao processo de produção de um material polimérico termoplástico biodegradável e constituído exclusivamente de matérias primas renováveis e biodegradáveis, produzido por injeção termoplástica. O material desenvolvido constitui quantidades definidas de ácido polilático (PLA), fibra de cana-de-açúcar, amido e glicerol, além de nutrientes e sais minerais que tornam o processo de descarte amigável e ambientalmente seguro. O material produzido pode ser aplicado para o acondicionamento de produtos e organismos (mudas vegetais), para o fabrico de utensílios e embalagens, e outros produtos obtidos pelo processo de extrusão e injeção termoplástica.

Figura a publicar: FIG 1

INVENTORES:

André Luiz Martinez de Oliveira

Suzana Mali de Oliveira

Fábio Yamashita

Amanda Aleixo Moreira

Fabíola Azanha de Carvalho

Ana Paula Bilck



Escritório de Propriedade Intelectual

FORMULÁRIO DE DECLARAÇÃO DE INVENÇÃO

O Formulário de Declaração de Invenção (FDI) deve ser usado por professores, funcionários e alunos da UEL e pelas empresas da Intuel/Aintec para declarar a criação de uma invenção e solicitar sua propriedade intelectual.

Após o preenchimento do FDI, protocole na UEL (na SAUEL) endereçando-o para:

AINTEC/UEL

Escritório de Propriedade Intelectual – EPI

Com isto sua Declaração de Invenção fica oficialmente registrada e será enviada ao Escritório de Propriedade Intelectual (EPI) da Aintec para análise, parecer e outras providências.

Os inventores devem ler a resolução nº 251/2003 que regulamenta sobre a participação de docentes, servidores e alunos no resultado financeiro da exploração dos direitos de propriedade intelectual, no endereço www.aintec.uel.br/aintec/legislação.

Havendo dúvidas no preenchimento da FDI contate o EPI da Aintec pelo e-mail: aintecsec@uel.br

1. INFORMAÇÃO PESSOAL**Nome para contato: André Luiz Martinez de Oliveira****Empresa/Instituição: Universidade Estadual de Londrina****Centro: Centro de Ciências Exatas****Departamento: Bioquímica e Biotecnologia****Tel: 43 3371 5473 / 43 98405 2547****e-mail: almoliva@uel.br**

2. TÍTULO PROPOSTO PARA A INVENÇÃO: Biofertiplástico: um novo material termoplástico moldável a quente para uso em substituição aos plásticos sintéticos convencionais

3. A INVENÇÃO APRESENTA NOVIDADE*? (X) SIM () NÃO

*A invenção será considerada nova quando não compreendida no estado da técnica. O estado da técnica é constituído por tudo aquilo tornado público antes da data de depósito do pedido de patente.

4. A INVENÇÃO APRESENTA ATIVIDADE INVENTIVA*? (X) SIM () NÃO

*A invenção é dotada de atividade inventiva sempre que, para um técnico no assunto, não decorra de maneira evidente ou óbvia do estado da técnica.

5. RESUMO DA INVENÇÃO (Máximo 200 palavras)*

*O resumo será publicado pelo INPI.

Campo de Aplicação:

Desenvolvimento de um material termoplástico biodegradável e produzido com materiais renováveis, compatível com o processamento por extrusão e injeção a quente.

Este pedido de patente reivindica a proteção intelectual ao processo de produção de uma matriz termoplástica biodegradável e constituída exclusivamente de materiais renováveis e biodegradáveis, compatível com os processos convencionais de extrusão e injeção a quente para a moldagem do material resultante. O material desenvolvido constitui quantidades definidas de ácido polilático (PLA), fibra de cana-de-açúcar na fração milimétrica, amido e glicerol, além de nutrientes e sais minerais que tornam o processo de descarte ambientalmente seguro. O material produzido pode ser aplicado para o acondicionamento de produtos e organismos (mudas vegetais), para o fabrico de

utensílios e embalagens, e outros produtos obtidos pelo processo de extrusão-injeção a quente.

6. DESCREVA O PROBLEMA OU DESAFIO TÉCNICO QUE A INVENÇÃO SE PROPÕE A SOLUCIONAR.

A produção mundial de plástico em 2015 foi de 322 milhões de toneladas, segundo relatório da associação europeia das empresas produtoras de plástico – PlasticEurope (2016). A china concentra a maior produção, com 27,8% do total produzido no mundo, seguida pela a Europa com 18,5% da produção mundial; a América Latina concentra somente 4,4% da produção mundial de plásticos. Além disso, os estudos projetam aumento crescente da demanda de plástico, com uma estimativa de produção de 1,124 milhões de toneladas em 2050 (Fórum Econômico Mundial, 2016). Esses dados indicam que o mercado para estes polímeros é crescente, portanto, comporta a entrada de materiais com características compatíveis aos plásticos.

Com relação aos diferentes tipos de plásticos, o polipropileno (PP) é o mais produzido e aquele que apresenta maior demanda, com quase 20% da produção total de plásticos, seguido pelo polietileno de baixa densidade (PEBD) e polietileno linear de baixa densidade (PELBD), ambos compreendendo pouco mais de 17% da produção mundial de plásticos. Estes materiais são utilizados na confecção de produtos com grande importância para a atividade econômica, e estão presentes na vida cotidiana de nossa sociedade. As características intrínsecas de versatilidade de aplicação, aliadas à atual disponibilidade e baixo custo, promovem a ampla utilização dos plásticos nas mais diversas atividades e aplicações.

Entretanto, a utilização ubíqua de produtos plásticos traz preocupações relevantes sobre o impacto ambiental destes materiais (JAYANTH et al., 2017; GU et al., 2017). A grande estabilidade destes materiais e sua resistência à decomposição natural, bem com a sua destinação inadequada ao final do ciclo de vida de materiais plásticos, resultam em problemas que afetam os seres humanos e seu ambiente, como também os ambientes naturais. WATERS et al. (2016) atribuiu inclusive a ocorrência de uma nova era geológica, o antropoceno, decorrente das intervenções humanas no planeta, que se intensificaram em meados do século XX, sendo que a geração de resíduos plásticos é um dos fatores críticos para essa nova era.

A reciclagem dos plásticos poderia ser uma solução para contornar os problemas ambientais causados, entretanto quantidade de plástico reciclado é muito menor do que a quantidade inserida anualmente no planeta, devido ao baixo valor deste material reciclado. A grande parte dos resíduos plásticos é depositada em aterros sanitários ou disposta no meio ambiente sem uma preocupação com suas consequências a longo prazo. O CEMPRE – Compromisso Empresarial para Reciclagem (2015), informou que no ano de 2011, 21,7% do plástico foram reciclados no Brasil, representando 953 mil

toneladas. O país que mais recicla plástico é a Suécia com 53% dos polímeros reciclados; isso demonstra que mesmo em países desenvolvidos, a quantidade de reaproveitamento de plástico pode ser considerada baixa.

A produção industrial da maioria dos polímeros plásticos utiliza recursos petroquímicos como matéria-prima, o que representa, aproximadamente, 7% do consumo global de petróleo e gás (WILLIAMS; HILLMYER, 2008). Os recursos petroquímicos não são renováveis e, a longo prazo, não fornecerão matérias-primas suficientes a custos economicamente viáveis. Além disso, os mercados são sensíveis a flutuações de preços causadas por diversos fatores econômicos e políticos. As preocupações ambientais decorrentes do uso de materiais não degradáveis, como é o caso da maioria dos polímeros sintéticos derivados do petróleo, representam desafios significativos para o desenvolvimento sustentável. Esses fatores impulsionam a busca por tecnologias inovadoras que proporcionem a obtenção de novos materiais poliméricos que sejam biodegradáveis, obtidos preferencialmente a partir de matérias-primas renováveis, e que possam ser aplicados industrialmente em substituição aos polímeros plásticos sintéticos (ZHANG et al., 2017).

Existem disponíveis no mercado alguns polímeros biodegradáveis sintéticos, produzidos a partir de recursos petroquímicos, mas que apresentam modificações em suas estruturas carbônicas moleculares que permitem sua biodegradabilidade, como o poli (butileno adipato co-tereftalato), ou PBAT, e o álcool polivinílico, ou PVA (BRANDELERO et al., 2011; HALIMA, 2016). Recentemente, novos materiais poliméricos produzidos a partir de fontes renováveis vêm ganhando importância, uma vez que apresentam propriedades mecânicas semelhantes ao politereftalato de etileno (PET), ou seja, possuem comportamento termoplástico que possibilita sua aplicação industrial (PANG et al., 2010). Dentre estes materiais estão o ácido polilático, ou PLA, e a classe de polímeros denominada poli-hidroxialcanoatos, ou PHA, ambos produzidos a partir da transformação da matéria orgânica mediada por microrganismos (WANG et al., 2005; MURARIU; DUBOIS, 2016).

Estes novos materiais constituem uma alternativa viável para a substituição dos polímeros plásticos sintéticos com vantagens ecológicas e ambientais significativas, uma vez que são recicláveis biodegradáveis e produzidos a partir de matéria-prima renovável. Entretanto, a pequena oferta destes materiais em comparação aos similares sintéticos resulta em custos comparativamente muito superiores, o que limita sua ampla aplicação industrial. Uma das soluções disponíveis para diminuição do custo dos produtos preparados com materiais plásticos biodegradáveis de origem renovável, constitui o desenvolvimento de misturas (blendas) de materiais que possibilitem a diminuição da quantidade de biopolímeros utilizada sem sacrificar as características termoplásticas do composto formado. Este objetivo pode ser alcançado pela

incorporação de polímeros de origem vegetal e/ou animal, como o amido, a celulose, a quitosana, a pectina, ou mesmo o uso de proteinase, outros polímeros biológicos que apresentem disponibilidade elevada, regular e baixo custo, além das características de biodegradabilidade e renovabilidade.

Existe uma grande demanda mundial por materiais produzidos a partir de fontes renováveis, e que possam ser completamente inócuos ao ambiente quando ao final de seu ciclo de vida (descarte). Esta demanda ocorre como resposta da sociedade aos problemas resultantes do impacto das diferentes atividades humanas sobre os ambientes naturais, levando à maior valorização dos “produtos sustentáveis”- seja do ponto de vista ambiental, econômico ou social – nos mais diversos setores de atividade econômica, como a agricultura, a indústria de alimentos, os transportes, a eletrônica e a saúde (BCC RESEARCH, 2014; BABU; O’CONNOR; SEERAM, 2013). Neste sentido, materiais e energia produzidos a partir do petróleo e seus derivados possuem grande potencial para contribuir com a diminuição da qualidade ambiental, como por exemplo os resíduos plásticos, que constituem grande parte dos resíduos sólidos produzidos em ambientes urbanos (JACOBI; BESEN, 2011). Considerando a importância econômica, ambiental e social da utilização de produtos plásticos biodegradáveis com características sustentáveis em substituição aos produtos plásticos sintéticos obtidos de petroderivados, o desenvolvimento de novos materiais a partir de fontes totalmente renováveis e biodegradáveis representa uma alternativa promissora e altamente viável.

7. DESCREVA AS CONHECIDAS SOLUÇÕES PARA O PROBLEMA OU DESAFIO, SEUS LIMITES OU DEFICIÊNCIAS.

Uma das primeiras alternativas apresentadas para diminuir o uso de materiais plásticos sintéticos foi a utilização destes polímeros em combinação com outros de origem biológica, de maneira a reduzir quantitativamente a participação de plásticos sintéticos em produtos duráveis. Embora válida, esta alternativa vem sendo substituída por outras que compreendem a substituição completa dos materiais derivados de petroquímicos por novos materiais de origem biológica. Estes novos materiais possuem alta biodegradabilidade, e podem atuar na mitigação do efeito estufa uma vez que sua produção requer o sequestro do CO₂ atmosférico, e sua transformação industrial resulta na emissão de menores quantidades deste gás no ambiente comparativamente aos plásticos sintéticos (RAVENSTIJN, 2010; XU et al., 2015).

De certa maneira, o elevado custo das matrizes poliméricas de origem renovável ainda constitui fator limitante para sua utilização como matéria-prima principal a ser aplicada na produção de bens. Por outro lado, o uso destes materiais como aditivos, compondo uma fração da composição final de blendas, possibilita a obtenção de novos materiais compostos que apresentem características mecânicas desejáveis para aplicação na indústria. Blendas de materiais formulados com biopolímeros naturais

compondo a maior parte da formulação, como celulose, quitina, quitosana, amido e outros polissacarídeos, dentre outros materiais renováveis, vêm sendo desenvolvidas com sucesso no desenvolvimento de materiais com grande potencial de aplicação industrial e dentro dos preceitos de sustentabilidade (MURARIU; DUBOIS, 2016).

Entretanto, muitas vezes estes componentes alternativos são imiscíveis ou de difícil compatibilização em formulação do tipo blenda, o que dificulta ou impede a obtenção de materiais compostos homogêneos. A incompatibilidade observada entre componentes de uma formulação do tipo blenda pode envolver efeitos químicos e/ou físicos, resultantes de interações antagônicas em uma solução aquosa, diferenças na tensão superficial das moléculas, repulsão eletrostática, e fraca adesão interfacial entre os componentes, entre outros fatores. Qualquer que seja o efeito promotor da incompatibilidade, misturas de materiais que possuam tais características apresentam dificuldade para uma dispersão homogênea, baixa estabilidade da mistura e favorecimento de separação de fases durante o processamento, o que pode resultar em propriedades mecânicas indesejáveis na formulação final (NEWMAN, 1978).

Trabalhos sobre desenvolvimento de formulações biodegradáveis elaborados para substituição de materiais plásticos sintéticos foram desenvolvidos e estão disponíveis na literatura científica e em banco de dados de patentes. Dentre estes materiais, encontram-se misturas com base em PLA, amido ou fibras, variando os tipos de aditivos e os processos de produção empregados. Apesar disso, muitos dos materiais e processos apresentados incorporam componentes não renováveis na formulação e podem envolver várias etapas de processamento. Estas características resultam em aumento de custos de produção do(s) material(is) e não respondem pela demanda estrita ao desenvolvimento de materiais de base biológica (renováveis, biodegradáveis e ambientalmente seguros).

Por exemplo, os trabalhos de Huda et al. (2006) e Bledzki et al. (2009), e outros trabalhos apresentam o desenvolvimento materiais compósitos termoplásticos com base em PLA e moldáveis por injeção; entretanto, este polímero é utilizado como principal componente das formulações (70%). Estes materiais diferem do presente pedido de proteção intelectual, que utiliza PLA como constituinte minoritário da formulação (20 a 40%).

A patente chinesa CN1532217A, depositada 25 de março de 2003, trata da produção de embalagens biodegradáveis pelo processo de extrusão e injeção, a partir da mistura do amido de mandioca, poliolefinas (polímeros sintéticos não biodegradáveis, ex: polietileno), solventes, agentes de acoplamento e dióxido de titânio. Esta patente difere do presente pedido de proteção intelectual, que não utiliza compostos sintéticos ou solventes orgânicos em sua composição.

A patente brasileira PI0602428-9, depositada 28 de março de 2006, trata da

produção de laminados compósitos pelo processo de termoformagem direta, a partir da mistura de amido termoplástico e fibras de bananeira, cana-de-açúcar, luffa cylindrica e amianto crisotila. Esta patente difere do presente pedido de proteção intelectual, que não utiliza compostos amianto em sua composição e está adequada à industrialização pelo processo de injeção, que difere do processo de termoformagem.

A patente chinesa CN101161708A, depositada 11 de outubro de 2006, trata da produção de embalagens biodegradáveis pelo processo de extrusão, obtidas a partir de misturas de amido e poli (ácido lático) PLA, agente plastificante e agente de enchimento. Esta patente difere do presente pedido de proteção intelectual, que utiliza outros componentes orgânicos em sua composição e está adequada à industrialização pelo processo de injeção.

Na patente brasileira PI1106026-3, depositada 28 de setembro de 2011, trata da elaboração de material plástico biodegradável pelo processo de compressão a quente, obtidas pela mistura de fibras de coco, curauá, ou sisal, amido de mandioca ou de milho. Esta patente difere do presente pedido de proteção intelectual, que utiliza outros componentes orgânicos em sua composição e está adequada à industrialização pelo processo de injeção.

Na patente americana WO2012109144, depositada 06 de agosto de 2012, trata de misturas de PLA e produzidas com o auxílio de um processo que envolve o contato de uma poliolefina (polipropileno) como PLA e um modificador reativo (glicidil metacrilato grafiteado - PP-g-GMA), que atua como um agente compatibilizante. A mistura é submetida a moldagem por injeção. Esta patente difere do presente pedido de proteção intelectual, que não utiliza compostos sintéticos ou solventes orgânicos em sua composição.

8. DESCREVA COMO SUA INVENÇÃO SUPERA ESSES LIMITES E DEFICIÊNCIAS, DESTACANDO SUAS VANTAGENS E GANHOS.

Uma das dificuldades de se obter um material biodegradável termoplástico é a necessidade de obter resistência à altas temperaturas aplicadas no processo de termoformagem, sem que este processo ocasione carbonização do material ou seus componentes, ou perda de estrutura polimérica, ou resulte em distribuição heterogênea dos seus componentes. Além disso, materiais biodegradáveis formulados com blendas requerem interação compatível e distribuição homogênea estável entre seus componentes. Neste sentido, as formulações apresentadas compreendem materiais homogêneos, como pode ser visualizado nas micrografias eletrônicas de varredura (MEV) (Figura 1) e no aspecto final do produto resultante da termoformagem por injeção (Figura 2). A miscibilidade dos componentes da formulação é uma questão importante, uma vez que misturas miscíveis apresentam apenas uma fase; portanto, os constituintes

poliméricos misturam-se intimamente de forma a resultar em um novo polímero ou material, não havendo qualquer segregação entre os componentes (NEWMAN, 1978). No presente pedido de proteção intelectual, todos os materiais utilizados foram capazes de produzir uma matriz composta homogênea, apesar desta matriz ser composta por biopolímeros e outros materiais com propriedades físico-químicas distintas. Além disso, com exceção do mineral “fosfato de rocha” componente de 1,5 a 3,0% da formulação, todos os materiais utilizados são inteiramente obtidos a partir de fontes renováveis (materiais de base biológica), conferindo características únicas de biodegradabilidade, sustentabilidade e segurança ambiental na sua disposição como rejeito sólido ao final de seu ciclo de vida.

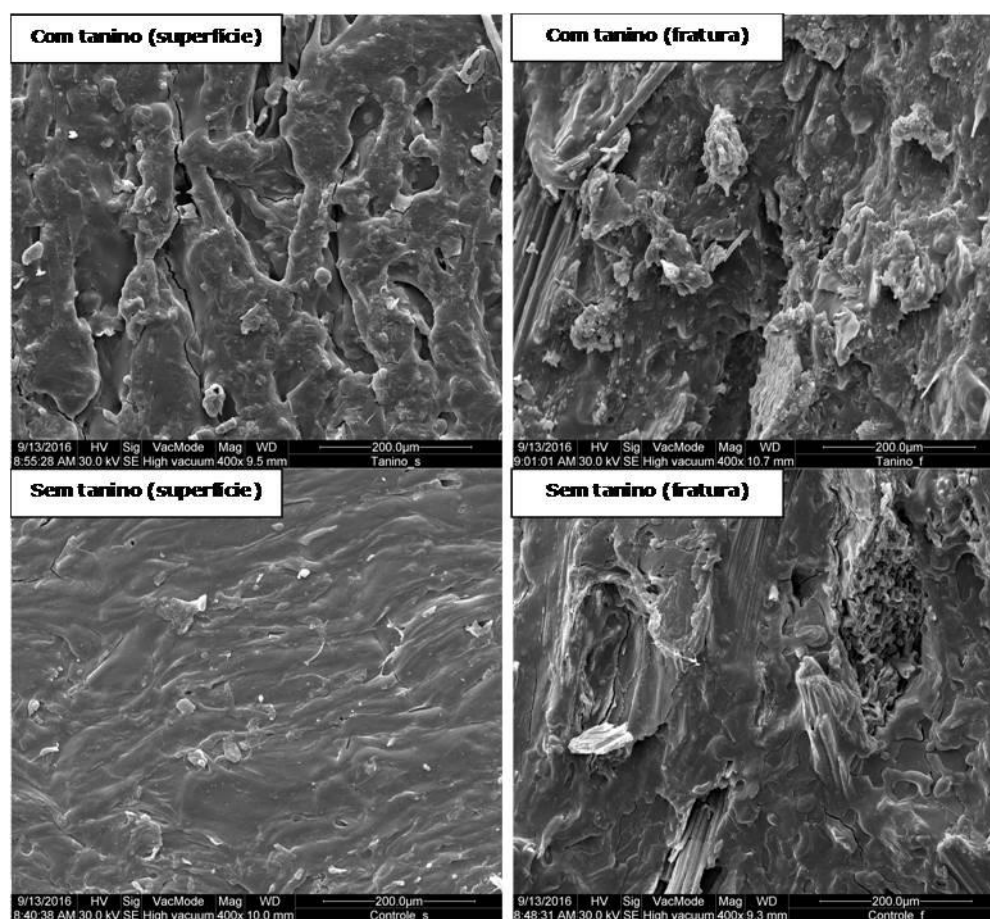


Figura 1. Micrografias obtidas por microscopia eletrônica de varredura (MEV) das superfícies e fraturas das formulações com e sem tanino.

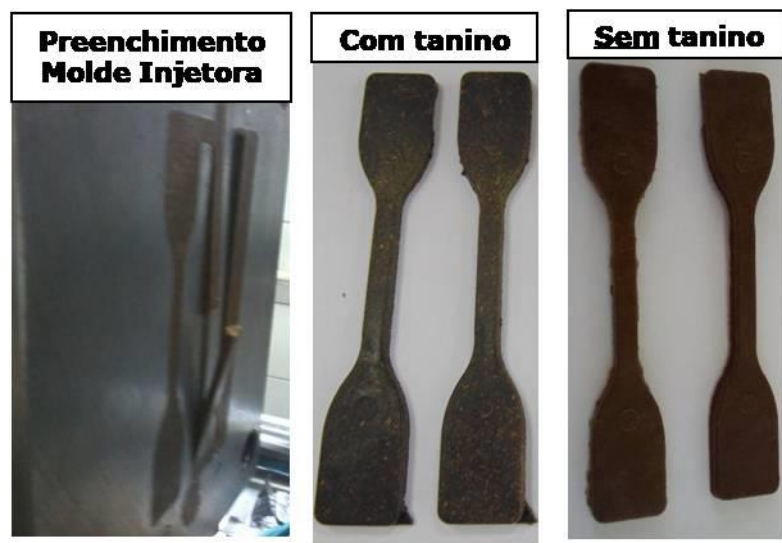


Figura 2. Imagens dos produtos resultantes do processo de termoformagem, preenchimento do molde na injetora e os corpos de prova das formulações com e sem tanino.

Os materiais desenvolvidos são compatíveis com os processos industriais comumente aplicados à produção de bens plásticos: extrusão seguida de moldagem por injeção. A moldagem por injeção é um dos métodos de processamento termoplástico mais importantes para a produção de peças pela indústria, e a aplicação de materiais orgânicos neste processo é bastante dificultada pela degradação que estes materiais sofrem pela ação de elevadas temperaturas. Neste sentido, o material apresentado neste pedido de proteção intelectual proporciona uma maior versatilidade para a confecção de bens e peças, uma vez que possui potencial para ser moldado em qualquer forma pelo processo de termoformagem. A principal preocupação na moldagem por injeção é a produção de materiais de alta qualidade, relacionados com características mecânicas, conformidade dimensional e aparência.

Os principais fatores que afetam a qualidade são as propriedades do polímero, design do molde e condições operacionais do processo de injeção, que se baseia nas relações entre a termomecânica do material, a sua morfologia e o comportamento mecânico da moldação (CUNHA, 2003; KAMAL et al., 2009; OSWALD et al., 2008). As propriedades mecânicas das formulações desenvolvidas estão disponíveis na Tabela 1.

Tabela 1. Propriedades mecânicas dos biofertilizantes plásticos.

Formulações	σ (MPa)	ϵ (%)	M.Y. (MPa)
Com tanino	$2,92 \pm 0,23^A$	$9,68 \pm 0,47^A$	$82,10 \pm 3,85^A$
Sem Tanino	$2,08 \pm 0,05^B$	$9,11 \pm 0,21^A$	$74,20 \pm 8,60^B$

σ : resistência à tração, ϵ : alongamento na ruptura, M.Y: módulo de Young.

Resultados expressos em (média $\pm$ desvio padrão).

Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa (teste de Tukey $p \leq 0,05$).

O sucesso da utilização de técnicas como a moldagem por injeção em polímeros biodegradáveis, obtido nas formulações propostas, é um caminho para a ampliação da escala para o mercado consumidor. Além disso, o material apresentou boa estabilidade quando submetido à condição de biodegradação, sendo possível aumentar ainda mais a vida útil dos bens e produtos formados pelo material apresentado pela adição de tanino, um polifenol de origem vegetal (Figura 3).

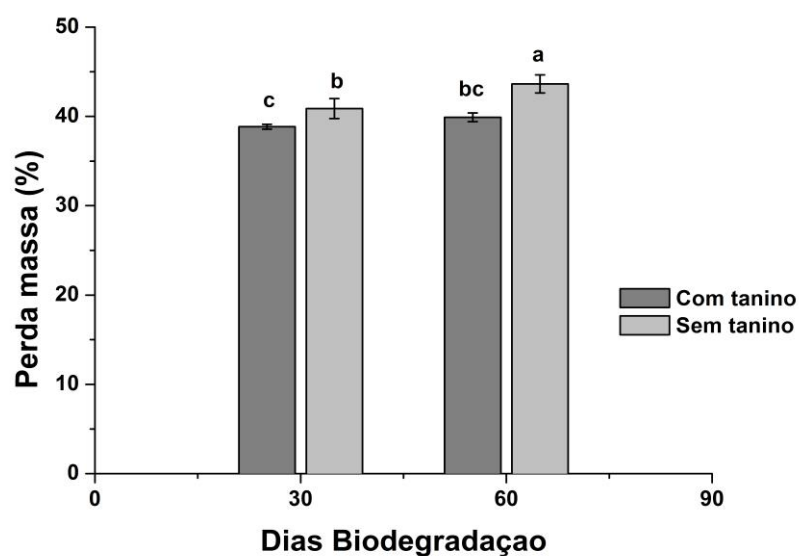


Figura 3. Perda de massa (%) em solo das formulações biodegradáveis com e sem tanino, após 30 e 60 dias de biodegradação.

9. DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO*

*O documento deve possuir suficiência descritiva para que um técnico no assunto seja capaz de reproduzir a invenção ao lê-lo.

Para o desenvolvimento das formulações biodegradáveis, foram utilizados os seguintes componentes e proporções:

- a) Resina de ácido polilático – PLA REVODE201, com densidade de 1,25 g/cm³ e índice de fusão 2,16 Kg/10 min (190 °C)
*20 a 40 g/100 g de formulação
- b) Amido
*15 a 25 g/100 g de formulação
- c) Glicerol
*10 a 15 g/100 g de formulação
- d) Bagaço de cana-de-açúcar
*15 a 30 g/100 g formulação
- e) Sacarose cristalizada
*1 a 2 g/100 g de formulação
- f) Leite em pó desnatado
*0,5 a 1 g/100 g de formulação
- g) Extrato de levedura
*2,5 a 5 g/100 g de formulação
- h) Fosfato de rocha
*1,5 a 3,0 g/100 g de formulação
- i) Tanino
*0,0 a 1,5 g/100 g de tanino.

Todos os materiais devem ser pesados e adicionados a um misturador, iniciando pelos materiais sólidos e adicionando o glicerol por último. O processo de mistura deve ser mantido até a obtenção de uma mistura visualmente homogênea (5 a 10 min de mistura contados após a adição do glicerol).

Após a obtenção de uma mistura homogênea, a mesma deve ser submetida ao processo de extrusão a quente, realizado em extrusora monorosca com perfil de temperatura de (165 °C) zona 1 de alimentação e transporte, (175 °C) zona 2 de plastificação do material, (170 °C) zona 3 de fluidez do material e (90 °C) zona 4 de saída na matriz do pellet; velocidade do parafuso de 35 rpm e matriz cilíndrica de 2 mm de diâmetro. O material extrudado é cortado automaticamente para formar “pellets” cilíndricos com cerca de 0,5 cm de comprimento.

O material extrusado segue para uma incubação de 3 horas a 40 °C para

desidratação; em seguida podem ser aplicados à moldagem por injeção, nas condições pré-determinadas para preenchimento de cada tipo de molde. No presente caso, foi utilizado um molde para corpo de prova no formato de “osso de cão” (amostra de teste tipo 4), conforme ASTM D638 (2003), com um perfil de temperatura de (150 °C) zona 1 de alimentação, (175 °C) zona 2 de transporte, (175 °C) zona 3 de injeção, (50 °C) zona 4 do molde. O tempo para injeção foi de 13 s, resfriamento de 30 s e 1 s para abertura do molde.

O molde utilizado foi adequado para a realização das propriedades mecânicas do material. A resistência à tração, o alongamento na ruptura e o módulo de Young foram analisados de acordo com o método ASTM D638-03, com algumas modificações, utilizando máquina de teste universal com uma distância inicial entre as garras de 60 mm e velocidade de tração de 50 mm.s⁻¹. Deixaram-se cinco corpos de prova de cada formulação em dessecador com umidade e temperatura controladas (53 ± 2% e 25 ± 2 °C, respectivamente) por dez dias antes da análise.

A morfologia microscópica dos produtos obtidos pelo processo de termoformagem extrusão-injeção foi avaliada por microscopia eletrônica de varredura (MEV), em microscópio eletrônico FEI Quanta 200 (USA), utilizando-se um acelerador de voltagem de 30kV. As amostras analisadas foram previamente secas, fixadas sobre suportes de alumínio e revestidas com uma película de ouro.

A biodegradabilidade das formulações foi determinada após 30 dias e 60 dias de imersão em substrato orgânico para produção de mudas florestais (pH: 7,3; H + Al: 2,03 cmolc/dm³; K: 1,14 cmolc/dm³; Ca: 9,46 cmolc/dm³; Mg: 3,41 cmolc/dm³; Al: 0,03 cmolc/dm³; saturação de base: 87,21%; P: 57,90 mg/Kg; matéria orgânica: 7,11%), sob condições controladas de temperatura (28 ± 1 °C) e umidade (50 %). Amostras dos produtos obtidos por termoformagem foram colocadas em um saco de malha não degradável (4 x 15 cm, previamente pesado) e enterrado a uma profundidade de 3 cm da superfície, em delineamento experimental inteiramente casualizado com cinco repetições.

10. QUAL A PRINCIPAL APLICAÇÃO DA TECNOLOGIA?*

*Em que indústria(a) a invenção proposta pode ser aplicada.

A tecnologia descrita e apresentada consiste em um material termoplástico biodegradável e produzido com materiais renováveis, compatível com o processamento por extrusão e injeção a quente para a produção de bens e produtos nos mais diversos setores de atividade econômica que tenham demanda por materiais plásticos, como a agricultura, a indústria de alimentos, transportes, eletrônica e saúde.

11. REFERÊNCIAS

BABU, R.; O'CONNOR, K.; SEERAM, R. Current progress on bio-based polymers and their future trends. **Progress in Biomaterials**, v. 2, p. 1–16, 2013.

BBC RESEARCH. J. Chen, Global Markets and Technologies for Bioplastics (BCC Research report 1607 PLS050C), 2014.

BRANDELERO, R. P. H.; GROSSMANN, M. V. E.; YAMASHITA, F. Effect of the method of production of the blends on mechanical and structural properties of biodegradable starch films produced by blown extrusion. **Carbohydrate Polymers**, v. 86, n. 3, p. 1344–1350, 2011.

CEMPRE – Compromisso Empresarial Para a Reciclagem. Disponível em: <<http://cempre.org.br/artigo-publicacao/ficha-tecnica/id/4/plasticos>> Acesso em: 20 de setembro de 2017.

CUNHA, A. Manual do Projetista para Moldes de Injeção de Plástico. **Centimfe**, 2003.

GU, F.; GUO, J.; ZHANG, W.; SUMMERS, P. A.; HALL, P. From waste plastics to industrial raw materials: A life cycle assessment of mechanical plastic recycling practice based on a real-world case study. **Science of The Total Environment**, v. 601–602, p. 1192–1207, 2017.

HALIMA, N. Poly(vinyl alcohol): review of its promising applications and insights into biodegradation. **RSC Adv.**, v. 6, n. 46, p. 39823–39832, 2016. Disponível em: <<http://xlink.rsc.org/?DOI=C6RA05742J>>.

JAYANTH, D.; KUMAR, P. S.; NAYAK, G. C.; KUMAR, J. S.; PAL, S. K.; RAJASEKAR, R. A Review on Biodegradable Polymeric Materials Striving Towards the Attainment of Green Environment. **Journal of Polymers and the Environment**, v. 1, p. 1–28, 2017.

KAMAL, M., ISAYEV, A.; LIU, S. Injection Molding Technology and Fundamentals, **Hanser Publications**, 2009.

MURARIU, M.; DUBOIS, P. PLA composites: From production to properties. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 107, p. 17–46, 2016.

NEWMAN, S. **Rubber Modification of Plastics**. In: Paul, R. R.; Newman, S. Polymer blend. New York: Academic, 1978.

OSSWALD, T.; TURNG, L.; GRAMANN, P. Injection Molding of Plastics - Handbooks, **CarlHanser Verlag**. 2008.

PANG, X.; ZHUANG, X.; TANG, Z.; CHEN, X. Polylactic acid (PLA): research, development and industrialization. **Biotechnology Journal**, v. 5, p. 1125–1136, 2010.

Plastics Europe. Plastics - the facts 2015. An Analysis of European Plastics Production, demand and waste data. Disponível em: <<http://www.plasticseurope.org/cust/documentrequest.aspx?DocID=65435>> Acesso em: 05/06/2017.

RAVENSTIJN, J. T. J. **The State-of-the-art on Bioplastics Products: Markets, Trends, and Technologies**, 2010.

XU, Y.; LOI, J.; DELGADO, P.; TOPOLKARAEV, V.; MCENEANY, R. J.; MACOSKO, C. W.; HILLMYER, M. A. Reactive compatibilization of polylactide/polypropylene blends. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 54, p. 6108–6114, 2015.

WANG, S.; SONG, C.; CHEN, G.; GUO, T.; LIU, J.; ZHANG, B.; TAKEUCHI, S. Characteristics and biodegradation properties of poly(3-hydroxybutyrate-co- 3-hydroxyvalerate)/organophilic montmorillonite (PHBV/OMMT) nanocomposite. **Polymer Degradation and Stability**, v. 87, n. 1, p. 69–76, 2005.

WATERS, C. N.; ZALASIEWICZ, J.; SUMMERHAYES, C.; BARNOSKY, A. D.; POIRIER, C.; GA, A.; CEARRETA, A.; EDGEWORTH, M.; ELLIS, E. C.; ELLIS, M.; JEANDEL, C.; LEINFELDER, R.; MCNEILL, J. R.; RICHTER, D.; STEFFEN, W.; SYVITSKI, J.; VIDAS, D.; WAGREICH, M.; WILLIAMS, M.; ZHISHENG, A.; GRINEVALD, J.; ODADA, E.; ORESKES, N.; WOLFE, A. P. The Anthropocene is functionally and stratigraphically distinct from the Holocene. **Science**, v. 351, n. 6269, p. aad2622-1-aad2622-10, 2016.

WILLIAMS C. K.; HILLMYER, M. A.; Polymers from renewable resources: a perspective for a special issue of polymer reviews. **Polymer Reviews**, v. 48, n. 1, p. 1–10, 2008.

ZHANG, C.; GARRISON, T. F.; MADBOULY, S. A.; KESSLER, M. R. Recent advances in vegetable oil-based polymers and their composites. **Progress in Polymer Science**, v. 71, p. 91–143, 2017.

ANEXO B – PEDIDO DE PATENTE 2

Escritório de Propriedade Intelectual

FORMULÁRIO DE DECLARAÇÃO DE INVENÇÃO

O Formulário de Declaração de Invenção (FDI) deve ser usado por professores, funcionários e alunos da UEL e pelas empresas da Intuel/Aintec para declarar a criação de uma invenção e solicitar sua propriedade intelectual.

Após o preenchimento do FDI, protocole na UEL (na SAUEL) endereçando-o para:

AINTEC/UEL**Escritório de Propriedade Intelectual – EPI**

Com isto sua Declaração de Invenção fica oficialmente registrada e será enviada ao Escritório de Propriedade Intelectual (EPI) da Aintec para análise, parecer e outras providências.

Os inventores devem ler a resolução nº 251/2003 que regulamenta sobre a participação de docentes, servidores e alunos no resultado financeiro da exploração dos direitos de propriedade intelectual, no endereço www.aintec.uel.br/aintec/legislação.

Havendo dúvidas no preenchimento da FDI contate o EPI da Aintec pelo e-mail: aintecsec@uel.br

1. INFORMAÇÃO PESSOAL**Nome para contato: André Luiz Martinez de Oliveira****Empresa/Instituição: Universidade Estadual de Londrina****Centro: Centro de Ciências Exatas****Departamento: Bioquímica e Biotecnologia****Tel: 43 3371 5473 / 43 98405 2547****e-mail: almoliva@uel.br****2. TÍTULO PROPOSTO PARA A INVENÇÃO: Método de imobilização de bactérias promotoras do crescimento vegetal em superfícies orgânicas****3. A INVENÇÃO APRESENTA NOVIDADE*? (X) SIM () NÃO**

*A invenção será considerada nova quando não compreendida no estado da técnica. O estado da técnica é constituído por tudo aquilo tornado público antes da data de depósito do pedido de patente.

4. A INVENÇÃO APRESENTA ATIVIDADE INVENTIVA*? (X) SIM () NÃO

*A invenção é dotada de atividade inventiva sempre que, para um técnico no assunto, não decorra de maneira evidente ou óbvia do estado da técnica.

5. A INVENÇÃO APRESENTA APLICAÇÃO INDUSTRIAL*? () SIM () NÃO

*A invenção é suscetível de aplicação industrial quando pode ser utilizada ou produzida em qualquer tipo de indústria.

6. RESUMO DA INVENÇÃO (Máximo 200 palavras)*

*O resumo será publicado pelo INPI.

Campo de Aplicação:

Desenvolvimento de um método para imobilização de bactérias promotoras de crescimento vegetal (BPCV) em superfícies orgânicas capazes de proteger as células por um período de tempo razoável mantendo altas populações viáveis e promover sua liberação de maneira gradual no solo.

Este pedido de patente reivindica a proteção intelectual ao processo de imobilização de BPCV em matriz termoplástica biodegradável e constituída exclusivamente de materiais renováveis. O processo desenvolvido baseou-se na diluição de uma estirpe de bactéria

promotora de crescimento vegetal, *Azospirillum brasilense* Ab-V5, em soluções de amido-gelatina em concentrações elevadas de células e aplicadas em suporte orgânico biodegradável como veículo sólido, mantendo proteção, fornecimento de nutrientes para uma liberação gradual no solo.

7. DESCREVA O PROBLEMA OU DESAFIO TÉCNICO QUE A INVENÇÃO SE PROPÕE A SOLUCIONAR.

O consumo de fertilizantes na agricultura brasileira é elevado, o Brasil é quarto maior consumidor mundial e ainda é dependente da disponibilidade e dos preços do mercado internacional; até o mês de maio de 2018 foi preciso importar cerca de 73% da necessidade para suprir a demanda agrícola brasileira (ANDA, 2018). O uso de fertilizantes na agricultura é importante para a manutenção das necessidades alimentares de uma população em crescimento; entretanto, o alto custo, a contaminação da água e do solo pelo uso indiscriminado e a efetividade diminuída pelas práticas convencionais de fertilização requerem uma alternativa para a substituição; neste contexto, a utilização de Bactérias Promotoras do Crescimento Vegetal (BPCVs) pode ser considerada para o desenvolvimento de uma agricultura sustentável e de menor impacto ambiental (HERRMANN; LESUEUR, 2013).

As BPCVs se associam a diferentes espécies de plantas em ambientes naturais, e sua principal característica é favorecer o desenvolvimento do vegetal através de mecanismos como: a fixação biológica de nitrogênio (FBN), produção de fitormônios, solubilização de fosfato, controle biológico de fitopatógenos (DOBBELARE; VANDERLEYDERN; OKON, 2003), entre outros. A inoculação desses microrganismos em cultivos agrícolas é realizada pela aplicação de inoculantes, sendo esses, definidos pelo Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) como um produto que contém microrganismos que atuam favoravelmente no desenvolvimento das plantas (MAPA, 2011). Em comparação com os produtos químicos, os inoculantes apresentam as seguintes vantagens: aumento no crescimento das plantas e na produtividade da cultura através da disponibilidade de nutrientes; protege as plantas contra muitos patógenos do solo; promove a melhoria na qualidade do solo; auxiliar na redução da poluição ambiental; são eficazes em pequenas quantidades; além de proporcionar maior economia ao agricultor, uma vez que os fertilizantes nitrogenados podem chegar a participar com até 40% dos custos de produção (MC LAUGHLIN et al., 2000; HUNGRIA; VARGAS, 2000).

A utilização de inoculantes de BPCV direta no solo para colonização de raízes de plantas não é fácil porque é suscetível a variações ambientais, como condições do solo, flutuação do pH e da temperatura, umidade, predação de protozoários e estresse salino

(WU et al., 2012). Esta imprevisibilidade do sucesso da inoculação nas plantas deve-se principalmente a qualidade das formulações de inoculantes contendo uma estirpe bacteriana eficaz para determinar o sucesso ou falha do agente biológico. Sem uma formulação adequada, a maioria dos países em desenvolvimento não demonstrou eficácia em produtividade com essa tecnologia de inoculantes de BPCV, devido a baixa qualidade obtida dos inoculantes (BASHAN, 1998). Em geral, logo após as suspensões de bactérias serem inoculadas no solo sem um portador adequado, a população de bactérias declina rapidamente para a maioria das espécies de BPCV. Este fenômeno, combinado com a produção deficiente de biomassa bacteriana, a dificuldade de sustentar a atividade na rizosfera e o estado fisiológico das bactérias no momento da aplicação, pode impedir o acúmulo de uma população BPCV suficientemente grande na rizosfera (BASHAN, 1998).

Para solucionar os problemas que a tecnologia de inoculantes de BPCV apresenta, deve-se considerar a complexidade das estirpes recomendadas para o desenvolvimento de inoculantes como eficiência com as cultivares de interesse, capacidade de competir com os organismos nativos do solo, apresentar tolerância às limitações ambientais, apresentar fermentação adequada na indústria e, principalmente, ter a capacidade de se adaptar aos solos, sem nenhum prejuízo a microflora natural do mesmo (HUNGRIA et al., 2005; HUNGRIA, CAMPO, MENDES, 2007; HERRMANN; LESUEUR, 2013). Após a avaliação das capacidades da estirpe selecionada, uma formulação deve ser elaborada para a cultura-alvo. A formulação consiste de um veículo que deve proporcionar um ambiente adequado, incorporado à proteção física, que permita uma alta densidade de células viáveis no produto até sua utilização á campo. Além disso, qualquer formulação deve ser estável durante a produção, armazenamento e transporte até o agricultor, sendo de fácil manuseio e aplicação do produto a campo, tendo em vista as limitações dos produtores (BASHAN et al., 2014; HERRMANN; LESUEUR, 2013; BASHAN, 1998).

O maior problema enfrentado nas formulações de inoculantes se refere à sobrevivência dos microrganismos durante o processo de armazenamento e transporte do produto, quando mais de 90% das células viáveis inicialmente incorporadas ao veículo podem senescer e perder sua viabilidade (BASHAN et al., 2014). Para maior manutenção da sobrevivência e viabilidade das células, a utilização de suportes sólidos como portadores pode ser uma opção. Esses suportes precisam ser atóxicos e biodegradáveis, apresentar eficiência e versatilidade para diferentes condições de solo e clima, podendo ser transportados e armazenados sob temperatura ambiente.

Além de selecionar o suporte sólido mais adequado para a imobilização de BPCV, outro desafio para a manutenção de uma densidade populacional microbiana adequada para a inoculação é o método de imobilização utilizado. A maioria dos métodos de imobilização disponíveis na literatura compreende a indústria de fermentação.

Imobilizações bacterianas para formulações inoculantes agrícolas e ambientais apresentam pontos distintos comparados a indústria de fermentação: o sistema de imobilização precisa fornecer abrigo temporário a estirpe isolada do solo e proteger dos competidores microbianos que ficam hostis a qualquer mudança da composição biológica do solo. Além disso, para colonizar as raízes das plantas, a liberação desejada das células é gradual e ocorre quando o suporte é degradado pelos microrganismos nativos do solo, liberando assim as BPCV para o desenvolvimento de plantas (BASHAN et al., 2014).

Em comparação com bactérias de vida livre, as células imobilizadas apresentam maior vida útil, são mais eficazes e mais tolerantes em condições adversas (BAYAT; HASSANSHAHIAN; CAPPELLO, 2015). Entretanto, para o desenvolvimento do sistema biológico que atenda as expectativas, a escolha do método de imobilização e do tipo de suporte deve ser realizada considerando as características do material biológico e as condições de utilização do sistema. Tendo em vista a variabilidade desses fatores, não existe um método geral de imobilização nem um suporte universal adequado para qualquer processo (PIKINGTON et al., 1998; VITOLO, 1988). Além disso, o processo de imobilização pode não ser econômico e as limitações de transferência de massa podem afetar a fisiologia e a cinética do crescimento celular e a matriz utilizada pode romper-se devido ao crescimento celular e evolução de gases, devido às limitações na transferência de oxigênio (WANG et al., 2005). Os métodos tradicionais disponíveis na literatura para avaliação da melhor escolha podem ser classificados em: naturais, que incluem formação de biofilmes e adesão ou adsorção em suporte sólido; artificiais, que incluem encapsulação ou engaiolamento em matriz porosa e utilização de agentes ligantes; e agregação por floculação que pode ser natural ou artificial (COVIZZI et al., 2007; PIKINGTON et al., 1998), podem ser adaptados para a tecnologia de inoculantes.

A imobilização celular é uma abordagem biotecnológica ativamente utilizada na preparação e formulação de inoculantes com potencial parcialmente inexplorado. Após um período de 15 anos de pesquisa intensiva sobre vários modelos de células imobilizadas de BPCV (VASSILEV et al., 2001; MALUSÁ et al., 2012; BASHAN et al., 2014), ainda há falta de processos inovadores para a formulação de produtos de fertilização do solo (VASSILEV et al., 2015). Neste contexto, uma estratégia promissora é o desenvolvimento de um método de imobilização utilizando soluções amido-gelatina para diluição e aplicação na superfície de suporte orgânico biodegradável produzido com materiais de fontes renováveis como poli (ácido láctico) PVA, amido, bagaço de cana-de-açúcar, glicerol e nutrientes, por extrusão seguidos por moldagem por injeção, que promova proteção dos microrganismos, garantindo a sobrevivência e viabilidade de uma população bacteriana adequada para a aplicação no campo.

8. DESCREVA AS CONHECIDAS SOLUÇÕES PARA O PROBLEMA OU DESAFIO, SEUS LIMITES OU DEFICIÊNCIAS.

Uma das primeiras alternativas para a manutenção da sobrevivência e da viabilidade das propriedades fisiológicas de BPCV por um período mais extenso foi a utilização da turfa como suporte sólido (BALATTI, 2008). Entretanto, especificidades negativas devido ao uso deste suporte podem tornar-se impedimento para uma inoculação eficiente, já que a turfa é obtida através de atividades extrativistas, e a sua extração em diferentes sítios confere desuniformidade na sua composição, podendo apresentar contaminação com metais pesados e/ou resíduos biológicos. Devido a esses problemas, o mercado busca novos materiais para a produção de suportes para inoculantes. Entretanto, a utilização de diferentes substâncias para a elaboração de um material suporte apresenta dificuldades. Os componentes do material desenvolvido precisam apresentar mistura homogênea, os materiais utilizados podem apresentar moléculas de elevado peso molecular, ou com características contrastantes quanto à solubilidade em água, que tendem a ser imiscíveis, o que pode resultar na instabilidade da mistura obtida, decorrente da ação de interações antagônicas entre os componentes do material (VAN ELSAS; HEIJNEN, 1990).

O tipo de suporte selecionado influencia na escolha do método de imobilização de células; os métodos tradicionais disponíveis na literatura servem apenas como base para inoculantes. Geralmente, as empresas tendem a desenvolver seus próprios métodos conforme o tipo de suporte utilizado, muitas vezes, indisponíveis para consulta, por ser considerados segredo industrial. Um dos métodos mais utilizados na tecnologia de inoculantes é a adsorção atribuída à capacidade do microrganismo se fixar naturalmente no suporte, geralmente poroso como espumas, cujos poros apresentam-se como ambientes atrativos para os microrganismos, os quais podem produzir biofilmes para proteção. Esse método baseia-se no contato de simples suspensões de células com o suporte. Entretanto, a proteção das células por um período extenso pode ser comprometida, uma vez que sua adesão pode ser superficial, ocorrendo o declínio mais rápido da densidade populacional, tendo em vista que a produção de biofilmes pelos microrganismos, que promoveria maior proteção, pode demorar para ocorrer (COVIZZI et al., 2007; MARCELINO et al., 2016).

Outro método muito utilizado na tecnologia de inoculantes se baseia na utilização de materiais poliméricos, que incluem, até agora, alginato, agar, carragenina, pectina, quitosana, gomas e polímeros desenvolvidos protegidos por patente ou por segredo industrial (BASHAN et al., 2014). O método se refere ao aprisionamento ou encapsulamento de microrganismos em materiais poliméricos pela adição do microrganismo ao polímero, cuja mistura resulta em material gelatinoso. O tamanho da

barreira de contensão formada em torno das células irá depender, principalmente, da densidade do polímero, da porosidade e do acúmulo de biomassa no interior do material (COVIZZI et al., 2007). As vantagens da fabricação de inoculantes poliméricos são: o armazenamento seco em temperatura ambiente por longos períodos; oferecem lote consistente e de qualidade com melhor ambiente para as células; manipulação conforme as necessidades microbianas com adição de nutrientes. Essas características são essenciais para o sucesso do processo de inoculação; entretanto, não há inoculantes poliméricos no mercado devido seu elevado custo. Por isso, há uma busca por materiais e métodos que proporcionem as características desejadas de um inoculante acessíveis aos produtores (BASHAN et al., 2014).

Trabalhos sobre imobilização de BPCV em formulações biodegradáveis elaboradas estão disponíveis na literatura científica e em banco de dados de patentes. Dentre estas imobilizações, encontram-se suportes orgânicos com base em amido, fibras, dentre outros, variando os tipos de aditivos e os processos empregados. Apesar disso, muitos dos materiais e processos apresentados incorporam componentes não renováveis na formulação e diferentes processamentos. Estas características podem resultar em aumento de custos de produção do(s) material(is) e não respondem pela demanda estrita ao desenvolvimento de materiais de base biológica (renováveis, biodegradáveis e ambientalmente seguros) adequados para a tecnologia de inoculantes.

A patente brasileira PI000000000000000 depositada em 23 de novembro de 2012 refere-se à imobilização de BPCV por adsorção, em espumas de biocompósito (amido, bagaço de cana-de-açúcar e nutrientes) produzido por extrusão. Esta patente difere do presente pedido de proteção intelectual, que utiliza outros componentes no suporte e apresenta método de imobilização diferente.

A patente brasileira WO2012055000A1 depositada em 27 de outubro de 2010, compreende imobilização de BPCV em fibra de coco com adição de nutrientes e fatores de crescimento microbiano, adjuvantes como carboximetilcelulose, goma arábica, alginato de sódio e de agentes osmóticos-reguladores e tamponamento. Nesta patente inicialmente é utilizado método de imobilização por adsorção, na sequência os inventores fazem uso de materiais poliméricos para reforçar a imobilização. Esta patente difere do presente pedido de proteção intelectual, que não utiliza os adjuvantes nem os agentes.

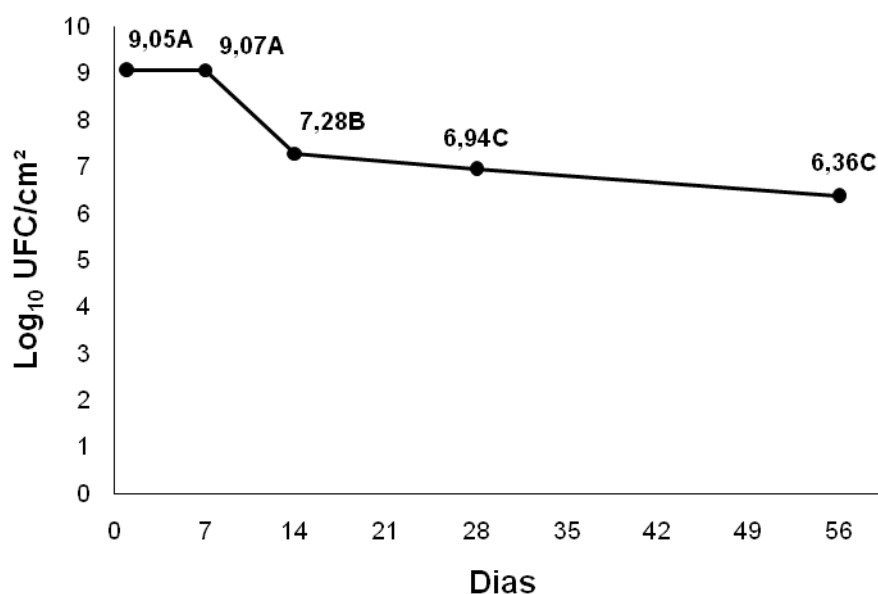
A patente americana US 2012/0270735 A1 depositada em 22 de abril de 2011, trata da imobilização de BPCV utilizando quitina coloidal na solução bacteriana e talco como suporte combinado com vermicomposto (material orgânico de plantas e animais decompostos) e esterco de fazenda. Esta patente difere do presente pedido de proteção intelectual, que não utiliza a quitina nem os materiais utilizados como suporte.

9. DESCREVA COMO SUA INVENÇÃO SUPERA ESSES LIMITES E DEFICIÊNCIAS, DESTACANDO SUAS VANTAGENS E GANHOS.

Diversos métodos de imobilização ainda utilizam a turfa como principal componente do inoculante, o qual é vendido em grandes volumes (BASHAN et al., 2014); entretanto, a falta de disponibilidade deste ingrediente no Brasil e as principais desvantagens já atribuídas e esse suporte orgânico fazem necessário o desenvolvimento de métodos de imobilização com materiais alternativos. Tais como o amido, que está presente em elevadas concentrações no Brasil e pode ser extraído de várias fontes, como mandioca, milho, batata entre outros. É a principal fonte de reserva das plantas, constituído de unidades de glicose unidas por ligações glicosídicas, sendo de baixo custo (LIU et al., 2009).

O amido pode ser utilizado nos processos de imobilização de células, principalmente, pela sua capacidade de gelatinização que confere proteção e um ambiente favorável para a manutenção das células. Além disso, a possibilidade de adição de outras substâncias nutrientes na solução influencia no comportamento e sobrevivência das células microbianas em formulações inoculantes agrícolas (KACL et al., 2005; SARMA et al., 2013; TRUJILLO-ROLDÁN et al., 2013). No presente pedido de proteção intelectual, o processo apresentado que utiliza uma solução inicial com 5% de amido juntamente com uma solução a base de gelatina, misturadas com elevada concentração de células de uma bactéria promotora de crescimento vegetal, estirpe *Azospirillum brasilense* Ab-V5, foi adequado para imobilização em superfície orgânica de matriz polimérica de poli (ácido láctico), bagaço de cana-de-açúcar, amido, glicerol, tanino e nutrientes, moldada por injeção. O método proposto conferiu a manutenção da sobrevivência e a viabilidade celular sem redução da densidade populacional bacteriana até 7 dias de armazenamento, declinando após 14 dias, mas mantendo ainda elevadas concentrações celulares até 56 dias de armazenamento (Figura 1).

Figura 1. Sobrevivência e viabilidade de células de BPCV, *A. brasilense* Ab-V5.



Letras diferentes indicam diferença significativa (teste de Tukey $p \leq 0,05$).

O sucesso da utilização de métodos de imobilização para inoculantes depende também da liberação das células em momentos oportunos para que ocorra a colonização na rizosfera das plantas. A liberação controlada de células em água pode ser desejada, uma vez que sistemas hidropônicos de cultivo estão disponíveis para diversas culturas agrícolas. Assim, foi avaliada a capacidade de liberação das células imobilizadas pelo método proposto (Tabela 1). Além da liberação de elevadas densidades de células de BPCV em água, demonstrada em 3 h de contato do material bacterizado com a água, após 6 h iniciou-se a multiplicação bacteriana. O comportamento microbiano pode ser atribuído aos componentes altamente nutritivos disponíveis no suporte, cuja solubilização serviu de fonte de carbono e nitrogênio, além de condições favoráveis para o aumento da densidade populacional. Características que podem ser adaptadas às condições de interesse do produtor.

A liberação controlada em areia das células de BPCV imobilizadas em superfície orgânica (Tabela 1) pode ser considerada como gradual, que é desejável. Segundo Bashan et al. (2016) o sistema de imobilização de BPCV precisa fornecer proteção de condições estressantes do solo, de microrganismos concorrentes, hostis e mini predadores e as células precisam ser liberadas de maneira gradual para que a colonização da raiz das plantas seja bem sucedida; a liberação ocorre quando os microrganismos nativos do solo degradam o suporte e liberam as BPCV no local onde as plantas precisam de inoculação. Dessa forma, a metodologia desenvolvida para a imobilização de BPCV apresentou capacidade para ajudar a prolongar a sobrevivência das células inoculadas em tempo necessário para a planta. Além disso, os materiais utilizados no processo foram todos seguros para o meio ambiente.

Tabela 1. Liberação controlada de células de BPCV imobilizadas em superfície orgânica.

Local de Liberação	Tempo de liberação de células de BPCV (Log ₁₀ UFC/mL água/cm ²)				
	0 h	3 h	6 h	12 h	24 h
Água	9,05±0,03 ^C	9,00±0,02 ^C	9,20±0,04 ^{BC}	9,30±0,05 ^B	10,28±0,05 ^A
Areia	Tempo de liberação de células de BPCV (Log ₁₀ UFC/g areia/cm ²)				
	0 h	3 h	6 h	12 h	24 h
Areia	9,05±0,03 ^A	4,02±0,08 ^D	4,18±0,06 ^D	4,75±0,09 ^C	5,90±0,10 ^B

Letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa (teste de Tukey $p \leq 0,05$).

10. DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO*

*O documento deve possuir suficiência descritiva para que um técnico no assunto seja capaz de reproduzir a invenção ao lê-lo.

O microrganismo utilizado para o processo de imobilização em suporte orgânico foi a estirpe Ab-V5 de *Azospirillum brasilense*, registrada no MAPA para uso como inoculante nas culturas de milho, trigo e arroz (MAPA, 2011). Essa bactéria foi utilizada como estirpe referência, sendo que o processo desenvolvido se adequa ao cultivo de diferentes estirpes de BPCVs.

O cultivo da BPCV inicia-se a partir de um pré-inóculo realizado em meio de cultura de crescimento rápido, meio líquido de Dygs (RODRIGUES NETO et al., 1986), até que a cultura alcance o estágio de crescimento exponencial. Após este período de crescimento, a densidade de células no cultivo é determinada e ajustada para uma concentração de 1×10^6 células por mililitro, sendo inoculados 10 mL do pré-inóculo por litro de meio de cultura MCA4 (densidade inicial de 1×10^4 células/mL de meio de cultura MCA4) com patente pendente, INPI protocolo no. BR 1020140171746, Brasil. As condições de cultivo estabelecidas: agitação a 180 rpm, temperatura de 28 °C, e 72 horas de cultivo. A densidade final obtida de 1×10^{10} células/mL de meio de cultura MCA4 deverá ser diluída para 1×10^9 células/mL em soluções amido-gelatina. O processo de imobilização apresenta duas etapas, utilizando essas concentrações microbianas, em solução amido e posteriormente em solução gelatina, com os seguintes componentes e proporções:

a) Solução Amido

*Glicerol - 200 mL/1000 mL de formulação

*Amido - 50 g/1000 mL de formulação

*K₂HPO₄ - 6 g/1000 mL de formulação

*Sacarose - 5 g/1000 mL de formulação

*Maltose - 5 g/1000 mL de formulação

*KH₂PO₄ - 4 g/1000 mL de formulação

*NH₄NO₃ - 1,6 g/1000 mL de formulação

*Fe EDTA (sol. 0,5 M) - 2 mL/1000 mL de formulação

*Goma xantana - 1 g/1000 mL de formulação

*Extrato de levedura -1 g/1000 mL de formulação

*Polinilpirrolidona(PVP) - 1 g/1000 mL de formulação

*MgSO₄ - 1 g/1000 mL de formulação

*NaCl - 0,05 g/1000 mL de formulação

*Solução micronutrientes (1 g Na₂MoO₄.2H₂O; 1,18 g MnSO₄.H₂O; 1,4 g H₃BO₃; 0,04 g CuSO₄.5H₂O; 1,2 g ZnSO₄.7H₂O) (DOBEREINER et al., (1995) - 20 mL/1000 mL de formulação.

Para a elaboração da solução amido, inicialmente faz-se uma solução contendo goma xantana, glicerol e água destilada (600 mL), sob agitação contínua e aquecimento a 70°C em uma placa aquecedora com agitador magnético mantendo-se a agitação até a completa homogeneização das substâncias. Esta solução é adicionada dos componentes (extrato de levedura, K₂HPO₄, KH₂PO₄, NH₄NO₃, MgSO₄, PVP, Fe-EDTA, solução de micronutrientes, sacarose, maltose e NaCl) previamente eluídos em 200 mL água destilada sob temperatura ambiente. Por fim, o amido deve ser incorporado na solução aos poucos em aquecimento a 60 °C em placa aquecedora com agitador magnético até sua completa homogeneização. Em seguida, é feito o ajuste do volume do meio de cultura para 1000 mL e do pH para 6,8. Após o ajuste do pH e volume, o meio de cultura é submetido à esterilização em autoclave durante 15 min, a 121° C e pressão de 1 atm.

b) Solução gelatina

*gelatina, amido, glicerol, nanoargila e água de patente pendente, INPI protocolo no. BR 1020170060462, Brasil.

O suporte orgânico utilizado no processo de imobilização é de plástico biodegradável produzido por poli (ácido lático), bagaço de cana-de-açúcar, amido, glicerol, tanino e nutrientes (patente pendente, INPI protocolo no. BR 1020180072269, Brasil) pelos processos de extrusão, seguida por moldagem por injeção e autoclavados, separadamente, a 121° C por 15 min e pressão de 1 atm.

Todo o processo de imobilização deve ser realizado em câmara de fluxo laminar

em temperatura ambiente. Para a primeira etapa o suporte esterilizado deve ser imerso em becker contendo solução amido com densidade de 10^9 células/mL de solução, até a cobertura de todo o material, por 1 h. Em seguida, o material bacterizado é retirado da solução e colocado em papel filtro (80g/m^2 ; porosidade de 3 μm) para a secagem por 1 h. Após a secagem do material bacterizado uma segunda etapa de imobilização deve ser realizada pela imersão desse material em becker com a solução gelatina (10^9 células/mL) por 1 h, colocado em papel filtro para a secagem por 1 h, acondicionados em sacos de celofane, previamente esterilizados em autoclave a 121°C por 15 min e pressão de 1 atm e armazenados em local livre de luminosidade em temperatura ambiente.

A sobrevivência e viabilidade da estirpe ab-V5 imobilizada no suporte orgânico foi avaliada em 1, 7, 14, 28 e 56 dias de estocagem, pela contagem de Unidades Formadoras de Colônia (UFC) pelo método de espalhamento. Amostras de 12 cm^2 , peso conhecido de cada período estocado, adicionadas por salina ($\text{NaCl } 0,85\%$) (1:10 v/p) com 1 mL/L de twin 80, agitadas em 180 rpm por 1 h a 25°C . Posteriormente, as amostras foram maceradas em almofariz e pistilo até sua completa homogeneização, a partir dessa solução, alíquotas de 1 mL foram seriadamente diluídas (1/10, v/v) em solução salina ($\text{NaCl } 0,85\%$) e 100 μL das diluições 10^{-3} a 10^{-5} foram inoculadas em placas com meio RC-vermelho gongo sólido (CÁCERES, 1982), em triplicata para cada diluição e incubadas em estufa a $30^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ por 72 h. Os resultados foram expressos em Log_{10} de unidades formadoras de colônia por cm^2 de suporte orgânico ($\text{Log}_{10}\text{UFC/cm}^2$).

A liberação controlada da bactéria imobilizada em suporte orgânico foi realizada em triplicata, em água e em areia, esterilizados em autoclave a 121°C por 15 min, com 1 dia de imobilização. Para isso, foi adicionado ao material bacterizado água (1:10 v/p) ou areia com 30% de umidade (1:25 p/p). As avaliações foram realizadas após 3, 6, 12 e 24 h de contato da bactéria imobilizada com água ou areia, pela contagem de Unidades Formadoras de Colônia (UFC). Para a liberação em água, alíquotas de 1 mL da água em contato com o material bacterizado foram retiradas para a diluição seriada. Para a liberação em areia, o material bacterizado foi retirado da areia, a qual foi diluída em salina (1:5 p/v) adicionada por twin 80, agitada por 1 h e alíquotas de 1 mL dessa solução contendo areia foi utilizada para a diluição seriada. Os resultados da liberação controlada em água foram expressos como Log_{10} de unidades formadoras de colônia por mL de água por cm^2 de suporte orgânico ($\text{Log}_{10}\text{UFC/mL de água/cm}^2$). Os resultados da liberação controlada em areia foram expressos como Log_{10} de unidades formadoras de colônia por g de areia por cm^2 de suporte orgânico ($\text{Log}_{10}\text{UFC/g areia/cm}^2$).

11. QUAL A PRINCIPAL APLICAÇÃO DA TECNOLOGIA?*

*Em que indústria (s) a invenção proposta pode ser aplicada.

A tecnologia descrita e apresentada consiste em um método para imobilização de BPCV em superfícies orgânicas, utilizando materiais seguros para o meio ambiente, considerados de baixo custo, compatíveis para a produção de bens e produtos nos mais diversos setores de atividade econômica que tenham demanda por inoculantes, como agricultura e meio ambiente.

12. REFERÊNCIAS

- ANDA- **Associação Nacional para a difusão de adubos**. Disponível em: <<http://anda.org.br/index.php?mpg=03.00.00>> Acesso em: 15 de junho de 2018.
- BALATTI, A. P. Tecnología de las fermentaciones. In: FIGUEIREDO, M. V. B.; BURITY, H. A.; STAMFORD, N. P.; SANTOS, C. E. R. S. (Eds). *Microorganismos e Agrobiodiversidade: o novo desafio para a agricultura*. Guaíba, 2008. p. 119-142.
- BASHAN, Y.; BASHAN, L. E.; PRABHU, S. R. Superior polymeric formulations and emerging innovative products of bacterial inoculants for sustainable agriculture and the environment. **Agriculturally Important Microorganisms**, p. 15-46, 2016.
- BASHAN, Y.; DE-BASHAN, L. E.; PRABHU, S. R.; HERNANDEZ, J. P. Advances in plant growth-promoting bacterial inoculant technology: formulations and practical perspectives (1998–2013). **Plant Soil**, v. 378, p. 1–33, 2014.
- BASHAN, Y. Inoculants of plant growth-promoting bacteria for use in agriculture. **Biotechnology Advances**, v. 16, n. 4, p. 729-770, 1998.
- BAYAT, Z.; HASSANSHAHIAN, M.; CAPPELLO, S. Immobilization of microbes for bioremediation of crude oil polluted environments: a mini review. **The Open Microbiology Journal**, v. 9, p. 48–54, 2015.
- CÁCERES, E. A. R. Improved Medium for Isolation of Azospirillum spp. **Applied and environmental microbiology**, v. 44, n. 4, p. 990-991, 1982
- COVIZZI, L. G.; GIESE, E. C.; GOMES, E.; DEKKER, R. F. H.; SILVA, R. Imobilização de células microbianas e suas aplicações biotecnológicas. **Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas**, Londrina, v. 28, n. 2, p. 143–160, jul./dez., 2007.
- DOBBELARE, S.; VANDERLEYDERN, J.; OKON, Y. Plant-growth promoting effects of diazotrophs in the rhizosphere. **Critical Reviews in Plant Sciences**, 22:107-149, 2003.
- DÖBEREINER, J.; BALDANI, V. L. D.; BALDANI, J. I. **Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não-leguminosas**. Brasília, DF: EMBRAPA-SPI, 1995. 60p.
- HERRMANN, L.; LESUEUR, D. Challenges of formulation and quality of biofertilizers for successful inoculation. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 97, n. 20, p. 8859-73, out. 2013.
- HUNGRIA, M.; CAMPO, R.J.; MENDES, I.C. **A importância do processo de fixação biológica do nitrogênio para a cultura da soja: componente essencial para a competitividade do produto brasileiro**. Londrina: Embrapa Soja, 2007. 80p.

(Embrapa Soja. Documentos, 283).

HUNGRIA, M.; LOUREIRO, F. M.; MENDES, I. C.; CAMPO, R. J.; GRAHAM, P. H. Inoculant preparation, production and application. In: WERNER, D.; NEWTON, W. E (Ed.) **Nitrogen fixation agriculture, forestry, Ecology and the environment**. Dordrecht, Amsterdam: Springer, 2005. 347p. p. 224-253.

HUNGRIA, M.; VARGAS, M. A. T. Environmental factors affecting N₂ fixation in grain legumes in the tropics, with emphasis on Brazil. **Field Crops Research**, v. 65, p. 151-164, 2000.

KACL, Y.; HEYRAUD, A.; BARAKAT, M.; HEULIN, T. Isolation and identification of an EPS-producing Rhizobium strain from arid soil (Algeria): characterization of its EPS and the effect of inoculation on wheat rhizosphere soil structure. **Res. Microbiol.**, v. 156(4), p. 522-531, 2005.

LIU, H.; XIE, F.; YU, L.; CHEN, L.; LI, L. Thermal processing of starch-based polymers. **Progress in Polymer Science**, v. 34, p. 1348-1368, 2009.

MALUSÁ, E.; SAS-PASZT, L.; CIESIELSKA, J. Technologies for beneficial microorganisms inocula used as biofertilizers. **The ScientificWorld Journal**, v. 2012, p. 1- 2, 2012.

MAPA - **MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO, Instrução Normativa Nº 13, de 24 de março de 2011**. Diário Oficial da União da República Federativa do Brasil.

MARCELINO, P. R. F.; MILANI, K. M. L.; MALI, S.; SANTOS, O. J. A. P. dos; DE OLIVEIRA, A. L. M. Formulations of polymeric biodegradable low-cost foam by melt extrusion to deliver plant growth-promoting bacteria in agricultural systems. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 100, n. 16, p. 7323-7338, 2016.

MC LAUGHLIN, N. B.; HIBA, A.; WALL, G. J.; KING, D. J. Comparison of energy inputs for inorganic fertilizer and manure based corn production. **Canadian Agricultural Engineering**, v. 2, n.1, p. 9-17, 2000.

PIKINGTON, P. H.; MARGARITIS, A.; MENSOUR, N. A.; RUSSEL, I. Fundamentals of immobilized yeast cells for continuous beer fermentation: a review. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 104, p. 19-31, 1998.

RODRIGUES NETO, J.; MALAVOLTA JÚNIOR, V.A.; VICTOR, O. Meio simples para isolamento e cultivo de *Xanthomonas campestris* pv. citri tipo B. **Summa Phytopatologica**, Jaboticabal, v.12, p.16, 1986.

SARMA, M. V. R. K.; GAUTAM, A.; KUMAR, LALIT.; SAHARAN, K.; KAPOOR, A.; SHRIVASTAVA, N.; SAHAI, V.; BISARIA, V.S.; Bioprocess strategies for mass multiplication of and metabolite synthesis by plant growth promoting pseudomonads for agronomical applications. **Process Biochemistry**, v. 48, n. 9, p. 1418-1424, set. 2013.

TRUJILLO-ROLDÁN, M. A.; VALDEZ-CRUZ, N. A.; GONZALEZ-MONTEERRUBIO, C. F.; ACEVEDO-SÁNCHEZ, E. V.; MARTÍNEZ-SALINAS, C.; GARCÍA-CABRERA, R. I.; GAMBOA-SUASNAVART, R. A.; MARÍN-PALACIO, L. D.; VILLEGAS, J.; BLANCAS-CABRERA, A. Scale-up from shake flasks to pilot-scale production of the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum brasilense* for preparing a liquid inoculant formulation. **Applied microbiology and biotechnology**, 6 set. 2013.

VAN ELSAS, J. D. E; HEIJNEN, C. E. Methods for the introduction of bacteria into soil: a review. **Biology and Fertility of Soils**, 10, p. 127-133, 1990.

VASSILEV, N.; VASSILEVA, M.; LOPEZ, A.; MARTOS, V.; REYES, A.; MAKSIMOVIC, I.; EICHLER-LÖBERMANN, B.; MALUSÀ, E. Unexploited potential of some biotechnological techniques for biofertilizer production and formulation. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 99, p. 4983–4996, 2015.

VASSILEV, N.; VASSILEVA, M.; FENICE, M.; FEDERICI, F. Immobilized cell technology applied in solubilization of insoluble inorganic (rock) phosphates and P plant acquisition. **Bioresource Technology**, v. 79, p. 263–271, 2001.

VITOLO, M. Imobilização de células e enzimas. **Biotecnologia**, n. 11, p. 2, janeiro de 1988.

WANG, L.; RIDGWAY, D.; GU, T.; MOO-YOUNG, M. Bioprocessing strategies to improve heterologous protein production in filamentous fungal fermentations. **Biotechnology Advances**, v. 23, n. 2, p. 115-129, 2005.

WU, Z.; GUO, L.; QIN, S.; LI, C. Encapsulation of *R. planticola* Rs-2 from alginate–starch–bentonite and its controlled release and swelling behavior under simulated soil conditions. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 39, p. 317–327, 2012.