



PATRÍCIA MORAES SINOHARA SOUZA

**ESTUDO DA INFLUÊNCIA DE ARGILAS ORGANOFÍLICAS NO
PROCESSO DE BIODEGRADAÇÃO DE NANOCOMPÓSITOS DE
PLA E SEUS EFEITOS GENOTÓXICOS E MUTAGÊNICOS**

**CAMPINAS
2013**



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA

PATRÍCIA MORAES SINOHARA SOUZA

**ESTUDO DA INFLUÊNCIA DE ARGILAS ORGANOFÍLICAS NO PROCESSO DE
BIODEGRADAÇÃO DE NANOCOMPÓSITOS DE PLA E SEUS EFEITOS
GENOTÓXICOS E MUTAGÊNICOS**

Orientadora: Profa. Dra. Ana Rita Morales

Co-orientadora: Profa. Dra. Maria Aparecida Marin-Morales

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Engenharia Química da Universidade Estadual de Campinas para a obtenção do título de Mestre em Engenharia Química na Área de Concentração Ciência e Tecnologia de Materiais.

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA TESE
DEFENDIDA PELA ALUNA PATRÍCIA MORAES SINOHARA SOUZA
E ORIENTADA PELA PROFA. DRA. ANA RITA MORALES

Assinatura do Orientador

**CAMPINAS
2013**

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

So89e Souza, Patrícia Moraes Sinohara, 1988-
Estudo da Influência de argilas organofílicas no processo de biodegradação de nanocompósitos de PLA e seus efeitos genotóxicos e mutagênicos / Patrícia Moraes Sinohara Souza. – Campinas, SP : [s.n.], 2013.

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

1. Biodegradação. 2. Poli(ácido láctico). 3. Nanocompósitos. 4. Compostagem. I. Morales, Ana Rita, 1958-. II. Marin Morales, Maria Aparecida. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia Química. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em inglês: Study of influence of organoclays on biodegradation process of PLA nanocomposites and its genotoxic and mutagenic effects

Palavras-chave em inglês:

Biodegradation

Poly(lactic acid)

Nanocomposites

Composting

Área de concentração: Ciência e Tecnologia de Materiais

Titulação: Mestra em Engenharia Química

Banca examinadora:

Ana Rita Morales [Orientador]

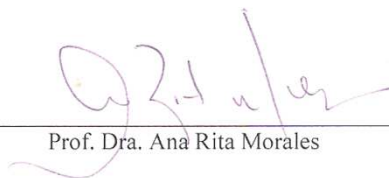
Lucia Helena Innocentini Mei

Silvia Pierre Irazusta

Data de defesa: 23-04-2013

Programa de Pós-Graduação: Engenharia Química

Dissertação de Mestrado defendida por Patrícia Moraes Sinohara Souza e aprovada
em 23 de abril de 2013 pela banca examinadora constituída pelos doutores:



Prof. Dra. Ana Rita Morales



Profa. Dra. Lucia Helena Innocentini Mei



Profa. Dra. Silvia Pierre Irazusta

*Dedico esta dissertação à minha querida família:
meus pais Julio e Fátima, meus irmãos Igor e Jú,
meus avôs José e Manoel (in memorian)
e minhas avós Ana e Tocico*

Agradecimentos

À Profa. Dra. Ana Rita Morales, pela oportunidade para realização do Mestrado sob sua orientação, a confiança depositada, a motivação, o apoio em todas as etapas deste trabalho, e pela amizade. Agradeço também pela oportunidade de acompanhá-la em seu trabalho como Pesquisadora e Professora, pois além da segura orientação, a convivência com uma pessoa de espírito tão inovador muito contribuiu para minha formação profissional.

À Profa. Dra. Maria Aparecida Marin-Morales, pelo grande apoio desde a elaboração do projeto de pesquisa, até a discussão dos resultados, sempre muito atenciosa. Agradeço pela oportunidade de poder vivenciar o Laboratório de Mutagênese Ambiental, que além de grande infraestrutura, oferece um ambiente único e especial, com uma equipe unida e motivadora.

À Profa. Dra. Lúcia Helena Innocentini Mei, pelas sugestões, motivação, o apoio ao projeto e pela grande contribuição com a disponibilidade do Laboratório de Processamento de Polímeros, o ponto de partida para a execução de nossa pesquisa.

À Fapesp (Projetos 2011/14250-3 e 2012/00227-2), e ao CNPq, pelo apoio financeiro.

À PLM, pelo fornecimento da resina de PLA.

À *Polystell*, pelo grande suporte para a realização das análises de biodegradação. Ao Anízio, Antonio, Cecília e Wildon, pela ajuda e incentivo. Ao Ocimar, por ter sido sempre tão prestativo para discussões a respeito dos ensaios de compostagem.

Aos Professores do DEMBio, Dra. Ana Rita Morales, Dr. João Sinézio de Carvalho Campos, Dr. Júlio Roberto Bartoli, Dra. Lucia Helena Innocentini Mei e Dr. Sergio Persio Ravagnani, pelos ensinamentos ao longo das disciplinas.

Ao Prof. Dr. Nelson Batista de Lima e ao Renê Ramos de Oliveira, do Centro de Ciência e Tecnologia de Materiais do IPEN-USP, pelo o apoio para a análise de DRX.

À Profa. Dra. Bluma Guenther Soares, do Laboratório de Misturas Poliméricas e Compósitos Condutores-UFRJ, pelo apoio para realização da análise de GPC.

Aos Professores Dr. Guilhermino José Macêdo Fachine e Dr. Rafael Auras, pelas sugestões e prestatividade.

À Juliana, pelo fornecimento do composto orgânico.

Aos Professores da UNESP- Sorocaba, Dr. Leonardo Fernandes Fraceto, Dr. Sandro Donini Mancini e Dra. Valquíria Campos, pelo aprendizado ao longo da graduação e pelo incentivo para a realização do mestrado.

Aos amigos da UNICAMP- Jacyara, Carol, Mayara, Tiago, Mateus, Ivanei, Paulo, Gustavo, Reginaldo, Guilherme, Danielle, Liliane, Adriana, Karen, Aguinaldo, Ívi e Hamideh, e da UNESP- Nádia, Dânia, Eduardo, Raquel, Maria Tereza, Léo, Cris, Matheus, Márcia, Michele, Laís, Bruna, Jaque, Roberta, Thaís, Paula, Cynthia, Livia, Yali e Verônica, pela agradável companhia e bons momentos compartilhados.

Ao Gustavo, pela atenção e pelo acompanhamento das atividades no Laboratório de Processamento de Polímeros-FEQ-UNICAMP. Ao Disney e Thiago, pelo apoio e atenção durante a realização da análise termogravimétrica no Laboratório de Análise e Caracterização de Materiais-FEQ-UNICAMP. Ao Carlos Leite, do Instituto de Física-UNICAMP, pelos esclarecimentos e apoio para a realização da análise de Microscopia Eletrônica de Transmissão.

À Nádia, sempre muito solícita, agradeço pelo grande apoio para a realização das análises com *Allium cepa*, pelo acompanhamento desde o início dos trabalhos e pelo grande

aprendizado proporcionado. Ao Matheus, por me ensinar o procedimento de coloração das raízes. À Dânia, por me ensinar o procedimento para o preparo do solubilizado e pela atenção ao longo das análises. A toda equipe do Laboratório de Mutagênese Ambiental-UNESP, pelo grande apoio durante o período de atividades em Rio Claro.

À querida família Cattini: Andreia (*in memorian*), Beto, Neusa, Angélica e Adriana, pela amizade e motivação.

À minha família, em especial aos meus pais Julio e Fátima, pelo apoio, os bons conselhos, a amizade, e pelo suporte inestimável prestado em mais essa importante realização.

RESUMO

Neste estudo, foram preparados nanocompósitos de PLA e argilas organofílicas Cloisite 20A e Cloisite 30B, pelo método de intercalação do fundido. Os materiais foram caracterizados mediante Difração de Raios-X (DRX), Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET), Análise Termogravimétrica (TGA) e Calorimetria Diferencial Exploratória (DSC). A influência das argilas organofílicas no processo de biodegradação do PLA foi avaliada pela quantificação da taxa de mineralização do PLA e dos nanocompósitos pela norma ISO 14855-2, em condições simuladas de compostagem. Também foi avaliada a influência das argilas no processo de degradação hidrolítica do PLA, pela análise visual e monitoramento de peso molecular após os períodos de 15 e 30 dias de degradação em composto. Diante da falta de informação relacionada à ecotoxicidade de polímeros biodegradáveis, a avaliação de efeitos citotóxicos, genotóxicos e mutagênicos do composto orgânico após a degradação dos materiais foi realizada empregando o bioensaio com o organismo teste *Allium cepa*. Os nanocompósitos preparados apresentaram estrutura intercalada, evidenciada pela análise de DRX. As micrografias obtidas por MET permitiram a observação de diferentes níveis de dispersão, incluindo regiões esfoliadas. Foram verificadas, após a incorporação das argilas organofílicas, a redução da estabilidade térmica e o aumento do grau de cristalinidade do PLA, pelas análises de TGA e DSC, respectivamente. Com relação às medidas de mineralização, notou-se que a argila Cloisite 20A não apresentou influência significativa na biodegradação do PLA. Por outro lado, a argila Cloisite 30B levou à redução dos valores de mineralização comparados com o polímero puro, o que pode estar relacionado à atividade antimicrobiana de seu agente modificador. Na avaliação da degradação hidrolítica, notou-se que a presença de argilas organofílicas pode diminuir a taxa de degradação, possivelmente pela atuação de suas camadas como barreira. Ainda assim, mesmo no caso dos nanocompósitos, a redução do peso molecular foi significativa indicando que o processo de compostagem é favorável para a cisão de cadeia do polímero nos materiais em estudo. Na análise realizada por meio do bioensaio com o organismo teste *Allium cepa*, foi verificado que, após a degradação do PLA e dos nanocompósitos, o composto orgânico apresentou redução do índice mitótico e aumento da indução das alterações cromossômicas, de forma

estatisticamente significativa em relação ao controle negativo do ensaio (água destilada). Pela comparação dos resultados obtidos para os nanocompósitos em relação ao polímero puro, não foram verificadas diferenças estatisticamente significativas. Os tipos de aberrações cromossômicas observadas indicam um efeito genotóxico dos materiais, possivelmente relacionado a uma ação aneugênica dos produtos de degradação do PLA.

ABSTRACT

In this study, nanocomposites of PLA with organoclays Cloisite 20A and Cloisite 30B were prepared by the melt intercalation method. The materials were characterized by X-ray diffraction (XRD), Transmission Electron Microscopy (TEM), Thermogravimetric analysis (TGA) and Differential Scanning Calorimetry (DSC). The influence of organoclays in the biodegradation process of PLA was assessed by quantifying the rate of mineralization according to ISO 14855-2, in simulated composting conditions. The influence of clays on the hydrolytic degradation process of PLA was also investigated by visual analysis and monitoring of molecular weight after periods of 15 and 30 days of degradation in organic compost. Given the lack of information related to ecotoxicity of biodegradable polymers, the assessment of citotoxic, genotoxic and mutagenic effects of the organic compost, after the materials degradation, was carried out using the bioassay with *Allium cepa* as test organism. The nanocomposites presented an intercalated structure, evidenced by XRD analysis. The TEM micrographs allowed the observation of different dispersion levels, including exfoliated regions. After incorporation of organoclays, a reduction of thermal stability and an increasing in the degree of crystallinity of the PLA were observed by TGA and DSC analysis, respectively. In respect to the mineralization, it was noted that the clay Cloisite 20A showed no significant influence on the biodegradation of PLA. On the other hand, the clay Cloisite 30B led to decreased levels of mineralization compared to the polymer, which may be related to an antimicrobial activity of its modifying agent. In the evaluation of hydrolytic degradation it was verified that the presence of organoclays can decrease the rate of degradation possibly by the action of its layers as a barrier. Nevertheless, even in the case of nanocomposites, the molecular weight reduction was significant, indicating that the composting process is favorable to the chain scission of the polymer in the studied materials. In the analysis performed by the bioassay using the test organism *Allium cepa*, it was verified that after degradation of PLA and the nanocomposites, the organic compost showed an reduction of the mitotic index and an increasing in the induction of chromosomal abnormalities. These results were statistically significant in relation to negative control (distilled water). By comparing the results obtained for the nanocomposites in relation to pure polymer, there were no statistically

significant differences. The types of chromosomal aberrations observed indicate a possible genotoxic effect of materials, which may be related to an aneugenic action of the degradation products of PLA.

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	1
2.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
2.1.	PLA.....	5
2.2.	Nanocompósitos de PLA/montmorilonita organofílica.....	9
2.3.	Biodegradação do PLA	15
2.4.	Organismo teste <i>Allium cepa</i>	20
3.	PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	23
3.1.	Preparação de nanocompósitos de PLA/argilas organofílicas	23
3.2.	Caracterização de nanocompósitos.....	25
3.2.1.	Difração de Raios-X (DRX)	25
3.2.2.	Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)	25
3.2.3.	Análise termogravimétrica (TGA)	26
3.2.4.	Calorimetria Diferencial Exploratória (DSC)	26
3.3.	Avaliação do grau de mineralização.....	27
3.4.	Análise de visual e monitoramento de peso molecular.....	31
3.5.	Bioensaio com organismo <i>Allium cepa</i>	32
3.5.1.	Degradação das amostras em composto	32
3.5.2.	Ensaio com sementes de <i>Allium cepa</i>	32
4.	RESULTADOS E DISCUSSÕES	35
4.1.	Preparo das amostras de PLA e nanocompósitos	35
4.2.	Caracterização dos nanocompósitos.....	36
4.2.1.	Difração de Raios-X (DRX)	36
4.2.2.	Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)	39
4.2.3.	Análise Termogravimétrica (TGA).....	42
4.2.4.	Calorimetria Diferencial Exploratória (DSC)	44
4.3.	Avaliação do grau de mineralização.....	47
4.4.	Análise visual e monitoramento do peso molecular	52
4.5.	Bioensaio com o organismo <i>Allium cepa</i>	56

5. CONCLUSÕES	62
6. SUGESTÕES PARA OS TRABALHOS FUTUROS	63
7. REFERÊNCIAS	64
APÊNDICE A.....;	79
APÊNDICE B.....	82
APÊNDICE C.....	88
APÊNDICE D.....	91
APÊNDICE E.....	94
GLOSSÁRIO.....	103

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Consumo aparente de plásticos no Brasil (ABIQUIM, 2012).	1
Figura 2. Classificação de polímeros biodegradáveis (adaptado de AVEROUS, BOQUILLON, 2004).	2
Figura 3. Produção, consumo e disposição de biopolímeros (adaptado de KIJCHAVENGKUL, AURAS, 2008).	3
Figura 4. Estereoisômeros do ácido láctico: A. D-ácido láctico; B. L-ácido láctico (AHMED, VARSHNEY, 2011).	5
Figura 5. Estereoisômeros do lactídeo: A. D-lactídeo; B. L-lactídeo; C. D,L-lactídeo (AHMED, VARSHNEY, 2011).	6
Figura 6. Polimerização do PLA via abertura do anel de lactídeo (GROOT, KRIEKEN, 2010).	6
Figura 7. Aplicações do PLA. A. fixações ortopédicas; B. âncora de sutura; C. chassi de celular; D. chassi de computador; E. enchimento para travesseiros; F. tapete e revestimento (HENTON <i>et al.</i> , 2005; SUZUKI, IKADA, 2010; CONMED, 2012).	8
Figura 8. A. sacos para vegetais; B. recipiente para ovos; C. Garrafa (HENTON <i>et al.</i> , 2005; OBUCHI, OGAWA, 2010).	8
Figura 9. Estrutura de filossilicatos 2:1 (adaptado de RAY, BOUSMINA, 2008).	9
Figura 10. Importância do cisalhamento no processo de intercalação/ esfoliação das camadas de argila (adaptado de FORNES <i>et al.</i> , 2001).	12
Figura 11. Estruturas de nanocompósitos poliméricos e argilas (adaptado de ALEXANDRE, DUBOIS, 2000).	13
Figura 12. Caminho tortuoso da difusão de um gás em um nanocompósito de estrutura esfoliada (adaptado de ALMENAR, AURAS, 2010).	14
Figura 13. Degradação hidrolítica do PLA (adaptado de AURAS <i>et al.</i> , 2004).	16
Figura 14. Desintegração de garrafas e recipientes de PLA em processo de compostagem (KALE <i>et al.</i> , 2006).	19
Figura 15. Curvas de mineralização de amostras de PLA e celulose (adaptado de KALE <i>et al.</i> , 2007).	19

Figura 16. Células meristemáticas de <i>Allium cepa</i> . A. Núcleo interfásico normal; A₁ . Micronúcleo na interfase; B. Prófase normal; B₁ . Prófase com micronúcleo; C. Metáfase normal; C₁ . Metáfase com aderência cromossômica; C₂ . C-metáfase; C₃ . Metáfase poliplóide; C₄ . Metáfase com quebra cromossômica; D. Anáfase normal; D₁ . Anáfase com ponte cromossômica; D₂ . Anáfase com ponte (seta) e quebras cromossômicas (cabeça de seta); D₃ . Anáfase multipolar; E. Telófase normal; E₁ . Telófase com atraso cromossômico; E₂ . Telófase com ponte cromossômica; E₃ . Telófase com ponte (cabeça de seta) e perda cromossômica (seta) (MARIN-MORALES <i>et al.</i> , 2008).....	22
Figura 17. Broto nuclear; B. Núcleo lobulado; C. Célula binucleada; D. Célula trinucleada (MARIN-MORALES <i>et al.</i> , 2008; MAZZEO, 2009).....	23
Figura 18. Esquema do aparato para quantificação da taxa de mineralização (adaptado de KALE <i>et al.</i> , 2007).	28
Figura 19. Câmara do misturador: A. antes; B. após a mistura de argila organofílica Cloisite 20A e PLA.	35
Figura 20. Aspecto visual das amostras: A. PLA; B. PLA/CLO20A; C. PLA/CLO30B.	35
Figura 21. Difratogramas de raios-X das argilas organofílicas: A. Cloisite 20A; B. Cloisite 30B, e seus respectivos nanocompósitos.....	36
Figura 22. Difratogramas de raios-X do PLA e nanocompósitos.	38
Figura 23. Micrografia dos nanocompósitos (aumento de 4.000 x): A. PLA/CLO20A; B. PLA/CLO30B.	39
Figura 24. Micrografia dos nanocompósitos (aumento de 10.000 x): A. PLA/CLO20A; B. PLA/CLO30B.	40
Figura 25. Micrografia dos nanocompósitos (aumento de 63.000 x): A. PLA/CLO20A; B. PLA/CLO30B.	400
Figura 26. Micrografia dos nanocompósitos (aumento de 100.000 x): A. PLA/CLO20A; B. PLA/CLO30B.....	41
Figura 27. Curvas de TG e DTG das argilas organofílicas: A. Cloisite 20A; B. Cloisite 30B.....	42
Figura 28. Curvas de variação da massa em função da temperatura.	43
Figura 29. Curvas derivadas da variação de massa em função da temperatura.	43
Figura 30. Curvas de DSC: A. PLA; B. PLA/CLO20A; C. PLA/CLO30B.	45

Figura 31. Percentagem de mineralização para o PLA e nanocompósitos.....	48
Figura 32. Representação esquemática do mecanismo de ação dos biocidas quaternários de amônio (adaptado de GILBERT, MOORE, 2005).....	51
Figura 33. Aspecto visual das amostras após 15 dias de degradação em composto: A. PLA; B. PLA/CLO20A e C. PLA/CLO30B.....	52
Figura 34. Aspecto visual das amostras após 30 dias de degradação em composto: A. PLA; B. PLA/CLO20A e C. PLA/CLO30B.....	52
Figura 35. Peso molecular numérico médio do PLA e nanocompósitos.....	53
Figura 36. Peso molecular ponderal médio do PLA e nanocompósitos.....	54
Figura 37. Índice de polidispersividade do PLA e nanocompósitos.	54
Figura 38. Aberrações cromossômicas e anormalidades nucleares verificadas em células meristemáticas de <i>Allium cepa</i> . A. Metáfase normal; A₁. Metáfase com aderência cromossômica; A₂. Metáfase poliplóide; A₃. C-metáfase; B. Anáfase normal; B₁. Anáfase com ponte cromossômica; B₂. Anáfase com perda cromossômica; B₃. Anáfase com ponte (seta) e perda cromossômica (cabeça de seta); C. Telófase normal; C₁. Telófase com ponte cromossômica; C₂. Telófase com perda cromossômica; C₃. Telófase multipolar com ponte cromossômica e aderência; D. Núcleo normal; D₁. Núcleo lobulado; D₂. Célula binucleada; D₃. Célula trinucleada.....	57
Figura 39. <i>Endpoints</i> de mutagenicidade verificados em células meristemáticas de <i>Allium cepa</i> . A. Intérfase normal; A₁. Intérfase com micronúcleo; B. Prófase normal; B₁. Prófase com micronúcleo; C. Anáfase normal; C₁. Anáfase com quebra cromossômica; D. Telófase normal; D₁. Telófase com quebra cromossômica.....	58

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Propriedades típicas do PLA 4042D	23
Tabela 2. Especificações das argilas organofílicas Cloisite 20A e Cloisite 30B	24
Tabela 3. Características do composto orgânico	27
Tabela 4. Teor de Carbono nas amostras de PLA e nanocompósitos.....	30
Tabela 5. Características do composto orgânico	31
Tabela 6. Valores de peso seco das amostras e proporção da massa de composto e volume de água utilizados no preparo do solubilizado	33
Tabela 7. Valores de espaçamento basal das argilas organofílicas e nanocompósitos.....	37
Tabela 8. Dados obtidos pelas curvas de variação de massa e curvas derivadas	44
Tabela 9. Dados obtidos pela curva do primeiro aquecimento na análise por DSC.....	46
Tabela 10. Dados obtidos pela curva do segundo aquecimento na análise por DSC	47
Tabela 11. Ganho de massa das colunas 3 e 4 do aparato para a análise de biodegradação	48
Tabela 12. Valores de mineralização do controle positivo, PLA e seus nanocompósitos ..	48
Tabela 13. Valores de $\overline{M}_n$, $\overline{M}_w$ e PDI do PLA e seus nanocompósitos PLA/CLO20A e PLA/CLO30B	55
Tabela 14. Taxa de germinação de sementes de <i>Allium cepa</i> expostas aos tratamentos.....	56
Tabela 15. Índice Mitótico, frequência de aberrações cromossômicas e anormalidades nucleares, Índice de Alterações Cromossômicas e Índice de Mutagenicidade avaliados em células meristemáticas de <i>Allium cepa</i>	58
Tabela 16. Valores de IM, IAC e IMut avaliados em células meristemáticas de <i>Allium cepa</i>	61

NOMENCLATURA

Å- Angstrom (10^{-10} metro)

ABNT- Associação Brasileira de Normas Técnicas

ASTM – *American Society for Testing and Material*

d- distância entre as camadas ou planos de átomos

Da – Daltons

DNA- Ácido desoxirribonucleico

DRX- Difração de Raios-X

DSC- Calorimetria Diferencial Exploratória

EVA- poli(etileno-co-acetato de vinila)

IAC- Índice de Alterações Cromossômicas

IM- Índice Mitótico

IMut- Índice de Mutagenicidade

ISO- *International Organization for Standardization*

kV- quilo Volt

mA- mili Ampére

MET - Microscopia Eletrônica de Transmissão

MMS - metil metano sulfonato

$\overline{M}_n$ - peso molecular numérico médio

$\overline{M}_w$ - peso molecular ponderal médio

nm – nanômetro (10^{-9} metro)

PBAS - poli (butileno succinato-co-butileno adípico)

PBAT - poli (butileno adipato-co-tereftalato)

PCL - poli (ε-caprolactona)

PDI- Índice de polidispersividade

PE- polietileno

PET- poli (tereftalato de etileno)

PHA - polihidroxialcanoato

PHB - poli(hidroxibutirato)
PHBV – poli(hidroxibutirato-co-valerato)
PLA – poli(ácido láctico)
PDLA- poli (D-ácido láctico)
PLLA- poli (L-ácido láctico)
PDLLA-poli (DL-ácido láctico)
PP- polipropileno
PS - poliestireno
PVC - poli(cloreto de vinila)
TGA- análise termogravimétrica
 $T_{5\%}$ - temperatura na qual ocorre perda de 5% em massa
 T_c - temperatura de cristalização
 T_g - temperatura de transição vítrea
 T_m - temperatura de fusão
 $T_{máx}$ - temperatura na qual a taxa de perda de massa é máxima
 T_{onset} - temperatura de *onset* de cristalização
TRF - trifluralina
u.a. – unidade arbitrária
 X_c - grau de cristalinidade
 ΔH_m° - entalpia correspondente à fusão de PLA 100% cristalino
 ΔH_{cc} - entalpia correspondente à cristalização a frio
 ΔH_m - entalpia correspondente à fusão
 θ - ângulo de difração
 λ - comprimento de onda

1. INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, houve o registro de um grande aumento no consumo de plásticos. A Figura 1 representa a evolução de consumo aparente de plásticos no Brasil. Este parâmetro é o resultado da soma do volume da produção com o das importações, menos o volume exportado. Estão englobadas no levantamento as resinas de polietileno-PE, polipropileno-PP, poliestireno-PS, poli(cloreto de vinila)-PVC, poli(tereftalato de etileno)-PET e poli(etileno-co-acetato de vinila)-EVA. Pela estimativa o consumo de plásticos foi de aproximadamente 5,9 milhões de toneladas em 2010, representando um aumento de 18,7% em relação ao ano anterior (ABIQUIM, 2012). O rápido crescimento de resíduos plásticos e a limitação de aterros sanitários, direciona os esforços para o uso de polímeros biodegradáveis.

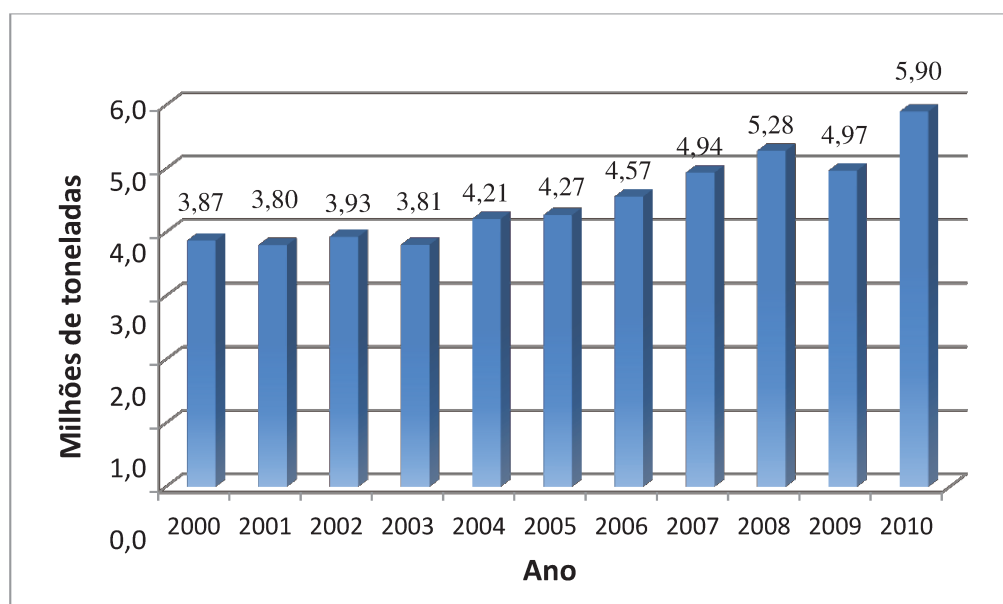


Figura 1. Consumo aparente de plásticos no Brasil (ABIQUIM, 2012).

Como representado na Figura 2 são reconhecidas quatro categorias de polímeros biodegradáveis: extraídos diretamente de matérias-primas naturais, produzidos por síntese química a partir de monômeros bio-derivados, produzidos por microorganismos, e produzidos a partir de petróleo bruto (AVEROUS, BOQUILLON, 2004).

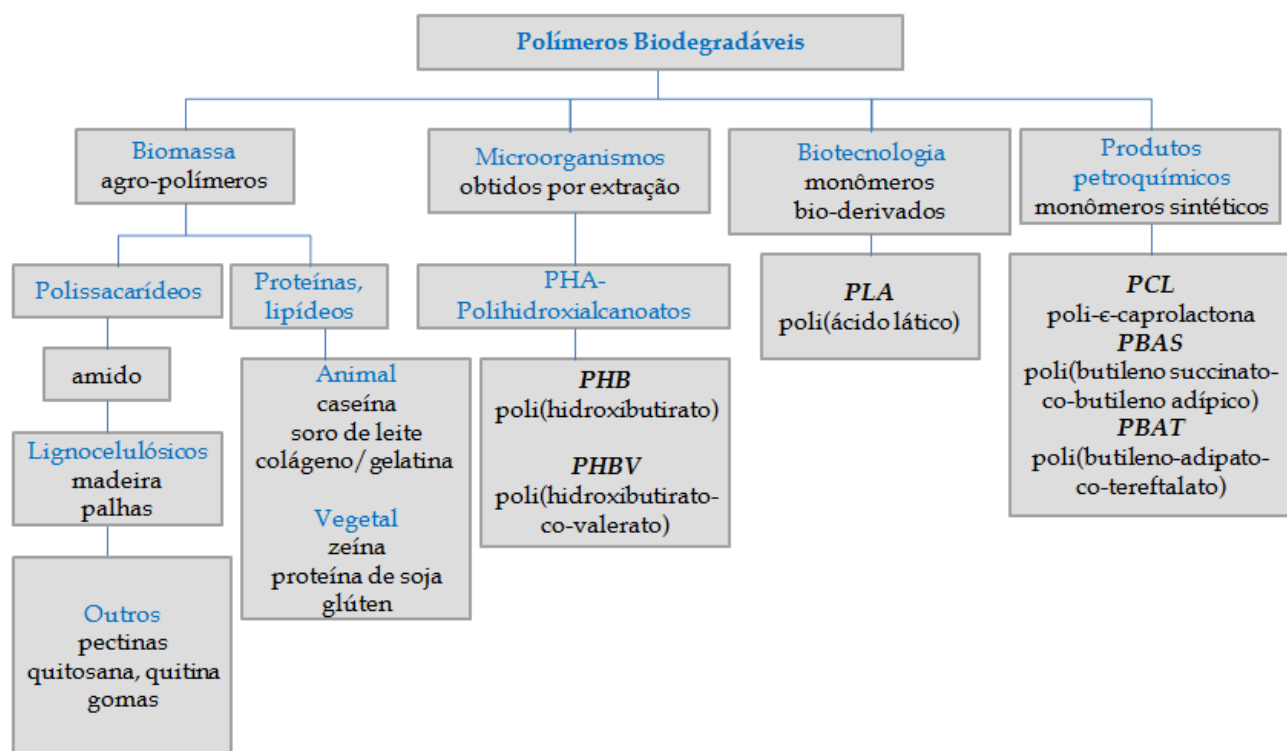


Figura 2. Classificação de polímeros biodegradáveis (adaptado de AVEROUS, BOQUILLON, 2004).

Segundo Kijchavengkul e Auras (2008) os termos *biopolímeros* e *plásticos biodegradáveis*, apesar de comumente empregados como sinônimos, apresentam definições distintas. *Biopolímeros* são polímeros produzidos a partir de recursos renováveis, principalmente de carboidratos e proteínas, tais como amido de milho, açúcar e proteína de soja. Por outro lado, a norma ASTM D6400-12 define um *plástico biodegradável* como “um plástico em que a degradação resulta da ação de microorganismos de ocorrência natural tais como bactérias, fungos e algas”. De acordo com esta definição, portanto, as fontes desses plásticos podem ser tanto naturais (por exemplo o poli(ácido lático)-PLA) como fóssil (por exemplo o poli(butileno-adipato-co-tereftalato)- PBAT).

Entre os polímeros biodegradáveis, o PLA é considerado um material muito promissor. O PLA exige 25-55% menos energia durante o processo de sua produção do que os polímeros à base de petróleo (VINK *et al.*, 2003). Esse baixo consumo energético,

associado ao seu correspondente baixo custo, torna a produção do PLA potencialmente vantajosa (RASAL *et al.*, 2010).

O PLA é adequado para embalagens de produtos secos de curto tempo de prateleira, mas não é adequado para embalagem de fermentados e outros líquidos, dado a sua baixa barreira natural ao O₂ e CO₂ (PRADELLA, 2006). Neste contexto, para melhoria de propriedades do PLA (mecânicas, térmicas e de barreira), o preparo de nanocompósitos com argilas organofílicas tem sido reportado como uma alternativa eficiente (RAY, OKAMOTO, 2003a).

A Figura 3 ilustra o ciclo de vida proposto para biopolímeros levando-se em consideração a compostagem como destinação final (KIJCHAVENGKUL, AURAS, 2008). A compostagem consiste em um processo de decomposição de matéria orgânica, que ocorre por ação de agentes biológicos microbianos e apresenta como resultado final um produto que pode ser aplicado ao solo para melhorar suas características (CEMPRE,1995). A degradabilidade permite que estes polímeros permaneçam no ciclo natural do carbono. Dessa forma, a compostagem é uma importante ferramenta de gerenciamento de resíduos (MEI, MARIANI, 2005).



Figura 3. Produção, consumo e disposição de biopolímeros (adaptado de KIJCHAVENGKUL, AURAS, 2008).

O processo de compostagem é indicado como uma importante alternativa para disposição de embalagens de PLA, uma vez que as condições do processo (principalmente temperatura e umidade) favorecem a degradação deste polímero. Segundo a norma ASTM D6400-12 *plástico compostável* é um “plástico que sofre degradação por processos biológicos durante a compostagem, produzindo dióxido de carbono, água, compostos inorgânicos e biomassa a uma taxa consistente com outros materiais compostáveis conhecidos, e que não deixa resíduos visualmente distinguíveis ou resíduos tóxicos”. Ainda segundo esta norma, um plástico compostável não deve afetar a habilidade do composto em suportar o crescimento de plantas.

Embora aspectos relacionados à ecotoxicidade sejam relevantes pela própria definição de plásticos compostáveis, essa questão é pouco explorada na literatura. Soma-se a isto o fato de que muitos agentes de modificação são incorporados aos polímeros biodegradáveis, a fim de obter melhorias em suas propriedades, como as argilas organofílicas, e as informações sobre seus efeitos tóxicos são ainda muito inconsistentes. Com relação às argilas organofílicas comumente utilizadas no preparo de nanocompósitos de PLA, efeitos ecotoxicológicos são desconhecidos, como reportado em suas fichas técnicas de segurança (MSDS- *Material Safety Data Sheet*) (SOUTHERN CLAY, 2013).

Diante da falta de informação disponível em relação ao tema e considerando que uma importante proposta de destinação final de materiais a base de PLA é a compostagem, foi proposta esta pesquisa, com os seguintes objetivos:

- preparo e caracterização de nanocompósitos de PLA e argilas organofílicas;
- avaliação da influência das argilas organofílicas no processo de biodegradação do polímero;
- avaliação dos efeitos ecotoxicológicos de amostras de composto orgânico, após a degradação

dos materiais em estudo, mediante bioensaio com o organismo teste *Allium cepa*.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. PLA

O primeiro passo para a produção do PLA é a obtenção de ácido láctico. O ácido láctico apresenta dois isômeros ópticos (L-ácido láctico e D-ácido láctico), representados na Figura 4.

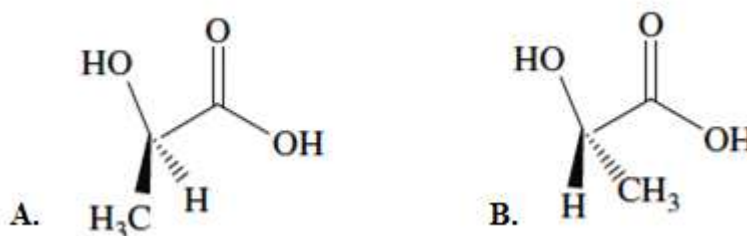


Figura 4. Estereoisômeros do ácido láctico: **A.** D-ácido láctico; **B.** L-ácido láctico (AHMED,VARSHNEY, 2011).

A síntese química do ácido láctico é principalmente baseada na hidrólise da lactonitrila por ácidos fortes, o que promove apenas a mistura racêmica de D e L-ácido láctico. O interesse na produção fermentativa do ácido láctico tem crescido devido à preocupação ambiental, priorizando o uso de recursos renováveis ao invés de derivados do petróleo. Além de possibilitar especificidade, por permitir a obtenção tanto de D como de L-ácido láctico opticamente puros, a produção biotecnológica de ácido láctico oferece muitas vantagens comparadas à síntese química, como baixo custo do substrato e baixo consumo de energia. A estereoespecificidade do ácido láctico depende do tipo de organismo cuja enzima é envolvida em sua produção (JOHN *et al.*, 2007).

Os organismos que produzem predominantemente isômeros L são *Lactobacilli amylophilus*, *Lactobacilli bavaricus*, *Lactobacilli casei*, *Lactobacilli maltaromicus*, e *Lactobacilli salivarius*. Espécies como *Lactobacilli delbrueckii*, *Lactobacilli jensenii*, e *Lactobacilli acidophilus* produzem o isômero D ou a mistura de ambos os isômeros. (NAMPOOTHIRI *et al.*, 2010).

Em geral, existem três métodos que podem ser usados para produzir PLA de alto peso molecular (cerca de 100.000 Da): (a) condensação direta; (b) condensação azeotrópica

e (c) abertura do anel de lactídeo (AURAS *et al.*, 2004). A polimerização através da formação de lactídeo é o método atualmente empregado pela Cargill Dow LLC para obter o PLA com alto peso molecular para aplicações comerciais. Neste processo, a partir da fermentação da dextrose, ambos L-ácido láctico, D- ácido láctico ou uma mistura dos dois são pre-polimerizados para obter poli(ácido láctico) com baixo peso molecular, que é em seguida, à baixa pressão, convertido em uma mistura de estereoisômeros de lactídeo (ALBERTSSON,VARMA, 2003). A condensação de duas moléculas de ácido láctico pode formar: L-lactídeo (duas moléculas de L-ácido láctico), D-lactídeo (duas moléculas de D-ácido láctico) e meso lactídeo (uma molécula de L-ácido láctico e uma molécula de D-ácido láctico) (Figura 5).

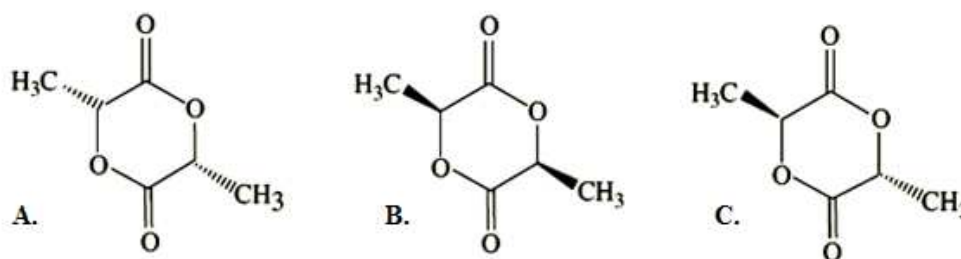


Figura 5. Estereoisômeros do lactídeo: **A.** D-lactídeo; **B.** L-lactídeo; **C.** D,L-lactídeo (AHMED, VARSHNEY, 2011).

De acordo com o modelo proposto por Kowalski *et al.* (2000) o anel de lactídeo pode ser aberto por ataque nucleofílico da ligação éster para iniciar a polimerização. Alguns exemplos de iniciadores (nucleófilos) são água e álcool, incluindo o grupo hidroxila do ácido láctico. A Figura 6 ilustra a abertura do anel de lactídeo.

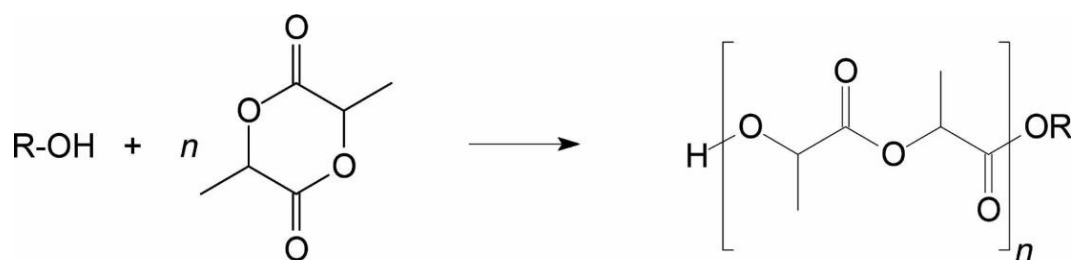


Figura 6. Polimerização do PLA via abertura do anel de lactídeo (GROOT;KRIEKEN, 2010).

O octanoato de estanho-Sn(Oct)₂ é amplamente utilizado como catalisador da síntese de PLA, por sua solubilidade em muitas lactonas, aprovação da FDA (*Food and Drug Administration*), alta atividade catalítica e habilidade de formação de polímeros com alto peso molecular (GARLOTTA, 2002; KRICHELDORF, SUMBÉL, 1989; VAN DIJK *et al.*, 1983).

A composição estereoquímica do monômero lactídeo pode determinar a composição estereoquímica do polímero resultante. A polimerização do L-lactídeo produz o poli (L-ácido láctico)-PLLA e a polimerização do D-lactídeo produz o poli (D-ácido láctico)-PDLA. Ambos possuem propriedades idênticas exceto a estereoquímica. A mistura racêmica (50% D e 50% L-lactídeo), por sua vez, forma o poli (DL-ácido láctico)-PDLLA, que é um polímero amorfo. O PLA ainda pode ser produzido com variadas frações de L e D-ácido láctico. Já está bem estabelecido que as propriedades do PLA variam muito dependendo da razão dos dois isômeros e o peso molecular do polímero (AHMED,VARSHNEY, 2011; LIM *et al.*, 2008). O homopolímero PLLA é um material semicristalino, com o maior ponto de fusão, enquanto que copolímeros com maior teor do isômero D exibem menores valores de ponto de fusão e apresentam cristalização muito mais lenta (GRIJPMA, PENNING, 1994; KOLSTAD, 1996).

O PLA possui aplicações na área médica (Figuras 7A e 7B), no setor de eletroeletrônicos (Figuras 7C e 7D), bem como na área têxtil mediante a utilização de fibras do polímero (Figuras 7E e 7F). A principal aplicação do PLA (cerca de 70%) é na área de embalagens (JAMSHIDIAN *et al.*, 2010). A Figura 8 ilustra alguns tipos de embalagens de PLA comercialmente disponíveis.

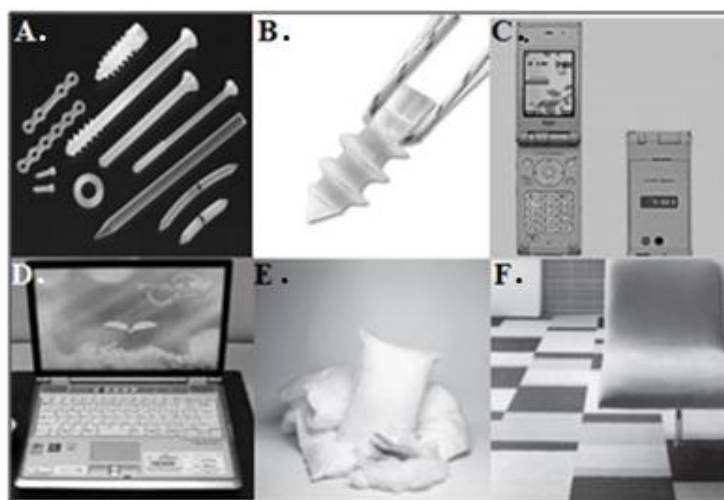


Figura 7. Aplicações do PLA: **A.** fixações ortopédicas; **B.** âncora de sutura; **C.** chassi de celular; **D.** chassi de computador; **E.** enchimento para travesseiros; **F.** tapete e revestimento (CONMED, 2012; HENTON *et al.*, 2005; SUZUKI, IKADA, 2010).

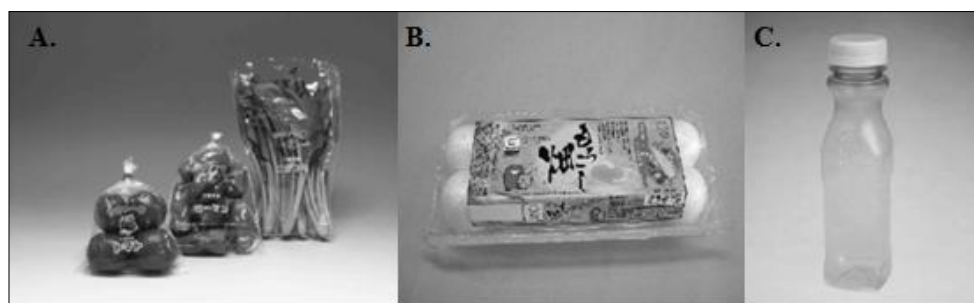


Figura 8. **A.** sacos para vegetais; **B.** recipiente para ovos; **C.** Garrafa (HENTON *et al.*, 2005; OBUCHI, OGAWA, 2010).

Há a intenção de que o PLA seja utilizado como um substituto para termoplásticos a base de petróleo, mas para isso algumas melhorias devem ser promovidas. Em produtos alimentícios, por exemplo, onde propriedades de barreira são importantes, a substituição do PET pelo PLA não seria possível, uma vez que as propriedades de barreira do PLA não estão em paridade com o PET (LIM *et al.*, 2008). De acordo com Yang *et al.* (2007), a incorporação de nanopartículas na matriz de PLA possibilitaria uma melhoria significativa nas propriedades deste material, aumentando ainda mais a sua aplicabilidade. Neste contexto, destaca-se o desenvolvimento de nanocompósitos poliméricos com argilas organofílicas.

2.2. Nanocompósitos de PLA/montmorilonita organofílica

As argilas mais comumente utilizadas no campo de nanocompósitos pertencem ao grupo de filossilicatos 2:1, cuja estrutura encontra-se representada na Figura 9. A montmorilonita, pertencente a este grupo, vem sendo amplamente empregada no preparo de nanocompósitos de PLA (BORDES *et al.*, 2009).

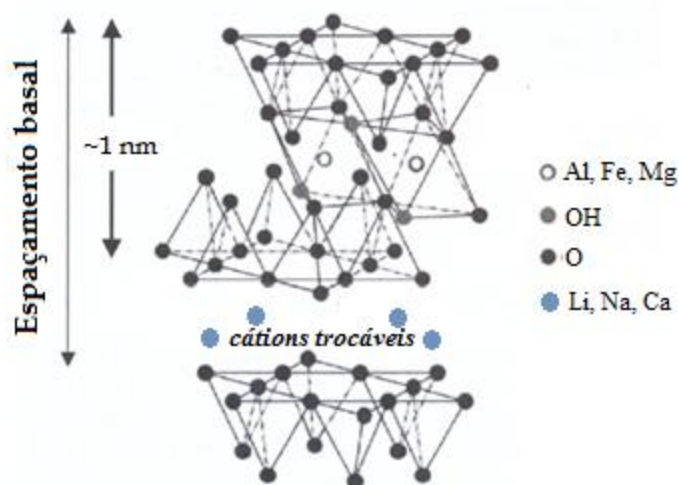


Figura 9. Estrutura de filossilicatos 2:1 (adaptado de RAY, BOUSMINA, 2008).

A montmorilonita pertence à família das argilas conhecidas como esmectitas cujas camadas são caracterizadas por estruturas constituídas por duas folhas tetraédricas de sílica com uma folha central octaédrica de alumina. A espessura de uma camada é cerca de 1 nm, enquanto a dimensão lateral dos cristais pode variar de 30 nm a vários micrômetros (RAY, OKAMOTO, 2003b). As placas da montmorilonita são empilhadas face a face para formar o retículo cristalino. A distância entre um plano de átomos em uma camada estrutural e um plano equivalente em outra camada estrutural é chamada de espaçamento basal ou distância interplanar basal. O empilhamento dessas placas é regido por forças polares relativamente fracas e entre essas placas existem lacunas denominadas galerias (LUCKAM, ROSSI, 1999). A composição química geral da montmorilonita é dada pela Fórmula 1 (RAY, BOUSMINA, 2008).



Onde: M representa cátions monovalentes

x representa o grau de substituição isomórfica (entre 0,5 e 1,3)

A composição química das esmectitas pode variar, pois na estrutura cristalina ocorrem substituições isomórficas, ou seja, substituições de certos átomos por outros com diferentes valências, gerando cargas positivas ou negativas dependendo das valências dos cátions, sem que ocorra qualquer variação nas posições que os átomos ocupam. As substituições isomórficas podem ocorrer em ambas as folhas tetraédricas e octaédricas. Por exemplo, uma parte dos íons Si^{4+} das folhas tetraédricas podem ser substituídos por Al^{3+} , e uma parte dos íons Al^{3+} das folhas octaédricas podem ser substituídos por Mg^{2+} ou Fe^{2+} (KE, STROEVE, 2005). No caso da montmorilonita essas substituições geram cargas negativas que normalmente são compensadas por cátions alcalinos ou alcalinos terrosos que são adsorvidos do ambiente, como Na^+ , Ca^+ , Li^+ , que residem nas galerias. Esses cátions são fixos eletrostaticamente e podem ser trocados por outros cátions, por isso são chamados de cátions trocáveis (ALEXANDRE, DUBOIS, 2000; RAY, OKAMOTO, 2003b; KE, STROEVE, 2005).

A superfície da montmorilonita é relativamente mais hidrofílica do que o PLA, o que justifica o uso de nanoargilas organicamente modificadas para compatibilização com a matriz do PLA e para facilitar a dispersão no polímero. Para esta modificação, os cátions presentes nas galerias da montmorilonita, tipicamente Na^+ , Li^+ , Ca^{2+} , Fe^{2+} e Mg^{2+} , podem ser substituídos por troca catiônica, pelo tratamento da argila com surfactantes, incluindo cátions orgânicos como os cátions quaternários de amônio. Como resultado da modificação orgânica, as nanoargilas são intercaladas com os cátions de alquilamônios, o que aumenta o espaçamento entre as camadas e melhora a compatibilidade da nanocarga com a matriz polimérica (KRISHNAMACHARI *et al.*, 2009). Diferentes tipos de argilas organofílicas comerciais, como Cloisite 30B e Cloisite 20A, são utilizados em nanocompósitos de PLA (RHIM *et al.*, 2009; SOLARSKI *et al.*, 2007; YANG *et al.*, 2007).

As principais técnicas para preparação de nanocompósitos são: polimerização intercalativa *in-situ*, esfoliação com solvente e intercalação do fundido (HUSSAIN *et al.*, 2006). Recentemente, a técnica de intercalação do fundido tornou-se dominante para a preparação de nanocompósitos de polímero e argilas organicamente modificadas, pois é apropriada para uso industrial e ambientalmente adequada por não requerer a utilização de solventes (NAM *et al.*, 2003; OKAMOTO *et al.*, 2005). No método de intercalação do fundido, é realizada uma mistura dos *pellets* do polímero com a argila em pó sob cisalhamento, a uma temperatura acima do ponto de fusão do polímero (KRISHNAMACHARI *et al.*, 2009).

A Figura 10 ilustra o papel do cisalhamento no processo de intercalação do fundido. Inicialmente o cisalhamento favorece a quebra de partículas maiores, separando-as em tactóides dispersos (Figura 10A). Em seguida há a transferência de stress do polímero fundido para os tactóides, que permite a formação de tactóides ainda menores (Figura 10B). Por fim, pela combinação do cisalhamento com a difusão das cadeias poliméricas nas galerias, as camadas de argila separam-se, promovendo o processo de intercalação/esfoliação (Figura 10C) (FORNES *et al.*, 2001).

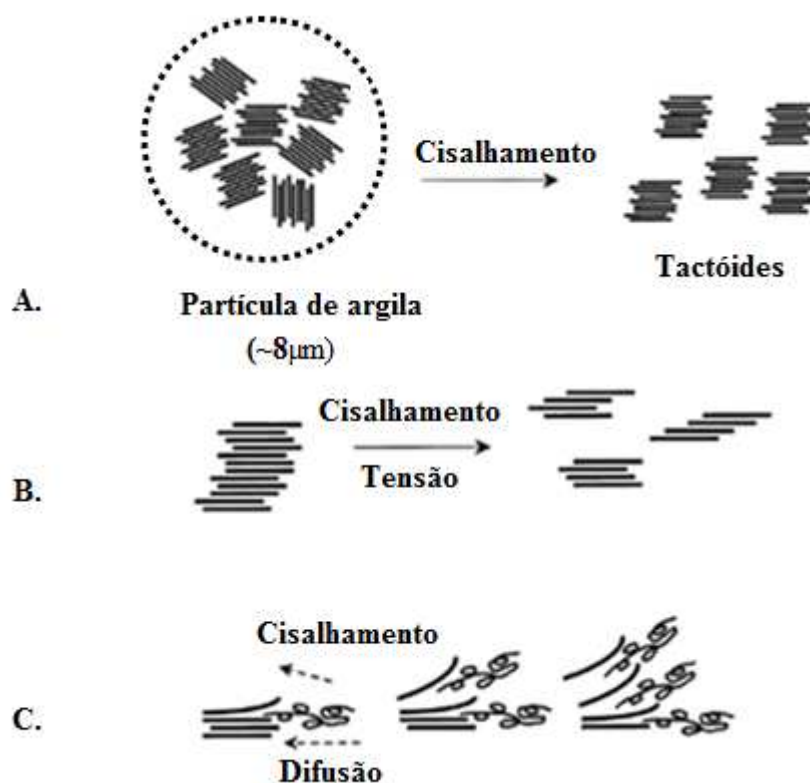


Figura 10. Importância do cisalhamento no processo de intercalação/ esfoliação das camadas de argila (adaptado de FORNES *et al.*, 2001).

As propriedades de nanocompósitos poliméricos com montmorilonita são dependentes de quão bem dispersas encontram-se as camadas de argila na matriz polimérica. Em geral, a dispersão das argilas pode ser classificada em três modos: (1) quando as camadas de argila não estão delaminadas, e os materiais tendem a exibir propriedades de *microcompósitos convencionais*; (2) quando as cadeias poliméricas estão inseridas nas galerias, caracterizando uma estrutura conhecida como *intercalada*, resultando no reforço do material; e (3) quando a argila está completamente delaminada e homogeneamente dispersa na matriz polimérica, caracterizando nanocompósitos de estrutura *esfoliada*, que refletem no potencial máximo para melhorias de propriedades físicas (LIM *et al.*, 2008). As diferentes estruturas de nanocompósitos estão representadas na Figura 11.

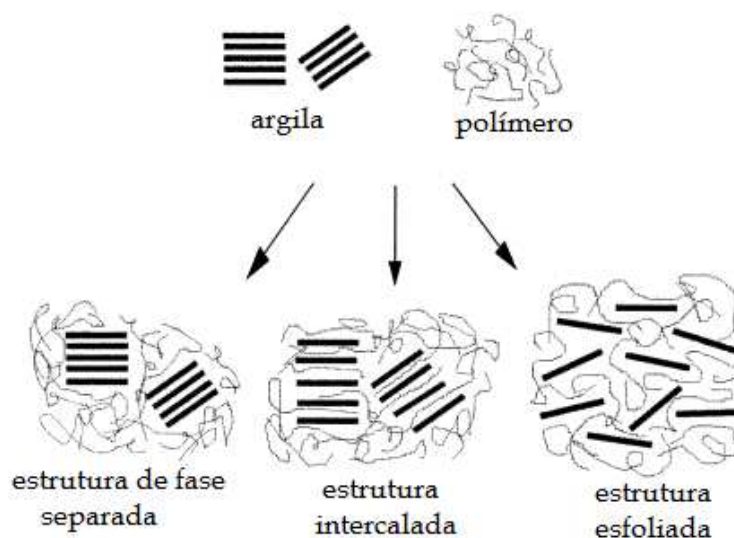


Figura 11. Estruturas de nanocompósitos poliméricos e argilas (adaptado de ALEXANDRE, DUBOIS, 2000).

Diante da relevância da aplicação de PLA em embalagens, destacam-se as melhorias de propriedades de barreira a gases. Alguns estudos reportados na literatura relatam uma eficiente redução de permeabilidade a oxigênio, dióxido de carbono e vapor d'água, como consequência da incorporação de camadas de argila na matriz de PLA (CHANG *et al.*, 2003; CHOWDHURY, 2008; KATIYAR *et al.*, 2011; KOH *et al.*, 2008; MAITI *et al.*, 2002; RAY; OKAMOTO, 2003a; RHIM *et al.*, 2009; THELLEN *et al.*, 2005).

Este efeito positivo reflete a habilidade em partículas de argilas atuarem como elementos de barreira, que forçam o permeante a percorrer um caminho tortuoso através do nanocompósito. Os três fatores principais que influenciam a permeabilidade de um nanocompósito são: a fração volumétrica das nanopartículas, a orientação relativa à direção da difusão e a razão de aspecto das plaquetas (MORALES *et al.*, 2010). Um modelo teórico de permeabilidade em filmes de nanocompósitos foi formulado por Nielsen (1967). Para suas expressões teóricas, Nielsen assumiu que as camadas de argilas encontram-se orientadas perpendicularmente ao fluxo do gás permeante (Figura 12).

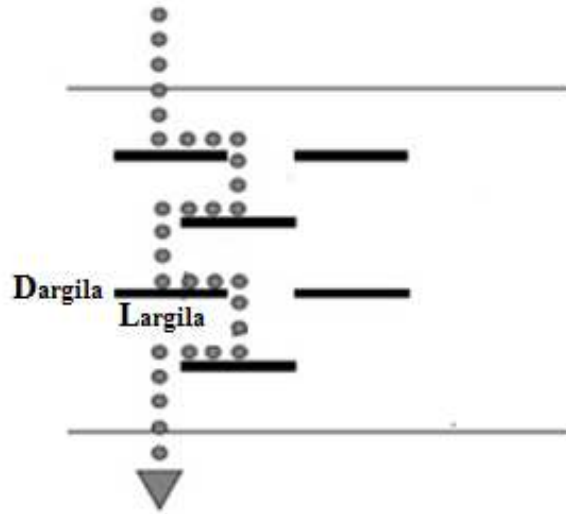


Figura 12. Caminho tortuoso da difusão de um gás em um nanocompósito de estrutura esfoliada (adaptado de ALMENAR, AURAS, 2010).

Neste modelo, a permeabilidade a gases de nanocompósitos (P_{PLANC}) está relacionada com a permeabilidade da matriz polimérica (P_{PLA}) e com a fração volumétrica (ϕ_{argila}), o comprimento (L_{argila}), e a espessura (D_{argila}) das camadas de argila, conforme a Equação 1:

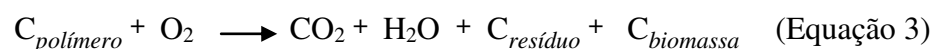
$$\frac{P_{PLANC}}{P_{PLA}} = \frac{1}{1 + (L_{argila}/2D_{argila})\phi_{argila}} \quad (\text{Equação 1})$$

O modelo considera um fator de tortuosidade, definido na Equação 2:

$$\tau = 1 + \left(\frac{L_{argila}}{2D_{argila}} \right) \phi_{argila} \quad (\text{Equação 2})$$

2.3. Biodegradação do PLA

Uma representação esquemática da biodegradação de polímeros em condição aeróbia está representada na Equação 3. Neste processo o carbono ($C_{polímero}$) é principalmente convertido em dióxido de carbono (CO_2), uma fração menor é convertida em biomassa microbiana ($C_{biomassa}$) e há ainda o resíduo ($C_{resíduo}$) que pode representar uma fração não degradada do material ou ainda pode estar relacionado aos metabólitos (WILDE, 2005).



No caso de biodegradação sob condições anaeróbicas o carbono orgânico é convertido em biogás, uma mistura de metano (CH_4) e dióxido de carbono, como indicado na Equação 4 (WILDE, 2005).



O grau de biodegradação aeróbia pode ser determinado medindo a quantidade total de CO_2 liberado ao longo do processo. A degradação de polímeros biodegradáveis é geralmente definida como a percentagem de mineralização, que é a proporção de gás CO_2 cumulativa efetivamente gerada devido à degradação da amostra testada considerando o conteúdo teórico de CO_2 do material (KIJCHAVENGKUL *et al.*, 2006).

A avaliação da biodegradação pela determinação de CO_2 liberado (também conhecida por respirometria) tem sido muito difundida e está presente em diversas normas preconizadas por organizações de padronizações como o Comitê Europeu de Normas (CEN), a Organização Internacional de Normas (ISO), a Sociedade Americana de Testes e Materiais (ASTM) e o Instituto Alemão de Normas (DIN) (MEI, MARIANI, 2005). A avaliação de biodegradação em condições controladas de compostagem geralmente é conduzida de acordo com os padrões ASTM D5338 e ISO 14855, segundo os quais os materiais em teste são incubados em biorreatores com misturas de composto a 58°C por 45

dias, sendo que este período pode ser estendido por até no máximo 180 dias (KIJCHAVENGKUL *et al.*, 2006). Temperaturas termofílicas (entre 50 e 60°C) são desejáveis na compostagem, pois permitem taxas ótimas de degradação, bem como eliminação de patógenos. Essas temperaturas são alcançadas naturalmente em um ambiente de compostagem devido às reações exotérmicas de decomposição das substâncias orgânicas pela atividade microbiana (INÁCIO, MILLER, 2009).

A biodegradação de plásticos depende de dois aspectos principais: fatores ambientais e a estrutura química do polímero (KALE *et al.*, 2007). O PLA, pela presença de ligações de grupo éster em sua cadeia, que são grupos funcionais hidrolisáveis, é susceptível à degradação hidrolítica (KALE *et al.*, 2006). Assim, como mecanismo proposto para a biodegradação do PLA tem-se uma etapa inicial, que consiste na degradação hidrolítica, esquematizada na Figura 13, a partir da qual são formadas substâncias de baixo peso molecular, que podem ser assimiladas pelos microorganismos, degradadas e convertidas em metabólitos (CHANDRA, RUSTGI, 1998).

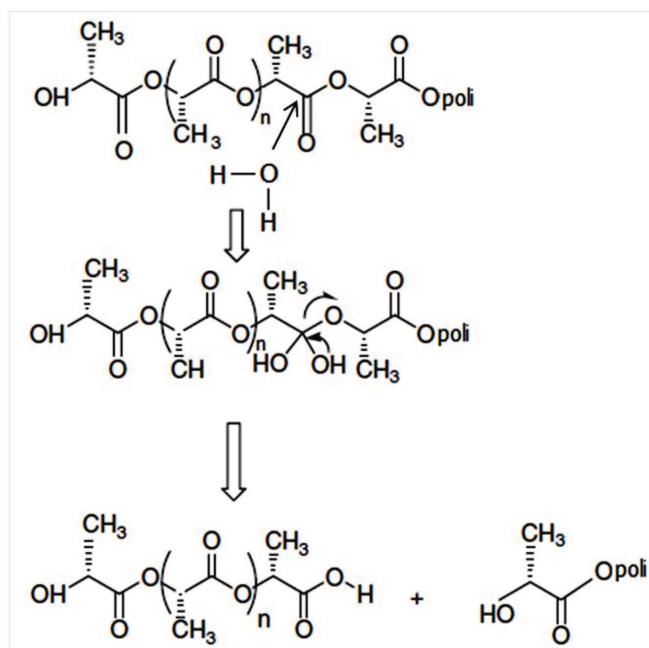


Figura 13. Degradação hidrolítica do PLA (adaptado de AURAS *et al.*, 2004).

A clivagem do PLA também pode ser realizada pela ação de enzimas excretadas por microorganismos (IKURA, KUDO, 1999; JARERAT, TOKIWA, 2001; JARERAT, TOKIWA, 2003a; JARERAT, TOKIWA, 2003b; MASAKI *et al.*, 2005; NAKAMURA *et al.*, 2001; NAMPOOTHIRI *et al.*, 2010; PRANAMUDA *et al.*, 1997; PRANAMUDA *et al.*, 2001; TOKIWA *et al.*, 1999; TOMITA *et al.*, 1999; TOMITA *et al.*, 2003; TOMITA *et al.*, 2004). No entanto, alguns estudos indicam que o PLA é menos suscetível à degradação enzimática do que outros poliésteres como o PHB, PCL e PBS (TANSENGCO; TOKIWA, 1998; SUYAMA *et al.*, 1998; TOKIWA *et al.*, 2009) e sua degradação em solo é muito lenta (OHKITA; LEE, 2006; RUDNIK; BRIASSOULIS, 2011). Por outro lado, em ambiente de compostagem, o PLA pode ser hidrolisado em pequenas moléculas (oligômeros, dímeros e monômeros) após 45-50 dias em temperaturas entre 50-60°C (TOKIWA, CALABIA, 2006). No processo de compostagem a cisão de cadeia pela degradação hidrolítica é favorecida pela umidade e temperatura, muito próxima da transição vítrea, onde as cadeias começam a ganhar flexibilidade, facilitando a difusão de moléculas de água (KIJCHAVENGKUL, AURAS, 2008; WEIR *et al.*, 2004).

Com relação aos nanocompósitos de PLA com argilas organofílicas, comportamentos distintos têm sido observados pela avaliação de degradação em composto. Alguns estudos indicaram que a degradação hidrolítica em condições de compostagem pode ser acelerada devido à presença de grupos hidroxilas nas camadas de silicatos, os quais poderiam agir como catalisadores (FUKUSHIMA *et al.*, 2009; LIU *et al.*, 2013). Ozkoc e Kemaloglu (2009), por outro lado, observaram o retardo da degradação hidrolítica do PLA em composto após a incorporação de argila organofílica, o que foi atribuído à maior cristalinidade do nanocompósito em relação ao polímero puro. No estudo conduzido por Fukushima *et al.* (2012) foi reportado que durante um período de seis semanas, a presença de montmorilonita organofílica na matriz do PLA levou a um retardo no processo de hidrólise do polímero, indicando um efeito de barreira às moléculas de água, mas após este tempo, foi verificada a função catalítica da argila. No trabalho conduzido por Ray e Okamoto (2003a) foi observado um efeito catalítico da montmorilonita organicamente modificada somente após um mês de degradação em composto. Antes disso, não foram notadas diferenças significativas entre a degradação do PLA e a do nanocompósito.

Conforme descrito por Ray *et al.* (2003) um mês poderia ser considerado o tempo crítico para que ocorra a absorção de água suficiente pela amostra de nanocompósito e seja verificado o efeito catalítico da argila organofílica na hidrólise.

No processo de compostagem, a ação de degradação biológica utiliza o O₂ disponível para transformar o carbono do substrato orgânico, obtendo energia e liberando CO₂, água e calor. A aplicação do composto orgânico em solo traz muitos benefícios à sua capacidade produtiva, melhorando sua estrutura, aeração, drenagem, capacidade de reter água, bem como a presença de macronutrientes e micronutrientes, essenciais para as plantas. Como importante benefício ambiental da compostagem, destaca-se o aumento da vida útil de aterros sanitários, que representam um investimento considerável para municípios e têm curta vida útil, em média 20 anos (INÁCIO, MILLER, 2009).

A proposta de compostagem como destinação final para plásticos é recente. Nos Estados Unidos, um programa de certificação foi lançado em 2000, pelo Instituto de Produtos Biodegradáveis (BPI) e o Conselho de Compostagem dos Estados Unidos (USCC). Este programa de certificação tem atribuído um rótulo de “compostável” para sacolas, embalagens e resinas poliméricas (WILDE, 2005). Atualmente este programa tem como diretriz a norma ASTM D6400-12, que estabelece alguns requisitos para certificação de *plásticos compostáveis*, relacionados a três aspectos:

- desintegração: o plástico não deve deixar resíduos visualmente distinguíveis;
- biodegradação: um nível de biodegradação deve ser atingido em testes com condições controladas.
- ecotoxicidade: o plástico não deve deixar resíduos tóxicos no composto ou afetar a habilidade do composto em suportar o crescimento de plantas.

Alguns estudos demonstraram características favoráveis do PLA com relação aos requisitos de desintegração e biodegradação (KALE *et al.*, 2006; KALE *et al.*, 2007; KIJCHAVENKUL *et al.*, 2006). Kale *et al.* (2006) conduziram um estudo de degradação de garrafas e recipientes de PLA em uma pilha de compostagem. Pela análise visual (Figura 14) notou-se uma rápida desintegração, que ocorreu em cerca de 30 dias.

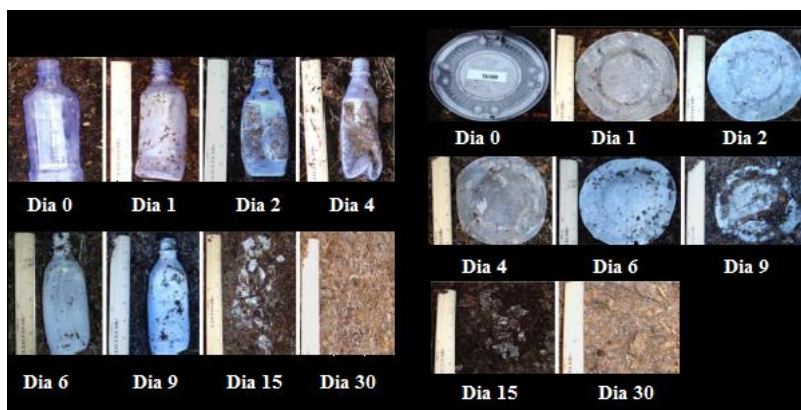


Figura 14. Desintegração de garrafas e recipientes de PLA em processo de compostagem (KALE *et al.*, 2006).

O gráfico da Figura 15 ilustra uma típica curva de mineralização obtida pela quantificação do CO₂ liberado ao longo do tempo, de acordo com a norma ASTM D5338.

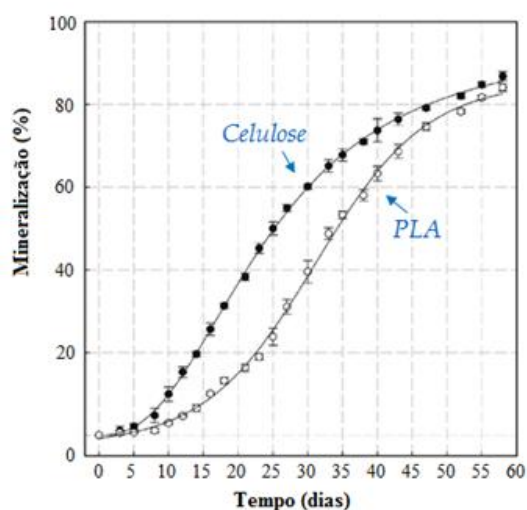


Figura 15. Curvas de mineralização de amostras de PLA e celulose (adaptado de KALE *et al.*, 2007).

Nota-se que o controle positivo do teste (celulose) alcançou a percentagem de mineralização de 70% em 45 dias de ensaio, parâmetro recomendado pela norma para a validação do teste. As amostras de PLA, por sua vez, atingiram a percentagem de 60% que, conforme a norma ASTM D6400-04, deve ser atingida em no máximo 180 dias para que um plástico seja considerado compostável. Esta norma foi recentemente atualizada, e conforme a nova versão (ASTM D6400-12) a percentagem de mineralização de 90% daquela apresentada pelo controle positivo deve ser atingida.

Os efeitos ecotoxicológicos de polímeros biodegradáveis após compostagem ou degradação em solo são raramente estudados. Assim, há uma eminente necessidade da realização de pesquisas com este enfoque, que possam fornecer informações sobre o destino seguro destes materiais degradáveis no ambiente (CIWMB, 2007). Neste contexto, destaca-se o potencial uso de bioindicadores, que são definidos como espécies capazes de indicar os primeiros sinais de estresse ambiental causados por contaminantes para os níveis de organização biológica (ADAMS, 2002). Ensaio utilizando bioindicadores (bioensaios) são amplamente utilizados para avaliar a possível indução de alterações que poluentes presentes no ambiente possam promover sobre a biota exposta (WALKER *et al.*, 1996).

Diversos organismos podem ser utilizados como indicadores de impactos ambientais. Os bioensaios com plantas, considerados bastante sensíveis e simples, são validados por instituições internacionais como a *United Nations Environmental Program* (UNEP), *World Health Organization* (WHO) e *US Environmental Protection Agency* (USEPA), pela sua eficiência no monitoramento dos efeitos genotóxicos e mutagênicos causados por poluentes ambientais (MENKE *et al.*, 2001).

2.4. Organismo teste *Allium cepa*

Para facilitar o entendimento deste item da revisão bibliográfica, alguns conceitos de termos empregados ao longo do texto podem ser consultados no Glossário (página 103).

Dentre os vegetais superiores utilizados como bioindicadores, destaca-se a espécie *Allium cepa*, amplamente empregada para a determinação dos efeitos citotóxicos, genotóxicos e mutagênicos de várias substâncias como metais, pesticidas, hidrocarbonetos aromáticos, corantes da indústria têxtil, produtos usados para desinfecção de água potável e também misturas complexas, como amostras ambientais de água e solo contaminadas (LEME, MARIN-MORALES, 2009). A espécie *Allium cepa* apresenta algumas características especiais, o que a torna um excelente organismo teste a ser usado em avaliações do comprometimento ambiental, como: crescimento rápido de suas raízes, grande número de células em divisão, disponibilidade durante o ano todo, fácil manuseio e por possuir número reduzido de cromossomos ($2n = 16$) de grande tamanho, o que facilita a observação de danos na sua estrutura (FISKEJÖ, 1985; MA *et al.*, 1995).

O teste de *A. cepa* permite a avaliação de diferentes *endpoints* genéticos, tais como índice mitótico, aberrações cromossômicas e presença de micronúcleos (CABRERA, RODRIGUES, 1999). O índice mitótico (IM), caracterizado pela razão entre as células em divisão celular e o total de células observadas, pode ser utilizado como parâmetro para avaliar a citotoxicidade de vários agentes (LEME, MARIN-MORALES, 2009). Smackin *et al.* (1996) reportaram que a diminuição do IM avaliada na região meristemática de raízes de *A. cepa* pode ser considerada confiável para a determinação da citotoxicidade no monitoramento da poluição. Este parâmetro tem sido comumente empregado em estudos recentes de monitoramento ambiental (BIANCHI *et al.*, 2011; CARITÁ, MARIN-MORALES, 2008; HOSHINA, MARIN-MORALES, 2009).

O termo genotóxico aplica-se ao agente capaz de promover danos no material genético. Como exemplos de alterações consideradas genotóxicas, têm-se as seguintes aberrações cromossômicas: C-metáfases, metáfases poliplóides, metáfases com aderências, metáfases com perdas cromossômicas, anáfases e telófases com atrasos, perdas e pontes cromossômicas. Essa classificação é assumida por não se saber se as derivações dessas anormalidades decorrem, de fato, em um efeito mutagênico, uma vez que as células podem sofrer injúrias ou morrer, ou podem ainda corrigir o “erro”, não derivando assim em uma célula com mutação. A presença dessas alterações pode indicar que a substância tem ação sobre o material genético (CARITÁ, MARIN-MORALES, 2008). As alterações nucleares, como núcleo lobulado, núcleo com broto, células polinucleadas, entre outras, também podem ser consideradas como *endpoints* de genotoxicidade (FERNANDES, *et al.*, 2007; LEME, MARIN-MORALES, 2009; MAZZEO *et al.*, 2011).

Para avaliação de efeitos mutagênicos, os micronúcleos são considerados por muitos autores como um *endpoint* eficaz e simples de analisar. Uma mutação é definida como uma mudança na sequência do DNA, que leva a uma alteração herdável da função gênica. Os micronúcleos aparecem nas células filhas, em decorrência de danos induzidos nas células parentais. Os fragmentos cromossômicos que resultam de quebras podem não ser incorporados ao núcleo principal das células-filhas após a mitose. Uma membrana nuclear se formará ao redor do fragmento, formando um pequeno núcleo separado do núcleo principal da célula. Os micronúcleos podem, também, ser formados a partir de um

cromossomo inteiro (RIBEIRO *et al.*, 2003). As quebras cromossômicas são altamente relacionadas aos eventos mutagênicos (SERRES *et al.*, 1978). Portanto, além dos micronúcleos, a frequência de quebras também pode ser utilizada para a avaliação da mutagenicidade (FISKEJÖ, 1985).

O organismo-teste *A. cepa* também permite a investigação do mecanismo de ação de um agente sobre o material genético (efeitos clastogênicos e/ou aneugênicos) (LEME, MARIN-MORALES, 2009). A ação clastogênica é caracterizada pela indução de quebras cromossômicas durante a divisão celular. A ação aneugênica, por sua vez, decorre da inativação de estruturas citoplasmáticas da célula, como o fuso mitótico (FENECH, 2000), levando à segregação anormal dos cromossomos, e consequentemente, à aneuploidia ou poliploidia (ALBERTINI *et al.*, 2000). De uma forma simplificada as pontes e quebras são indicadores de ação clastogênica, enquanto perdas, atrasos, aderências, multipolaridades e C-metáfases resultam de efeitos aneugênicos (LEME, MARIN-MORALES, 2009). A Figura 16 ilustra exemplos de aberrações cromossômicas e micronúcleos, enquanto que a Figura 17 mostra algumas alterações nucleares observadas em células meristemáticas de *A. cepa*.

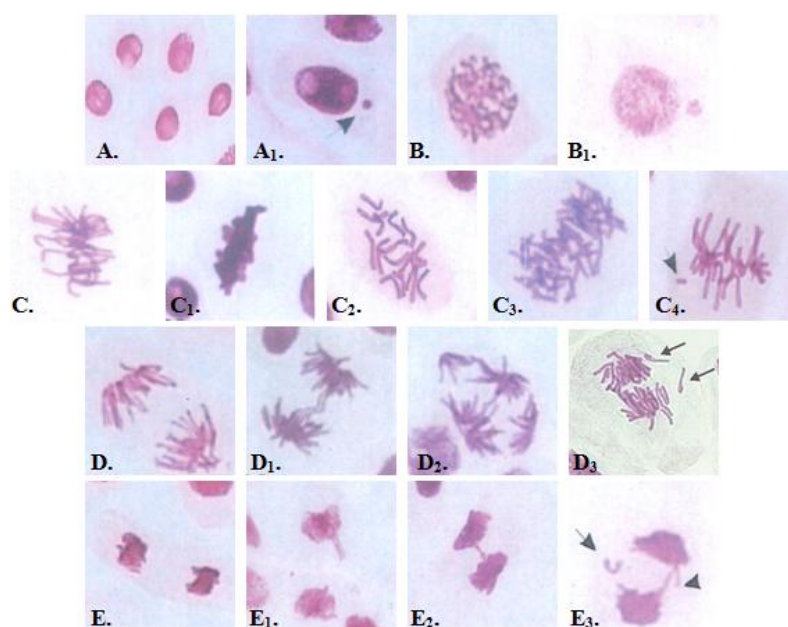


Figura 16. Aberrações cromossômicas e micronúcleos em células meristemáticas de *Allium cepa*. **A.** Núcleo interfásico normal; **A₁.** Micronúcleo na intérfase; **B.** Prófase normal; **B₁.** Prófase com micronúcleo; **C.** Metáfase normal; **C₁.** Metáfase com aderência cromossômica;

C₂. C-metáfase; **C₃**. Metáfase poliplóide; **C₄**. Metáfase com quebra cromossômica; **D**. Anáfase normal; **D₁**. Anáfase com ponte cromossômica; **D₂**. Anáfase multipolar; **D₄**. Anáfase com perdas cromossômicas (setas); **E**. Telófase normal; **E₁**. Telófase com atraso cromossômico; **E₂**. Telófase com ponte cromossômica; **E₃**. Telófase com ponte (cabeça de seta) e perda cromossômica (seta) (adaptado de MARIN-MORALES *et al.*, 2008; VENTURA, 2004).

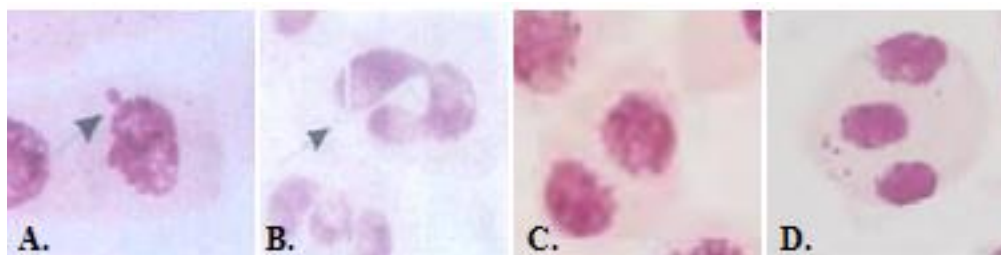


Figura 17. Anormalidades nucleares em células meristemáticas de *Allium cepa*. **A.** Broto nuclear; **B.** Núcleo lobulado; **C.** Célula binucleada; **D.** Célula trinucleada (MARIN-MORALES *et al.*, 2008; MAZZEO, 2009).

3. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

3.1. Preparação de nanocompósitos de PLA/argilas organofílicas

Foram utilizados, na preparação de nanocompósitos, *pellets* de PLA (Natureworks-grade 4042D), fornecidos pela empresa PLM. Esta resina é indicada principalmente para a produção de filmes biaxialmente orientados e as especificações encontram-se na Tabela 1. Segundo informação do fabricante (Natureworks) o teor de unidades D-ácido lático no PLA 4042D é $4,25 \pm 0,55 \%$.

Tabela 1. Propriedades típicas do PLA 4042D

Propriedades *	Valor	Método
Densidade	1,25 g/cm ³	ASTM D1505
Resistência à tração	DM-110,1 MPa ;DT- 144,5 MPa	ASTM D882
Módulo de elasticidade	DM- 3302 MPa;DT- 3852 MPa	ASTM D882
Elongamento na ruptura	DM- 160%; DT- 100%	ASTM D882

*Propriedades medidas em filmes de 1 mm; DM (direção da máquina)-3,5x; DT(direção transversal)-5x. Fonte: (MATWEB, 2013).

Foram preparados nanocompósitos com as argilas organofílicas Cloisite 20A (PLA/CLO20A) e Cloisite 30B (PLA/CLO30B), com teor das argilas de 5% em massa, utilizando-se o método de intercalação do fundido. As especificações das argilas

organofílicas encontram-se na Tabela 2. Inicialmente, os *pellets* de PLA e as argilas organofílicas Cloisite 20A e Cloisite 30B foram secos a 80°C por 4 horas. Para a mistura dos componentes foi utilizado um misturador do tipo Drais MH, modelo MH100. O procedimento foi realizado também para os *pellets* de PLA sem as argilas. Em seguida, foram obtidas amostras com espessura em torno de 0,5 mm em uma prensa MH, modelo Q/FMot8ton, a 210°C. Esta etapa foi realizada no Laboratório de Processamento de Polímeros, da Faculdade de Engenharia Química-UNICAMP.

Tabela 2. Especificações das argilas organofílicas Cloisite 20A e Cloisite 30B

Características	Cloisite 20A	Cloisite 30B
Modificador orgânico	$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \\ \text{H}_3\text{C} - \text{N}^+ - \text{TH} \\ \\ \text{TH} \end{array}$ dialquildimetilamônio	$\begin{array}{c} \text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH} \\ \\ \text{H}_3\text{C} - \text{N}^+ - \text{T} \\ \\ \text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH} \end{array}$ alquilmetil-bis-hidroxietilamônio
Umidade	< 2%	<2%
Perda de massa em ignição	38%	30%
Tamanho típico das partículas	10% menores que 2µm 50% menores que 6µm 90% menores que 13µm	10% menores que 2µm 50% menores que 6µm 90% menores que 13µm
Volume livre	0,12 g/cm ³	0,23 g/cm ³
Volume comprimido	0,22 g/cm ³	0,36 g/cm ³
Densidade específica	1,77 g/cm ³	1,98 g/cm ³
Resultado de DRX	d(001) = 2,42 nm	d(001) = 1,85 nm

T= *tallow* (~65% C18; ~30% C16; ~5% C14). Fonte: (SOUTHERN CLAY, 2013).

3.2. Caracterização de nanocompósitos

3.2.1. Difração de raios-X (DRX)

A análise de Difração de Raios-X foi realizada em equipamento Rigaku, modelo Multiflex, instalado no Laboratório de DRX do Centro de Ciências e Tecnologia de Materiais do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares-USP. Foram realizadas as análises de difração de raios-X com varredura na faixa de 1,3° a 50° (2 θ), radiação de K α do Cu (λ = 1,54), tensão de 40kV e corrente 20 mA. Os valores de espaçamento basal foram calculados pela aplicação da Lei de Bragg para a difração de raios-X, conforme a Equação 5 (VAN VLACK, 1990).

$$n\lambda = 2 d \sin\theta \quad \Leftrightarrow \quad d = \frac{n\lambda}{2 \sin \theta} \quad (\text{Equação 5})$$

onde:

n = número inteiro positivo

λ = comprimento de onda do raio X

d = distância entre as camadas ou planos de átomos

θ = ângulo entre o raio incidente e os planos refletidos (ângulo de difração)

3.2.2. Microscopia eletrônica de transmissão (MET)

As amostras foram preparadas pelo corte de filmes ultrafinos, de cerca de 60 nm, realizado à temperatura ambiente em um ultramicrotomo Leica, modelo Richert Ultracuts, instalado no Departamento de Físico-Química, no Instituto de Química- UNICAMP, e utilizando uma faca de diamante Diatome, modelo Cryo-Wet, adquirida com recursos de Projeto Auxílio à Pesquisa da FAPESP (Processo 2012/00227-2). As análises foram realizadas em um microscópio Zeiss, modelo Libra 120, instalado no Laboratório de Microscopia Eletrônica, no Instituto de Química- UNICAMP.

3.2.3. Análise termogravimétrica (TGA)

O teor de argila nas amostras de nanocompósitos e a estabilidade térmica dos mesmos foram avaliados através da técnica de análise termogravimétrica (TGA), sob um programa de aquecimento, a uma taxa fixa de 10°C/min na faixa de 20°C a 900°C sob fluxo de Nitrogênio. Foi utilizado um equipamento TA Instruments modelo SDT 2960, instalado no Laboratório de Análise e Caracterização de Materiais da Faculdade de Engenharia Química-UNICAMP.

3.2.4. Calorimetria Diferencial Exploratória (DSC)

O grau de cristalinidade nas amostras de PLA e nanocompósitos, bem como as transições térmicas foram estudados por calorimetria diferencial exploratória (DSC) em uma faixa de temperatura ambiente a 270°C sob atmosfera inerte de Argônio, com fluxo de 50 mL/min, em um equipamento da marca TA Instruments, modelo DSC Q-100, instalado na Central Analítica do Instituto de Química-UNICAMP. As amostras foram submetidas ao seguinte programa de aquecimento:

- (a) 1ª varredura: aquecimento de 25 a 270°C, 10°C/min, isoterma de 5 minutos a 270°C;
- (b) 2ª varredura: resfriamento de 270 a 25°C, 10°C/min, isoterma por 5 minutos a 25°C e
- (c) 3ª varredura: aquecimento de 25 a 270°C, 10°C/min.

Para determinar o valor do grau de cristalinidade (X_c) da amostra, o calor adicional absorvido pelos cristalitos formados durante o aquecimento (cristalização a frio) (ΔH_{cc}) deve ser subtraído do calor endotérmico total (ΔH_m) (NAM *et al.*, 2003). A equação 6 foi utilizada para o cálculo de X_c , e foi considerado o valor de 93 J/g para ΔH_m° (entalpia correspondente à fusão de PLA 100% cristalino), estabelecido por Fischer *et al.* (1973). A equação também considera o teor de PLA presente em cada amostra (w). Para os cálculos de X_c no caso dos nanocompósitos, o valor de w assumido foi 95%.

$$X_c = \frac{\Delta H_m - \Delta H_{cc}}{\Delta H_m^\circ} \times \frac{100}{w} \quad (\text{Equação 6})$$

3.3. Avaliação do grau de mineralização

O processo de biodegradação das amostras foi avaliado com base no método proposto na Norma ISO 14855-2, que permite estimar o grau de biodegradação aeróbia, mediante a quantificação do dióxido de carbono liberado, em condições controladas de compostagem. Esta análise foi realizada pela empresa Polystell.

No ensaio foram utilizados cinco biorreatores para as amostras PLA, PLA/CLO20A, PLA/CLO30B, o composto puro (branco) e celulose microcristalina (controle positivo). Em cada biorreator foram adicionados 60 g de composto orgânico (em peso seco), 320 g de areia e 10 g de cada amostra com dimensões de 1 cm². O composto orgânico utilizado nesta etapa foi preparado à base de casca de laranja, casca de mamão, maçã, abobrinha, casca de cenoura, arroz, torta de mamona, torta de algodão, farinha de osso, folhas secas, pó de xaxim, fibra de côco, terra adubada, esterco de galinha, esterco de bovino, húmus de minhoca, e água. A duração do processo de compostagem para o preparo do composto orgânico foi de 72 dias e este foi passado em peneira com diâmetro de furo de 5 mm.

Para a caracterização do composto orgânico utilizado, foram determinados os parâmetros teor de matéria orgânica, nitrogênio, umidade e pH, quantificados conforme a norma ISO 14855-2. Os resultados encontram-se relacionados na Tabela 3. O parâmetro carbono orgânico foi estimado conforme proposto por Kiehl (1985), dividindo-se o teor de matéria orgânica pelo fator de conversão de 1,8.

Tabela 3. Características do composto orgânico

Parâmetros	Resultados
Matéria orgânica	406,6 g/Kg
Carbono orgânico	225,9 g/Kg
Nitrogênio	15,6 g/Kg
Relação C/N	14,5
Umidade	51,5 %
pH	7,2

Uma representação esquemática do sistema para um único biorreator está indicada na Figura 18.

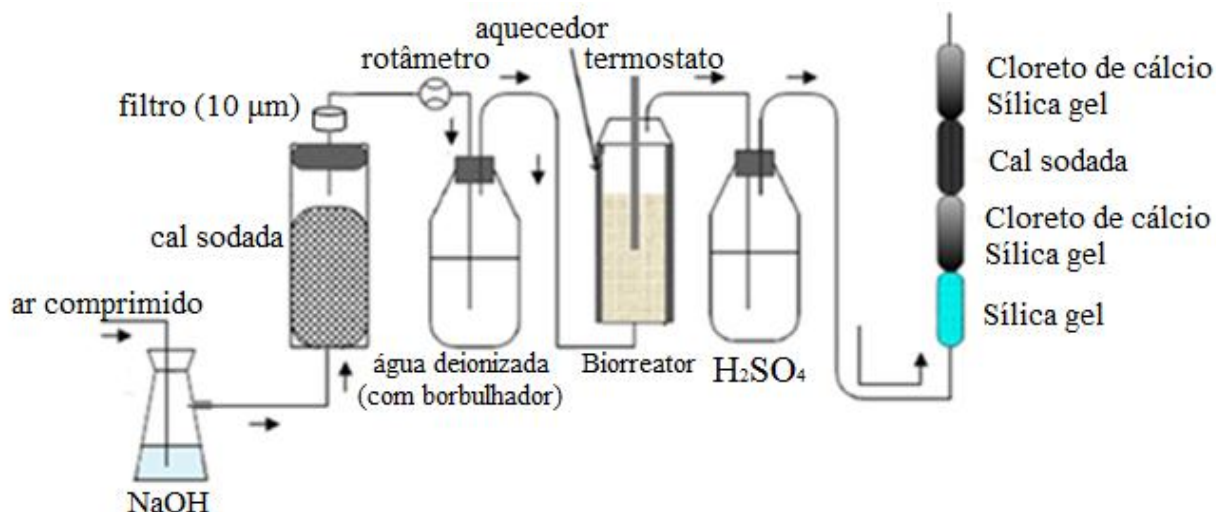
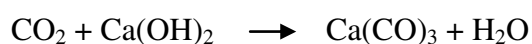
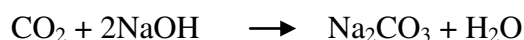


Figura 18. Esquema do aparato para quantificação da taxa de mineralização (adaptado de KALE *et al.*, 2007).

No início do sistema um compressor de ar produz o fluxo que será distribuído entre os diferentes biorreatores. O ar passa primeiramente por uma solução de NaOH e uma coluna contendo cal sodada, o que torna o ar livre de CO₂. Em seguida tem-se um filtro (10 µm) que retém sólidos em suspensão. O ar passa, então, por um frasco borbulhador de água deionizada que tem a função de repor parte da umidade do composto ao longo do ensaio. Um aquecedor mantém a temperatura de 58°C na mistura do biorreator, que é monitorada por um termostato. O ar passa pelo biorreator, por um eliminador de amônia (H₂SO₄), e segue para remoção de umidade (colunas 1 e 2 do aparato).

A coluna 3, cuja composição consiste em cal sodada, retém dióxido de carbono e libera água, como descrito nas reações:



A água liberada é, então, retida na coluna 4, que contém sílica gel e cloreto de cálcio. O gás carbônico liberado devido à biodegradação das amostras em cada biorreator é medido pelo ganho de massa nas colunas 3 e 4 do sistema. As medidas de massa destas colunas foram realizadas com uma frequência semanal. Diariamente, com a utilização de um aparelho de medição de O₂, foi determinada a concentração do gás no final do sistema, após a passagem do ar pelas quatro colunas. Esta determinou a regulação dos rotâmetros, pois a vazão de ar deve ser ajustada de forma que a concentração de O₂ medida seja de pelo menos 6%.

A quantidade de CO₂ envolvida durante cada intervalo de medida foi calculada conforme a Equação 7.

$$\Sigma(\text{CO}_2)_T^t = (\text{CO}_2)_T^{t=t} - (\text{CO}_2)_T^{t=0} \quad (\text{Equação 7})$$

Onde:

$\Sigma(\text{CO}_2)_T^t$: é a quantidade acumulada de dióxido de carbono, em gramas, envolvida nos frascos com composto e amostras entre o início do teste e o tempo t .

$(\text{CO}_2)_T^{t=0}$ e $(\text{CO}_2)_T^{t=t}$: são as massas do sistema de captura de CO₂, em gramas, no início do teste e no tempo t .

Calculou-se também $\Sigma(\text{CO}_2)_R^t$ e $\Sigma(\text{CO}_2)_B^t$ da mesma forma para a quantidade de CO₂ envolvida no frasco de controle positivo (celulose) e no frasco com o branco (apenas o composto), respectivamente.

Para o cálculo da percentagem de mineralização para cada frasco com as amostras em teste foi utilizada a equação 8.

$$\text{Mineralização (\%)} = \frac{\Sigma(\text{CO}_2)_T^t - \Sigma(\text{CO}_2)_B^t}{\text{TCO}_2} \times 100 \quad (\text{Equação 8})$$

Onde:

$\Sigma(\text{CO}_2)_T^t$: é a quantidade acumulada de dióxido de carbono, em gramas, envolvido nos frascos com composto e amostras entre o início do teste e o tempo t.

$\Sigma(\text{CO}_2)_B^t$: é a quantidade acumulada, em gramas, envolvida no frasco com composto (branco) entre o início do teste e o tempo t.

TCO_2 : é a quantidade teórica de dióxido de carbono, em gramas, nas amostras.

A quantidade teórica de dióxido de carbono foi quantificada segundo a Equação 9:

$$\text{TCO}_2 = m \times w \times \frac{44}{12} \quad (\text{Equação 9})$$

Onde:

m: massa do material, em gramas, utilizada no teste.

w: teor de carbono da amostra (%).

12 e 44 são as massas atômica e molecular do carbono e do gás carbônico, respectivamente.

Para a determinação do teor de carbono nas amostras (w), estas foram encaminhadas para a Central Analítica do Instituto de Química da Universidade de São Paulo (USP). Foram feitas análises em duplicata utilizando um Analisador Elementar Perkin Elmer – Series II 2400. A Tabela 4 apresenta os valores médios obtidos pela determinação do teor de Carbono nas amostras.

Tabela 4. Teor de Carbono nas amostras de PLA e nanocompósitos

Amostras	% C
PLA	49,91
PLA/CLO20A	49,10
PLA/CLO30B	48,70
Celulose microcristalina	41,95

3.4. Análise de visual e monitoramento de peso molecular

Amostras de dimensões 3 cm x 3 cm (0,5 mm de espessura) foram submetidas à degradação em composto orgânico, em um recipiente de vidro, fechado, mantido à estufa a 58°C. Inicialmente, a base do recipiente (cerca de 1,5 cm de altura) foi coberta com o composto. Em seguida, 9 amostras de cada material foram dispostas sobre esta camada, sendo posteriormente cobertas com uma coluna de 6 cm de composto.

Nesta etapa foi utilizado um composto fornecido pela Usina de Compostagem de Bom Jesus dos Perdões. O composto foi preparado à base de bagaço de cana, palha de braquiária, palha de capim elefante, farelo de soja, ureia, sulfato de amônia, cloreto de potássio, superfosfato simples, carbonato de cálcio e gesso. Após 65 dias passados desde o início do processo de compostagem, o composto orgânico foi passado em peneira com diâmetro de furo de 5 mm. O composto foi caracterizado pelo Laboratório de Análise de Solo e Planta, no Centro de Solos e Recursos Agroambientais - Instituto Agronômico de Campinas. Os parâmetros carbono orgânico, nitrogênio e umidade, foram quantificados conforme as metodologias descritas pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA, 2007) e o pH foi determinado em uma mistura de água destilada e o composto, conforme Sonneveld (1974). Os resultados encontram-se na Tabela 5.

Tabela 5. Características do composto orgânico

Parâmetros	Resultados
Carbono Orgânico	381,6 g/Kg
Nitrogênio	14,2 g/Kg
Relação C/N	26,9
Umidade	47,9 %
pH	6,5

Foram retiradas 4 replicatas de cada amostra em tempos predeterminados (15 e 30 dias), para avaliação do aspecto visual. Com a amostra adicional de cada material foi realizado o monitoramento do peso molecular em tempos predeterminados (antes do início do ensaio, e após 15 e 30 dias). A determinação do peso molecular foi realizada mediante a técnica de Cromatografia de Permeação em Gel (GPC), com o equipamento HPLC ELDEX, modelo CH-150, com detector IR Viscotek VE 3580 e colunas Shodex KF-804L e

KF-805, instalado no Laboratório de Misturas Poliméricas e Compósitos Condutores do Instituto de Macromoléculas- UFRJ. As formulações foram solubilizadas em Tetrahidrofurano (THF), na concentração de polímero de 1 mg/mL. A temperatura utilizada foi de 40°C, o fluxo de 1,0 mL/min, sendo a fase móvel o solvente THF. Foram utilizados para calibração os padrões de poliestireno marca Phenomenex: 2.300, 12.800, 43.500, 65.000, 100.000, 226.000, 335.000, 520.000, 1.000.000 e 1.800.000.

3.5. Bioensaio com organismo *Allium cepa*

3.5.1. Degradação das amostras em composto

Foram preparadas misturas de 50 g de amostras dos materiais (com dimensões de 1 cm²) e 300 g de composto orgânico. Cada mistura foi colocada em um frasco de vidro hermeticamente fechado de capacidade de 1L. Nesta etapa foi utilizado o composto orgânico fornecido pela Usina de Compostagem de Bom Jesus dos Perdões, cujas características estão indicadas na Tabela 6. Um frasco de vidro contendo apenas 300 g de composto (controle) também foi submetido ao mesmo tratamento. Os frascos foram mantidos em estufa a 58°C por 76 dias, até que não fossem verificados resíduos das amostras. Durante este tempo foram realizados revolvimentos periódicos (a cada dois dias) para favorecer a aeração.

3.5.2. Ensaio com sementes de *Allium cepa*

O ensaio com sementes de *Allium cepa* foi realizado com a supervisão da Profa. Dra. Maria Aparecida Marin-Morales, no Laboratório de Mutagênese Ambiental, locado no Departamento de Biologia do Instituto de Biociências da UNESP-campus Rio Claro. O solubilizado das amostras de composto após a degradação do PLA (COMP-PLA) e dos nanocompósitos (COMP-PLA/CLO20A e COMP-PLA/CLO30B), bem como o solubilizado da amostra de composto puro (COMP) foram obtidos com base na norma ABNT 10006-04, pela mistura de 100 g de cada amostra (peso seco) e 400 mL de água destilada. O peso seco foi determinado pela secagem das amostras por 24h à 105°C, em

triplicata. Os resultados dos valores médios de peso seco, bem como a massa utilizada de cada amostra para o preparo do solubilizado, encontram-se na Tabela 6.

Tabela 6. Dados quantificados para o preparo do solubilizado

Amostras de composto	Peso seco (%)	Massa de composto (g)
COMP	48,9	204,7
COMP-PLA	44,2	226,5
COMP-PLA/CLO20A	46,3	216,2
COMP-PLA/CLO30B	50,3	198,8

Após agitação das misturas pelo período de 5 minutos, estas foram cobertas com filme de PVC e mantidas em repouso pelo período de 7 dias, à temperatura de 22°C. Em seguida, foi realizada a filtração das soluções em membrana com 0,45 µm de porosidade.

Sementes de *A. cepa* da variedade Baia periforme, dispostas em placas de Petri forradas com papel de filtro, foram submetidas à germinação nos solubilizados preparados para os diferentes tratamentos (COMP, COMP-PLA, COMP-PLA/CLO20A e COMP-PLA/CLO30B), à temperatura de 22°C. Para avaliação da frequência basal das alterações também foi realizada a germinação em água ultrapura, controle negativo (CN) do ensaio. Foram utilizadas, como controles positivos, as substâncias: metil metano sulfonato (MMS), de ação clastogênica (RANK;NIELSEN, 1997), na concentração de 4.10^{-4} M, e o herbicida trifluralina (TRF), que possui ação aneugênica (FERNANDES *et al.*, 2007), na concentração de 0,84 ppm de princípio ativo. Foram realizadas duas repetições por tratamento.

Quando as raízes atingiram cerca de 2 cm de comprimento, foram coletadas e armazenadas em um frasco de vidro contendo fixador Carnoy, uma mistura de álcool/ácido acético (3:1 – v/v), por 6 horas em temperatura ambiente. Decorrido este tempo, foi realizada a troca por fixador recém-preparado, para posterior armazenamento das raízes a 4°C, até a sua utilização na confecção das lâminas. O teste em células meristemáticas de radículas de *A. cepa* foi realizado de acordo com o protocolo estabelecido por Grant (1982), com algumas modificações. As raízes fixadas foram submetidas à coloração em reativo de Schiff. Para o preparo das lâminas, os meristemas foram dispostos em lâminas contendo uma gota de carmim acético (2%) e recobertos com lamínulas, sendo suavemente

esmagados. As lamínulas foram retiradas em nitrogênio líquido e as lâminas permanentes foram montadas com resina sintética para análise.

A análise das lâminas foi realizada em um microscópio de luz (marca Nikon, modelo Eclipse E200), utilizando-se a objetiva de 40x. Foi realizada a contagem de cerca de 5000 células por tratamento, sendo 500 células por lâmina e 10 lâminas avaliadas para cada tratamento. As análises estatísticas foram realizadas no software BioEstat 5.0, sendo aplicado o teste de Mann-Whitney, a 0,05 de nível de significância.

Para a avaliação de citotoxicidade, foi calculado o Índice Mitótico (IM), obtido pela relação entre o número total de células em divisão (prófase, metáfase, anáfase e telófase) e o número total de células observadas, conforme a Equação 10:

$$IM = \frac{\text{Número de células em divisão}}{\text{Número de células observadas}} \times 100 \quad (\text{Equação 10})$$

Para avaliação da genotoxicidade, foi quantificado o Índice de Alterações Cromossômicas (IAC) de acordo com a Equação 11, considerando as aberrações cromossômicas (aderência, poliploidia, perda, c-metáfase, multipolaridade, ponte e perda) e alterações nucleares (célula binucleada, célula trinucleada e núcleo lobulado).

$$IAC = \frac{\text{Número de células alteradas}}{\text{Número de células observadas}} \times 100 \quad (\text{Equação 11})$$

Foram considerados como *endpoints* de mutagenicidade as quebras e os micronúcleos, sendo a soma destas alterações utilizadas para o cálculo do Índice de Mutagenicidade (IMut), de acordo com a Equação 12.

$$IMut = \frac{\text{Número de células alteradas}}{\text{Número de células observadas}} \times 100 \quad (\text{Equação 12})$$

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1. Preparo das amostras de PLA e nanocompósitos

O PLA granulado e as argilas foram misturados por alto cisalhamento em um equipamento de mistura, conforme ilustrado na Figura 19.

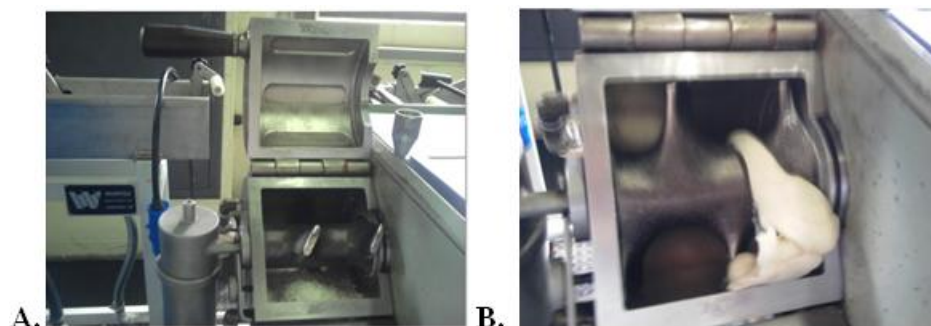


Figura 19. Câmara do misturador: **A.** antes; **B.** após a mistura de argila organofílica Cloisite 20A e PLA.

As amostras de nanocompósitos (Figura 20) apresentaram aspecto homogêneo e translúcido, indicando uma boa dispersão das partículas de argila na matriz polimérica de PLA, e provável subdivisão das mesmas, permitindo a translucidez dos materiais (ZENG *et al.*, 2005).

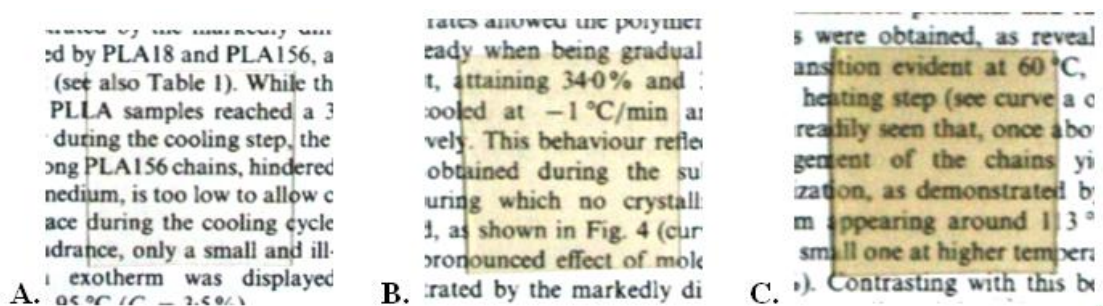


Figura 20. Aspecto visual das amostras: **A.** PLA; **B.** PLA/CLO20A; **C.** PLA/CLO30B.

Como será visto na sequência, essas partículas sofreram esfoliação, separando-se em lâminas nanométricas em espessura, com dimensão inferior ao comprimento de onda da luz visível (ZENG *et al.*, 2005).

4.2. Caracterização dos nanocompósitos

4.2.1. Difração de Raios-X (DRX)

Os difratogramas completos das argilas organofílicas, do PLA e seus nanocompósitos encontram-se disponíveis no Apêndice A. A Figura 21 mostra os difratogramas das argilas Cloisite 20A e Cloisite 30B, e os respectivos nanocompósitos de PLA.

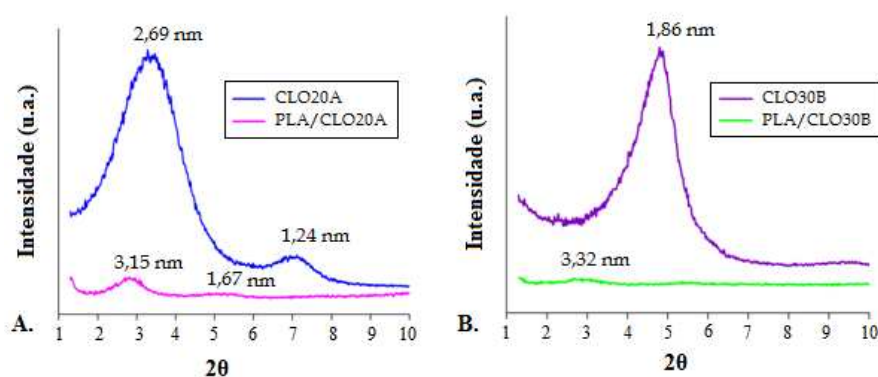


Figura 21. Difratogramas de raios-X das argilas organofílicas: **A.** Cloisite 20A; **B.** Cloisite 30B, e seus respectivos nanocompósitos.

O aumento da distância interplanar é refletido no difratograma pela redução do ângulo de difração, e pode ser visualizada na forma do deslocamento dos picos de DRX para ângulos menores. Este deslocamento foi observado nos difratogramas dos nanocompósitos de PLA e argilas Cloisite 20A e Cloisite 30B, em comparação aos difratogramas das argilas puras, indicando que houve intercalação de cadeias poliméricas entre as camadas de argila.

A Tabela 7 representa os valores do espaçamento basal e ângulos de difração obtidos pela análise dos difratogramas das amostras de argilas e nanocompósitos, calculados de acordo com a Lei de Bragg.

Tabela 7. Valores de espaçamentos basal das argilas organofílicas e nanocompósitos

Amostras	Espaçamento basal (nm)	2θ(°)
CLO 20A	2,69	3,28
CLO 30B	1,86	4,74
PLA/CLO 20A	3,15	2,80
PLA/CLO 30B	3,32	2,66

O valor de espaçamento basal, referente aos planos d(001) da argila Cloisite 20A foi 2,69 nm ($2\theta=3,28^\circ$), superior ao apresentado pela argila Cloisite 30B, com um valor de 1,86 nm ($2\theta=4,74^\circ$). Os valores quantificados são próximos aos informados nas fichas técnicas das argilas (2,42 nm e 1,85 nm, respectivamente). A argila não modificada (Cloisite Na⁺), também conforme informado em sua ficha técnica, apresenta um espaçamento basal de 1,17 nm. A maior quantidade de cátions na galeria da Cloisite 20A pode favorecer o maior espaçamento basal desta argila em relação à Cloisite 30B (LI *et al.*, 2006). Além disso, a presença de dois grupos ‘*tallow*’ (grupos de cadeia longa de carbono ligados ao íon quaternário de amônio) na estrutura do agente modificador da Cloisite 20A, em comparação a apenas um grupo presente no agente modificador da Cloisite 30B, pode prover um maior espaçamento basal após a modificação da argila (KATIIYAR, NANAVALI, 2011).

Para a caracterização de nanocompósitos os picos de interesse são os que aparecem em regiões entre 2° a 3° na escala 2 θ , que representam os espaçamentos basais correspondentes aos planos d(001) da argila (PAIVA *et al.*, 2006). Para o nanocompósito de PLA e a argila Cloisite 20A foi observado um espaçamento basal de 3,15 nm ($2\theta=2,80^\circ$), apresentando um aumento de 0,46 nm em relação à argila pura, indicando uma possível estrutura intercalada. O difratograma da argila Cloisite 20A representado na Figura 1 apresentou um segundo pico em torno de 7,12°. A presença de um segundo pico para a Cloisite 20A também foi notada nos trabalhos reportados por Paiva *et al.* (2006), Li *et al.* (2006), Stoeffler *et al.* (2008) e Litchfield *et al.* (2010) e tem sido atribuída à reflexão de planos d(002). Este pode representar um pico de segunda ordem, uma vez que o valor de espaçamento calculado é aproximadamente a metade daquele referente ao plano d(001) (MANDALIA, BERGAYA, 2006). No caso de argilominerais é comum encontrar referências à reflexão dos planos (002) e (003) como sendo segunda e terceira ordens do

plano (001) (SANTOS, 1989). Este segundo pico sofreu deslocamento para $5,28^\circ$, representando uma mudança no espaçamento de 1,24 nm para 1,67 nm.

A argila organofílica Cloisite 30B, por sua vez, apresentou um espaçamento basal de 3,32 nm ($2\theta=2,66^\circ$). Houve, portanto, uma variação de 1,46 nm em relação à argila pura, superior à apresentada pelo nanocompósito de PLA com Cloisite 20A. A diferença no grau de intercalação observada para os nanocompósitos de PLA/Cloisite 20A e PLA/Cloisite 30B corrobora com outros resultados reportados na literatura e pode estar relacionada à diferença química entre os agentes modificadores das argilas (KRAMSCHUSTER *et al.*, 2007; LI *et al.*, 2006; PLUTA *et al.*, 2006). O cátion interlamelar da Cloisite 30B apresenta grupos hidroxila em sua estrutura, o que favorece fortes interações originadas de ligações de hidrogênio entre os grupamentos carbonilas do polímero e os grupamentos hidroxilas do modificador orgânico (FUKUSHIMA *et al.*, 2009).

A Figura 22 ilustra a comparação entre os difratogramas da amostra de PLA puro e seus nanocompósitos com as diferentes argilas organofílicas. O difratograma da matriz pura de PLA apresentou um pico largo a 17° , indicando uma estrutura predominantemente amorfa. O padrão de difração não foi influenciado pela presença das argilas organofílicas. Fukushima *et al.* (2009), em estudo com a mesma resina estudada neste trabalho (4042D), apresentou um difratograma de comportamento semelhante, tanto para o PLA como o nanocompósito de PLA e Cloisite 30B.

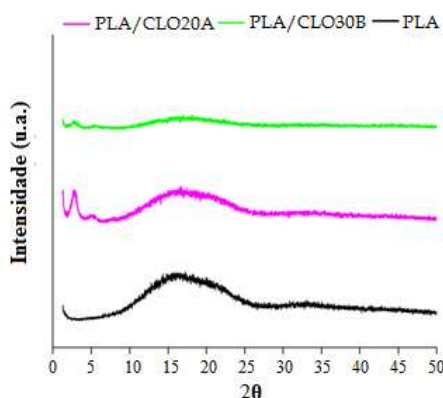


Figura 22. Difratogramas de raios-X do PLA e nanocompósitos.

Conforme informado pelo fabricante a resina 4042D contém cerca de 4,25% de unidades D-ácido lático. A presença dessas unidades D promovem irregularidades na cadeia (AURAS *et al.*, 2004) favorecendo uma estrutura predominantemente amorfa.

4.2.2. Microscopia eletrônica de Transmissão (MET)

As micrografias obtidas pela análise de Microscopia Eletrônica de Transmissão para os nanocompósitos PLA/CLO20A e PLA/CLO30B estão apresentadas nas Figuras 23 a 26, e permitiram a observação de diferentes fases. Outras micrografias das amostras PLA/CLO20A e PLA/CLO30B encontram-se apresentadas no Apêndice B. As imagens em baixa magnificação, como as apresentadas na Figura 23, indicaram uma dispersão mais homogênea da argila na amostra PLA/CLO30B.

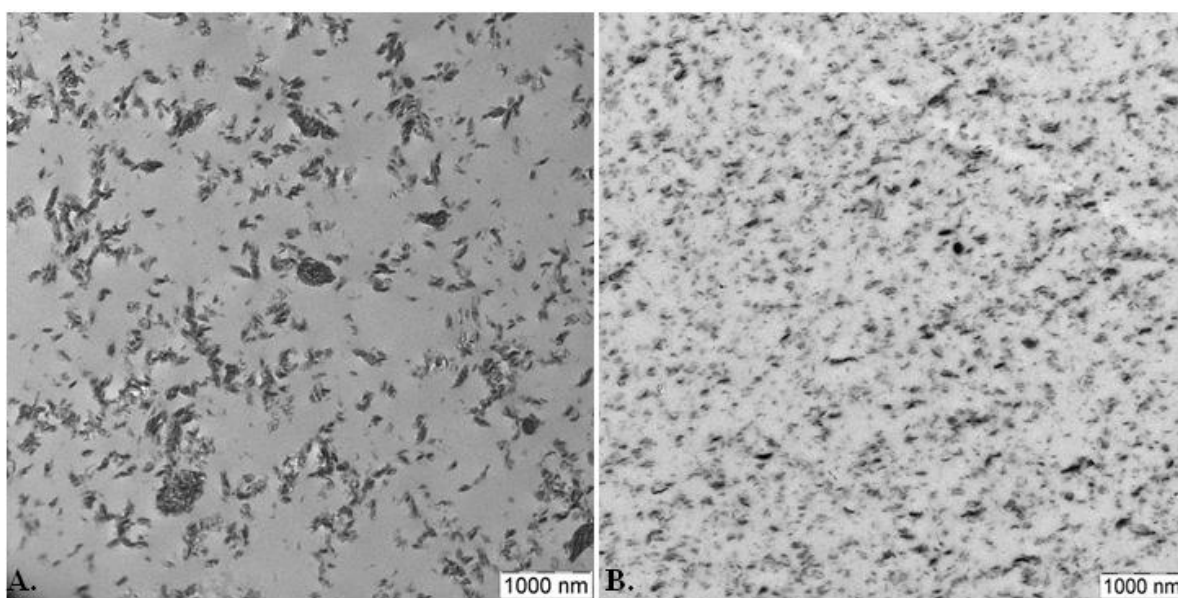


Figura 23. Micrografia dos nanocompósitos (aumento de 4.000 x): **A.**PLA/CLO20A; **B.** PLA/CLO30B.

Em ambas as amostras foram observadas algumas regiões mais escuras, como as destacadas na Figura 24, indicando a presença de aglomerados.

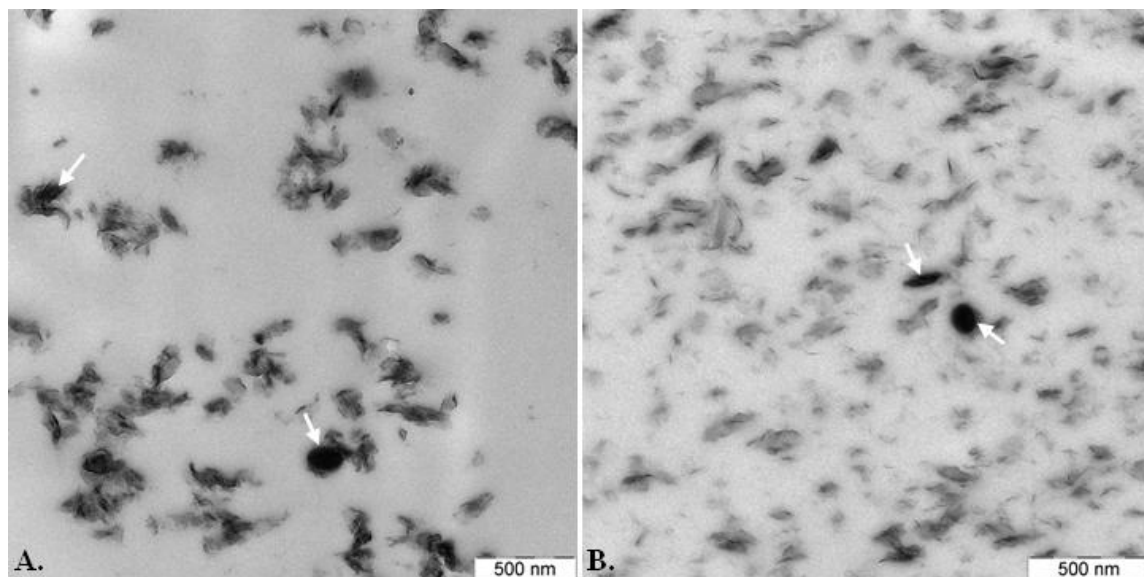


Figura 24. Micrografia dos nanocompósitos (aumento de 10.000 x): **A.** PLA/CLO20A; **B.** PLA/CLO30B.

Também foram observadas regiões de fase dispersa com camadas flexíveis e altamente espalhadas, com tom claro (Figura 25), que sugerem a presença de regiões esfoliadas nas amostras avaliadas (PAIVA *et al.*, 2012).

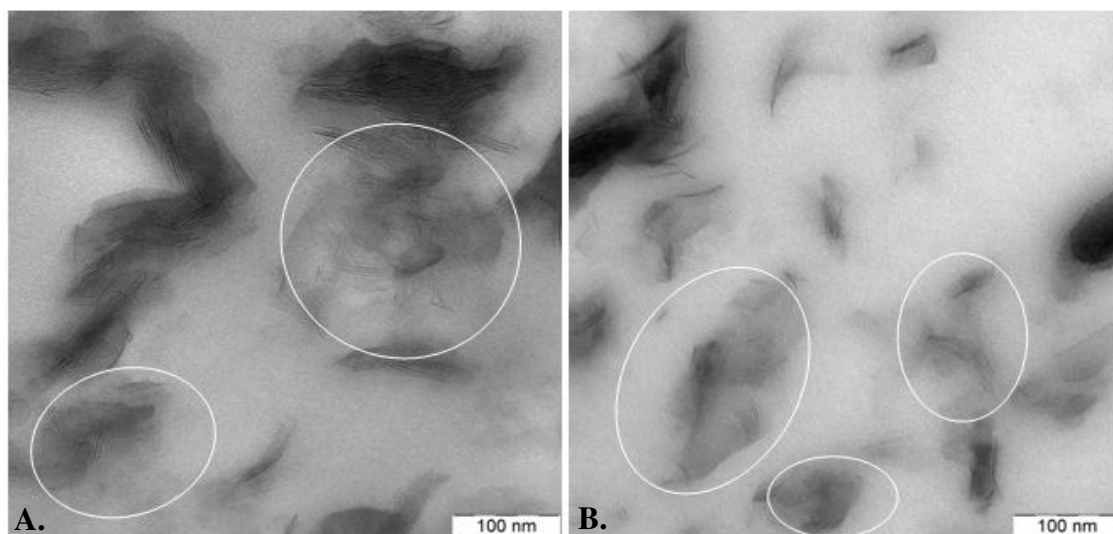


Figura 25. Micrografia dos nanocompósitos (aumento de 63.000 x): **A.** PLA/CLO20A; **B.** PLA/CLO30B.

Em poucas imagens foi possível identificar a estrutura do tipo intercalada. Como exemplo tem-se a micrografia da Figura 26A, na qual valores de espaçamento basal foram quantificados diretamente pela análise da imagem.

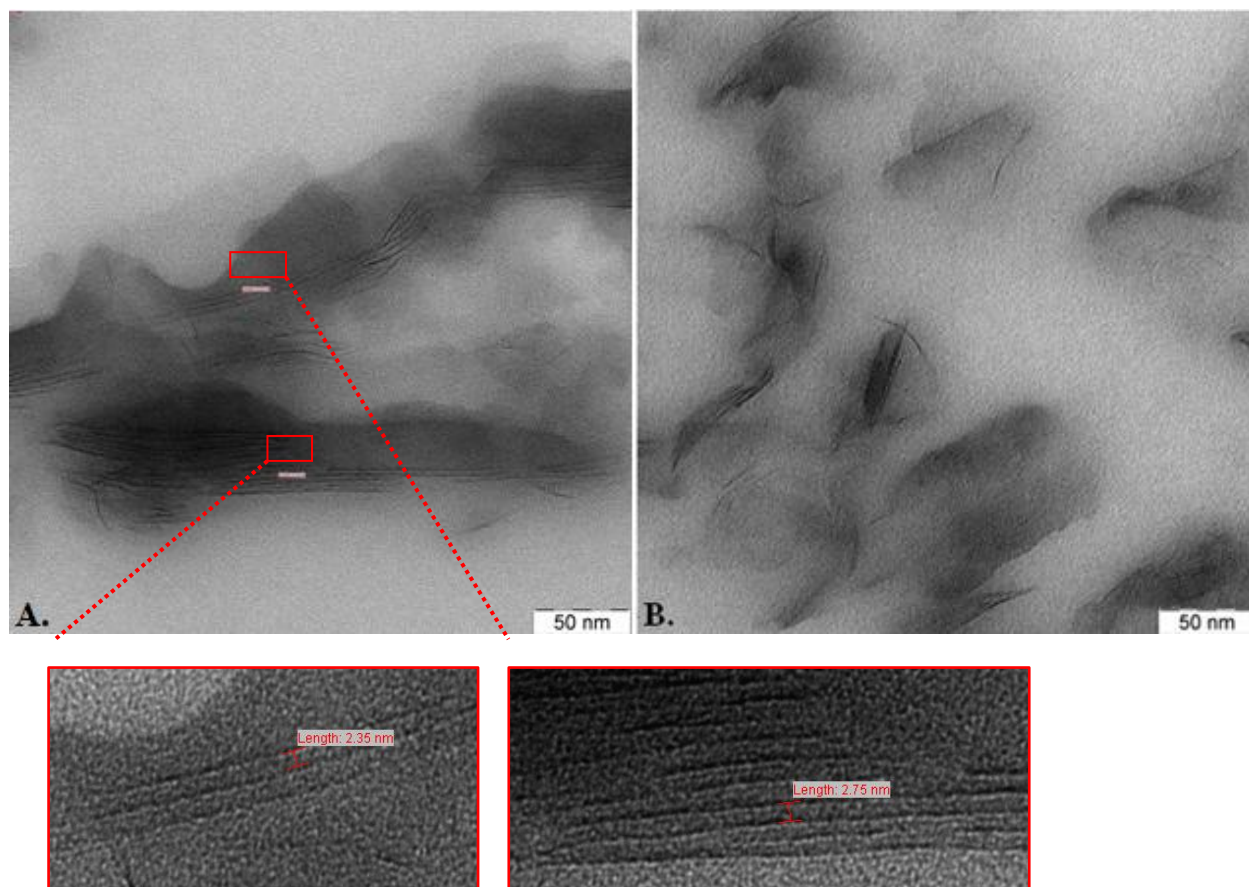


Figura 26. Micrografia dos nanocompósitos (aumento de 100.000 x): **A.**PLA/CLO20A; **B.** PLA/CLO30B.

Observou-se, principalmente no caso da Cloisite 30B, um alto grau de esfoliação, como ilustrado na Figura 26B, coerente com a maior afinidade química de seu modificador com o polímero, em comparação ao modificador da Cloisite 20A. Isso mostra que, além do cisalhamento, a afinidade química da argila pela matriz interfere em seu grau de esfoliação.

As micrografias permitem complementar a análise da morfologia dos nanocompósitos realizada mediante a técnica de DRX, na qual foi verificada a intercalação,

evidenciando que a estrutura apresentada pelos nanocompósitos estudados não é unicamente intercalada, apresentando também regiões esfoliadas.

4.2.3. Análise Termogravimétrica (TGA)

As curvas obtidas pela análise termogravimétrica das argilas, PLA e nanocompósitos encontram-se no Apêndice C. A Figura 27 mostra as curvas de termogravimetria (TG) e de termogravimetria derivada (DTG) para as argilas organofílicas Cloisite 20A e Cloisite 30B.

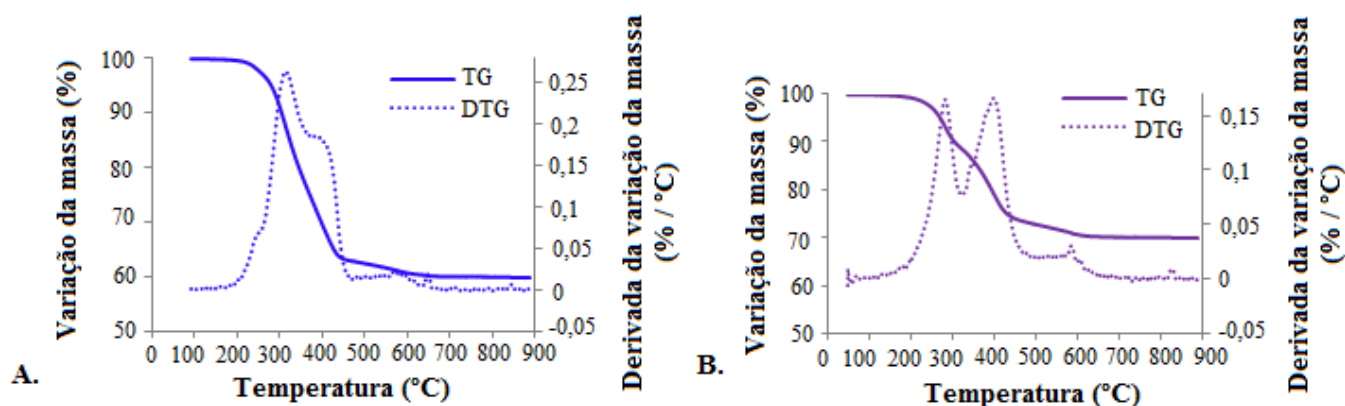


Figura 27. Curvas de TG e DTG das argilas organofílicas: **A.** Cloisite 20A; **B.** Cloisite 30B.

As argilas Cloisite 20A e Cloisite 30B apresentaram um resíduo de 60% e 70%, respectivamente, referente à fração inorgânica, o que permite estimar o teor de sal orgânico em 40% para a argila Cloisite 20A e 30% para a Cloisite 30B. Os resultados obtidos foram coerentes com os valores apresentados nas fichas técnicas das argilas (38% para Cloisite 20A e 30% para Cloisite 30B). As Figuras 28 e 29 mostram as curvas termogravimétricas e as curvas derivadas para os materiais em estudo, respectivamente.

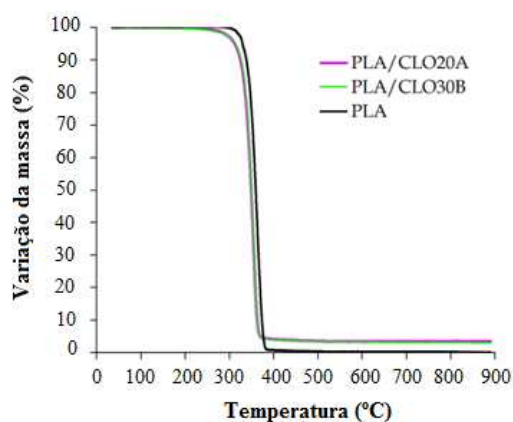


Figura 28. Curvas de variação da massa do PLA e seus nanocompósitos em função da temperatura.

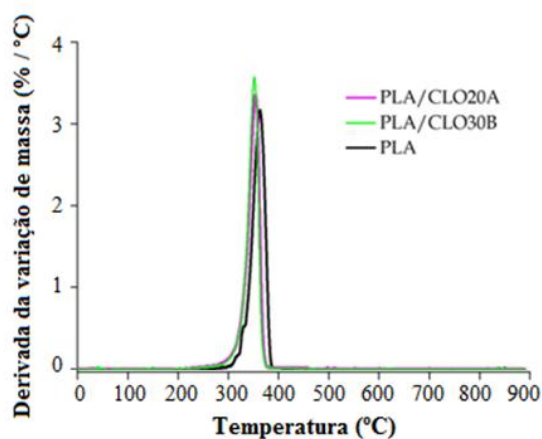


Figura 29. Curvas derivadas da variação de massa do PLA e seus nanocompósitos em função da temperatura.

A Tabela 8 apresenta os dados obtidos pela análise termogravimétrica: $T_{5\%}$ (temperatura na qual ocorre perda de 5% em massa), $T_{\text{máx}}$ (temperatura na qual a taxa de perda de massa é máxima) e a percentagem de resíduo, obtidos a partir das curvas termogravimétricas e curvas derivadas para as diferentes amostras. Na Tabela 8 também estão relacionados os valores estimados de teor de argilas organofílicas, calculados com base nos valores no resíduo inorgânico a 800°C para as amostras de nanocompósitos e na fração inorgânica das argilas organofílicas, quantificadas previamente.

Tabela 8. Dados obtidos pelas curvas de variação de massa e curvas derivadas

Amostras	T_{5%} (°C)	T_{máx} (°C)	Resíduo 800°C (%)	Teor estimado de argila organofílica (%)
PLA	330	363	0	0
PLA/CLO20A	312	354	3	5
PLA/CLO30B	314	353	3	4

Em geral espera-se um aumento de estabilidade térmica com a adição das camadas de argila na matriz polimérica. É bem aceito que a melhoria da estabilidade térmica ocorre principalmente devido ao fato de que as camadas de argila dificultam a liberação dos produtos voláteis, provenientes da decomposição (ALEXANDRE,DUBOIS, 2000; GILMAN, 1999; ZHU *et al.*,2001). Os resultados da Tabela 8 indicam um efeito contrário ao esperado, com redução da estabilidade térmica, notada pela redução nos valores de T_{5%} e T_{máx}. Comportamento semelhante foi obtido em outros estudos com nanocompósitos de PLA e argilas organofílicas, descritos por Ogata *et al.* (1997), Chang *et al.* (2003) e Wu *et al.* (2006). De acordo com Hsieh *et al.* (2004), a redução de estabilidade térmica em nanocompósitos pode estar relacionada com a instabilidade dos cátions presentes no modificador da argila organofílica.

A hipótese de que a redução da estabilidade em nanocompósitos está relacionada à degradação dos agentes modificadores é coerente com os resultados obtidos neste trabalho, pois os valores de temperatura de perda de 5% em massa das argilas organofílicas, obtidos a partir das curvas termogravimétricas da Figura 27, foram 279 °C (Cloisite 20A) e 268 °C (Cloisite 30B), valores inferiores à temperatura de *onset* de degradação do polímero puro (330 °C), o que tende a reduzir a T_{5%} para os nanocompósitos em relação ao PLA, como observado pela análise termogravimétrica.

4.2.4. Calorimetria Diferencial Exploratória (DSC)

As curvas dos ciclos de primeiro aquecimento, resfriamento e segundo aquecimento obtidas para o PLA e os nanocompósitos estão apresentadas no Apêndice D. A Figura 30 mostra as curvas de DSC no primeiro aquecimento.

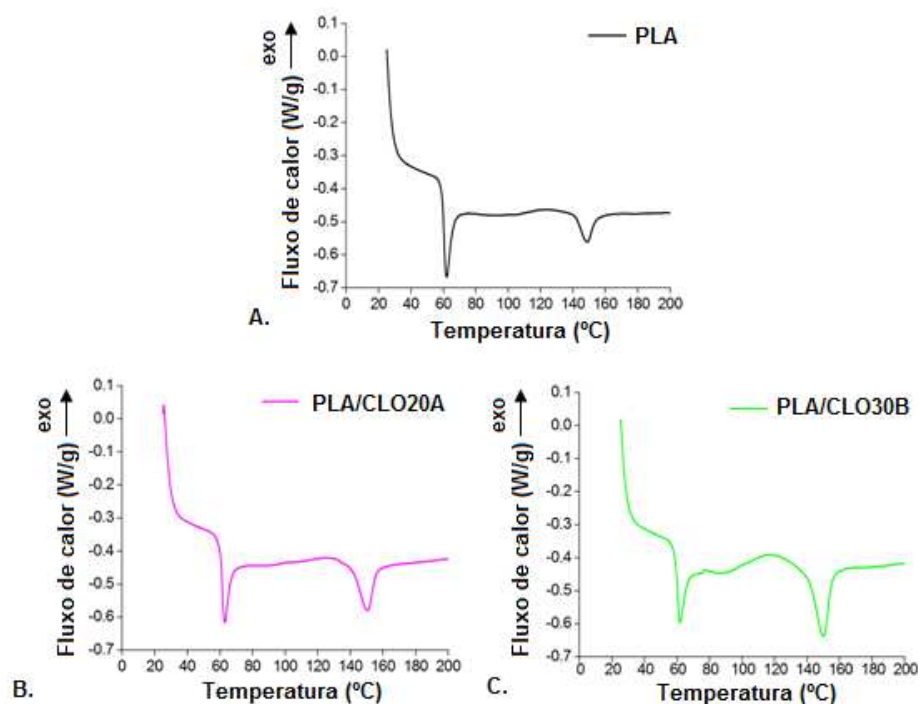


Figura 30. Curvas de DSC: **A.** PLA; **B.** PLA/CLO20A; **C.** PLA/CLO30B.

No primeiro aquecimento as curvas de DSC (Figura 30) apresentaram uma transição endotérmica próxima ao final da transição vítrea. Esta transição é característica de materiais que apresentam a temperatura de transição vítrea próxima à temperatura ambiente (temperatura de uso do material) e é conhecida como relaxação de entalpia. Nesta condição, conforme descrito por Pan *et al.* (2007), abaixo da T_g o material apresenta um estado vítreo termodinamicamente instável. Assim, o sistema tende a alcançar o equilíbrio mediante a rearranjos lentos. Este fenômeno, conhecido por envelhecimento físico (*aging*), implica na relaxação das cadeias poliméricas e consequente redução de volume livre. Assim, para uma amostra que sofre envelhecimento, quando aquecida, torna-se necessária uma energia maior para a transição vítrea, caracterizando o pico endotérmico. Os autores estudaram este processo em amostras de PLLA, e notaram que quanto maior o tempo de envelhecimento ao qual a amostra é submetida, maior a área do pico endotérmico.

A Tabela 9 apresenta os dados obtidos pela curva de primeiro aquecimento, referentes à temperatura de transição vítrea (T_g), temperatura de *onset* de cristalização

(T_{onset}), temperatura de cristalização (T_c), temperatura de fusão (T_m), entalpia de cristalização (ΔH_{cc}), entalpia de fusão (ΔH_m) e grau de cristalinidade (X_c).

Tabela 9. Dados obtidos pela curva do primeiro aquecimento na análise por DSC

Amostra	T_g (°C)	T_{onset} (°C)	T_c (°C)	T_m (°C)	ΔH_{cc} (J/g)	ΔH_m (J/g)	X_c (%)
PLA	59	106	123	149	2	4	3
PLA/CLO20A	60	93	125	151	3	8	6
PLA/CLO30B	57	92	115	150	7	12	6

A temperatura de *onset* de cristalização (T_{onset}), inferior para os nanocompósitos em relação à matriz pura, indica que as camadas de argila atuam como agentes nucleantes, favorecendo a cristalização do polímero, o que reflete nos maiores valores de grau de cristalinidade calculados para os nanocompósitos com as argilas Cloisite 20A e Cloisite 30B, em comparação ao PLA puro. O aumento do grau de cristalinidade após a incorporação de argilas organofílicas em nanocompósitos de PLA também foi observado por Nam *et al.* (2003) e Ray e Okamoto (2003a).

Durante o resfriamento não foram observados picos exotérmicos, referentes à cristalização, em nenhuma das curvas de DSC o que pode estar relacionado à taxa de resfriamento utilizada (10°C/min). O trabalho realizado por Migliaresi *et al.* (1991) explorou a influência da taxa de resfriamento na cristalização de amostras de PLLA. Os autores ressaltaram que com taxas de resfriamento mais lentas (como 1 e 0,5°C/min) o polímero permanece períodos mais longos em uma faixa de temperatura que favorece a cristalização. Se o resfriamento é mais rápido (5°C/min) a temperatura diminui muito rápido e a mobilidade molecular é estagnada antes que seja possível a organização para formação de cristalitos.

Conforme Pluta *et al.* (2002) a taxa de resfriamento de 10°C/min tem o efeito de um processo de *quenching* (têmpera), no qual devido ao rápido resfriamento, há o impedimento da cristalização do polímero. Fukushima *et al.* (2009), em trabalho conduzido com nanocompósitos de PLA (*grade* 4042D) e Cloisite 30B (5%), utilizando a mesma taxa de aquecimento/resfriamento, obtiveram resultado semelhante pela análise de DSC, com

ausência de pico exotérmico no resfriamento para o polímero puro, bem como para o nanocompósito.

Os dados referentes às curvas de DSC no segundo aquecimento estão representados na Tabela 10.

Tabela 10. Dados obtidos pela curva do segundo aquecimento na análise por DSC

Amostra	T_g (°C)	T_{onset} (°C)	T_c (°C)	T_m (°C)	ΔH_{cc} (J/g)	ΔH_m (J/g)	X_c (%)
PLA	58	114	130	150	7	8	1
PLA/CLO20A	57	114	129	151	1	2	1
PLA/CLO30B	56	116	130	151	4	5	1

No segundo aquecimento, observou-se que as temperaturas T_{onset} e T_c para todas as amostras foram superiores em relação às observadas no primeiro aquecimento. Este comportamento possivelmente está relacionado com os diferentes estados iniciais das amostras antes de cada aquecimento. Inicialmente, tinha-se uma amostra que sofreu envelhecimento físico. Por outro lado, após a fusão do material este efeito foi eliminado, motivo pelo qual não foi observado o pico de relaxação de entalpia na segunda varredura. Pan *et al.* (2008) observaram que amostras de PLLA que sofreram o envelhecimento físico apresentaram o pico de cristalização à frio em temperaturas mais baixas do que aquelas em que este efeito foi eliminado, o que foi atribuído aos rearranjos conformacionais decorrentes do processo de envelhecimento. Para estas condições, onde a história térmica das amostras foi eliminada durante a própria análise, não foram observadas alterações no grau de cristalinidade em função da presença das argilas.

4.3. Avaliação do grau de mineralização

A Tabela 11 apresenta os valores de ganho de massa das colunas 3 e 4 do aparato utilizado para a avaliação da percentagem mineralização do PLA e dos nanocompósitos (Figura 18). Este ganho de massa é o parâmetro utilizado para a quantificação do gás carbônico liberado devido à biodegradação das amostras em cada biorreator. Os resultados do ensaio, quantificados mediante os dados da Tabela 11 e a aplicação da Equação 8 (página 25), estão representados na Tabela 12.

Tabela 11. Ganho de massa das colunas 3 e 4 do aparato para a análise de biodegradação

Tempo (dias)	Massa (g)				
	Branco	Celulose	PLA	PLA/CLO20A	PLA/CLO30B
0	791,85	779,04	800,01	768,85	762,13
12	792,31	779,68	800,63	769,38	762,58
19	792,45	780,17	800,90	769,78	762,90
26	792,47	780,42	801,16	770,02	763,12
33	792,47	780,59	801,37	770,30	763,34
40	792,48	780,69	801,53	770,50	763,46
46	792,56	780,88	801,84	770,70	763,66
52	792,57	780,90	801,96	770,81	763,67

Tabela 12. Valores de mineralização do controle positivo, PLA e seus nanocompósitos

Tempo (dias)	Mineralização (%)			
	Celulose	PLA	PLA/CLO20A	PLA/CLO30B
12	12	9	4	-1
19	34	15	18	9
26	49	29	31	21
33	60	40	46	33
40	66	49	57	39
46	74	61	63	46
52	74	67	69	46

As curvas de mineralização para os diferentes materiais em estudo encontram-se na Figura 31.

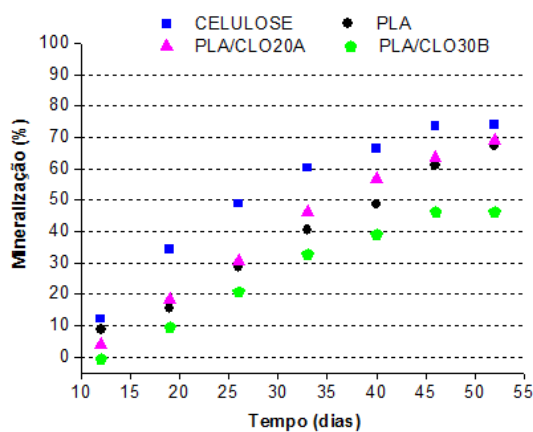


Figura 31. Percentagem de mineralização para o PLA e nanocompósitos.

A norma ISO 14855-2 recomenda que após 45 dias o material de referência (celulose) deve apresentar uma percentagem de mineralização superior a 70%. Na medição realizada após 46 dias neste estudo foi verificado um valor de 74%, indicando uma resposta adequada do controle positivo para as condições de compostagem utilizadas. As amostras de PLA e do nanocompósito PLA/CLO20A apresentaram curvas muito próximas, e um grau de mineralização de 67% e 69%, respectivamente, no último dia de medição (após 52 dias do início do teste). Comparando-se os dados obtidos na última medição, verificou-se que estes materiais atenderam ao requisito da biodegradação para plásticos considerados compostáveis, conforme a norma ASTM D6400-12, uma vez que atingiram a percentagem de 90% de mineralização daquela apresentada pelo controle positivo.

O nanocompósito PLA/CLO30B apresentou um comportamento distinto dos outros materiais em teste. Na primeira medição realizada no ensaio de biodegradação, foi verificado que a percentagem de mineralização quantificada para o composto puro foi superior ao resultado obtido para o nanocompósito PLA/CLO30B, levando a um valor negativo para o grau de mineralização quantificado. Em todas as medições, os menores valores foram identificados para este nanocompósito, sendo o único material a não atingir ao mínimo recomendado pela ASTM D6400-12 no tempo de ensaio. Este material apresentou um valor máximo de mineralização de 46%, alcançado em 46 dias. É possível que a menor taxa de mineralização apresentada pelo nanocompósito PLA/CLO30B, em relação aos outros materiais, esteja relacionada a uma propriedade antimicrobiana da argila presente em sua composição.

Hong e Rhim (2008) avaliaram a atividade antimicrobiana das argilas Cloisite Na⁺, Cloisite 20A e Cloisite 30B utilizando bactérias gram-positivas (*Staphylococcus aureus* e *Listeria monocytogenes*) e gram-negativas (*Salmonella typhimurium* e *Escherichia coli*) pelos métodos qualitativo (zona de inibição) e quantitativo (contagem de células viáveis). Em geral, a Cloisite Na⁺ e 20A não apresentaram zona de inibição. A Cloisite 30B, por sua vez, apresentou significativa zona de inibição quando testada com todas as bactérias. Pelo método quantitativo notou-se que a argila Cloisite 20A apresentou somente um efeito bacteriostático sobre as bactérias gram-positivas, enquanto a Cloisite 30B apresentou efeito bactericida. Quando o teste foi realizado com as bactérias gram-negativas as argilas Cloisite

Na⁺ e 20A não apresentaram atividade antimicrobiana enquanto a argila Cloisite 30B apresentou efeito bacteriostático.

Rhim *et al.* (2009) estudaram a atividade antimicrobiana do PLA puro e de seus nanocompósitos com as argilas Cloisite Na⁺, Cloisite 20A e Cloisite 30B, utilizando o método quantitativo, com as bactérias *S. aureus*, *L.monocytogenes*, *S. typhimurium* e *E. coli*. Apenas o nanocompósito de PLA com a Cloisite 30B apresentou atividade bacteriostática, observada somente com a bactéria gram-positiva *L.monocytogenes*. Assim como estudo previamente citado (HONG, RHIM, 2008), notou-se que a ação antimicrobiana de argilas organofílicas foi mais efetiva contra bactérias gram-positivas em relação às gram-negativas, o que pode ser atribuído à diferença da estrutura celular. Bactérias gram-negativas apresentam uma membrana externa (ausente nas bactérias gram-positivas), que restringe a entrada de agentes químicos, incluindo antibactericidas (WHITE, MCDERMOTT, 2001).

A atividade antimicrobiana das argilas organicamente modificadas pode ser atribuída aos agentes modificadores das mesmas (compostos quaternários de amônio) (RHIM *et al.*, 2006). Os compostos quaternários de amônio podem interagir com a membrana citoplasmática de bactérias levando à perda de sua organização estrutural e integridade e, conseqüentemente, ao extravasamento do conteúdo citoplasmático (DENYER, 1995; GILBERT;MOORE, 2005; MASSI *et al.*, 2003; MERIANOS, 1991).

Gilbert e Moore (2005) detalharam o mecanismo de ação antimicrobiana de compostos quaternários de amônio, ilustrado na Figura 32.

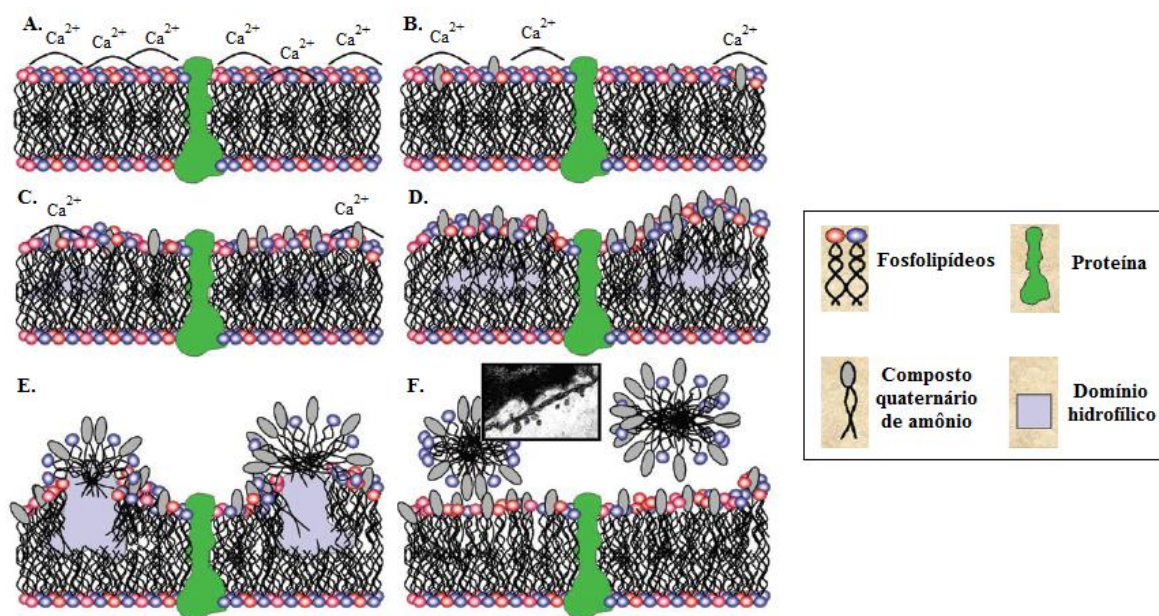


Figura 32. Representação esquemática do mecanismo de ação dos biocidas quaternários de amônio (adaptado de GILBERT, MOORE, 2005).

A superfície celular das bactérias apresenta uma carga negativa global, frequentemente estabilizada com cátions bivalentes, como Ca^{2+} . A ação dos compostos quaternários envolve a associação do nitrogênio positivamente carregado na superfície da membrana, afastando os cátions bivalentes (Figura 32B). A região hidrofóbica dos compostos quaternários de amônio penetra na região hidrofóbica da membrana citoplasmática (Figuras 32B e 32C). Essa interação leva à transição do estado da membrana de fluido para líquido-cristalino, provocando a perda de suas funções osmorreguladora e fisiológica (Figura 32D). Conforme aumenta a concentração destes compostos, é possível a formação de agregados micelares mistos, que solubilizam os componentes hidrofóbicos da membrana (Figuras 32E e 32F).

A efetividade da ação antimicrobiana de compostos quaternários de amônio pode variar com sua estrutura química, sendo que os mais hidrofóbicos provavelmente não apresentam impacto sobre as comunidades microbianas, em razão da baixa biodisponibilidade, ou seja, baixa ocorrência em fase aquosa (VAN GINKEL, 2004). Nigmatulin *et al.* (2008) reportou que modificadores orgânicos mais hidrofílicos como o da argila Cloisite 30B podem migrar mais facilmente para o meio aquoso quando comparados

àqueles mais hidrofóbicos, como o presente na Cloisite 20A. Assim, o modificador orgânico da Cloisite 30B tende a apresentar maior biodisponibilidade, e consequentemente, maior potencial para provocar o efeito antimicrobiano. Dessa forma, o retardo do processo de biodegradação do PLA após a incorporação da Cloisite 30B, observado neste estudo, pode estar relacionado a um efeito adverso de seu modificador orgânico sobre a atividade de bactérias atuantes no processo de compostagem.

4.4. Análise visual e monitoramento do peso molecular

O aspecto visual das amostras retiradas após 15 e 30 dias de contato com o composto está representado nas Figuras 33 e 34, respectivamente.

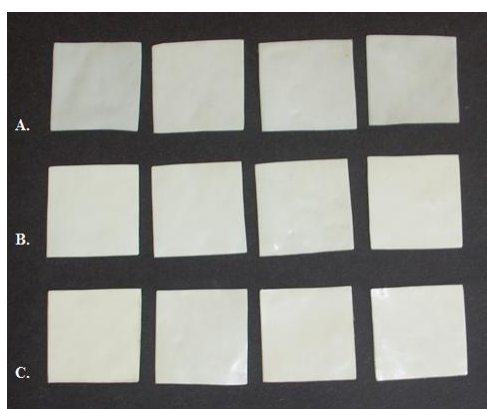


Figura 33. Aspecto visual das amostras após 15 dias de degradação em composto: **A.** PLA; **B.** PLA/CLO20A e **C.** PLA/CLO30B.



Figura 34. Aspecto visual das amostras após 30 dias de degradação em composto: **A.** PLA; **B.** PLA/CLO20A e **C.** PLA/CLO30B.

Após 15 dias de ensaio, todas as amostras, anteriormente translúcidas, apresentaram opacidade e uma coloração branca. Recentemente alguns outros estudos verificaram este mesmo comportamento durante a degradação do PLA em ambiente de compostagem (GONZÁLEZ *et al.*, 2012; ZENKIEWICZ *et al.*, 2012), o que pode ser um resultado do aumento da cristalinidade das amostras. A degradação hidrolítica ocorre em dois estágios principais: o primeiro ocorre em regiões amorfas. As cadeias remanescentes então ganham mais espaço e mobilidade, o que favorece a reorganização das mesmas, levando ao aumento da cristalinidade. O segundo estágio da hidrólise ocorre nas regiões cristalinas, levando à desintegração da amostra (CHU *et al.*, 1985; SODERGARD, STOLT, 2002). Após 30 dias de degradação em composto, as amostras apresentaram maior rugosidade, e manchas, indicando um estágio mais avançado de degradação.

Os gráficos das Figuras 35 a 37 mostram os resultados de peso molecular numérico médio ($\overline{M}_n$), peso molecular ponderal médio ($\overline{M}_w$) e índice de polidispersividade (PDI), respectivamente. As curvas de GPC encontram-se no Apêndice E.

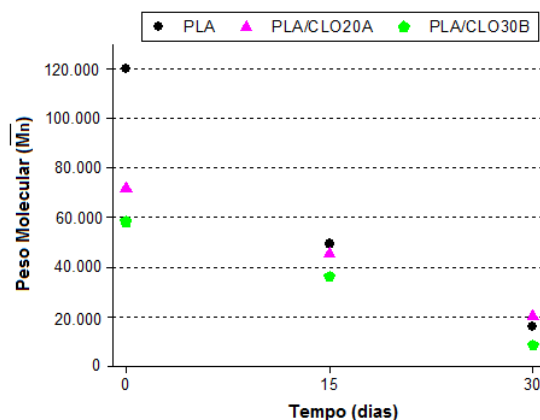


Figura 35. Peso molecular numérico médio do PLA e nanocompósitos.

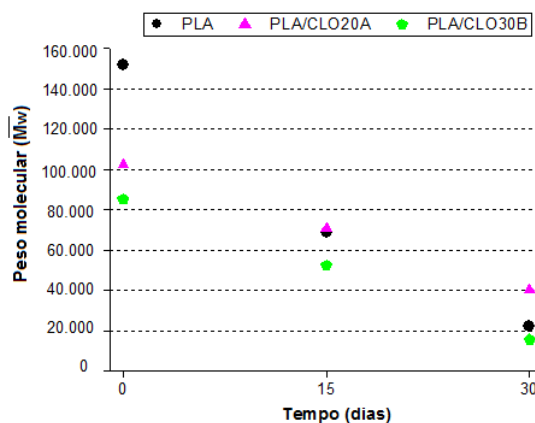


Figura 36. Peso molecular ponderal médio do PLA e nanocompósitos.

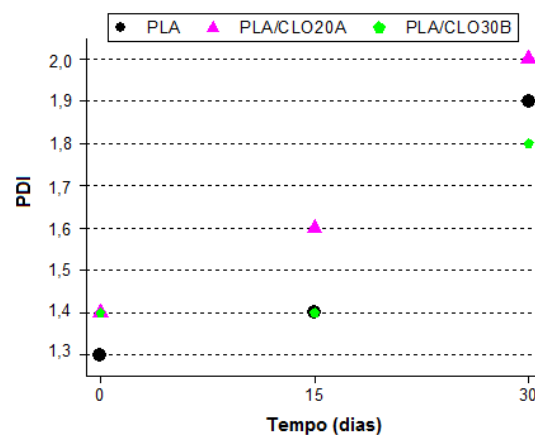


Figura 37. Índice de polidispersividade do PLA e nanocompósitos.

Os gráficos das Figuras 35 e 36 indicam a ocorrência do processo de degradação hidrolítica para todas as amostras, apresentando uma significativa redução dos valores de peso molecular numérico e ponderal médio. Também foi observado um aumento do índice de polidispersividade (Figura 37) ao longo dos 30 dias de observação, o que pode ser atribuído à formação de espécies de baixo peso molecular, que resultam em um maior decréscimo nos valores de $\overline{M}_n$ do que nos valores de $\overline{M}_w$ (LUCAS *et al.*, 2001), refletindo no aumento dos valores de PDI (definido pela razão $\overline{M}_w/\overline{M}_n$) ao longo do tempo.

A Tabela 13 apresenta os valores de $\overline{M}_n$, $\overline{M}_w$ e PDI, obtidos pela análise de GPC. Após o processamento das amostras, os nanocompósitos apresentaram valores de peso molecular inferiores ao polímero puro. Este decréscimo de peso molecular do PLA após o

preparo de nanocompósitos pode estar relacionado ao cisalhamento durante a mistura do polímero e as argilas (RAY *et al.*, 2003; FUKUSHIMA *et al.*, 2009).

Tabela 13. Valores de $\overline{M}_n$, $\overline{M}_w$ e PDI do PLA e seus nanocompósitos PLA/CLO20A e PLA/CLO30B

Tempo (dias)	PLA			PLA/CLO20A			PLA/CLO30B		
	$\overline{M}_n$ (Da)	$\overline{M}_w$ (Da)	PDI	$\overline{M}_n$ (Da)	$\overline{M}_w$ (Da)	PDI	$\overline{M}_n$ (Da)	$\overline{M}_w$ (Da)	PDI
0	119.757	151.661	1,3	71.760	102.445	1,4	58.318	85.080	1,4
15	49.326	68.833	1,4	45.350	70.680	1,6	36.189	52.350	1,4
30	15.983	22.197	1,9	20.222	40.415	2,0	8.704	15.500	1,8

Após 15 dias, o PLA apresentou uma redução de 59% no valor de $\overline{M}_n$, enquanto os nanocompósitos com argilas organofílicas Cloisite 20A e Cloisite 30B apresentaram uma redução de 37% e 38%, respectivamente. Após 30 dias de degradação, foi verificada uma redução de 87%, no valor de $\overline{M}_n$ para o PLA puro, 72% para o nanocompósito PLA/CLO20A e 85% para o nanocompósito PLA/CLO30B. Entre os nanocompósitos avaliados neste estudo, as amostras contendo Cloisite 30B apresentaram um maior grau de degradação do que aquelas preparadas com Cloisite 20A, o que pode estar relacionado à hidrofilicidade do modificador orgânico da Cloisite 30B, que de acordo com Paul *et al.* (2005), pode favorecer a penetração de moléculas de água no material e, conseqüentemente, a degradação hidrolítica.

O maior grau de degradação do nanocompósito PLA/CLO30B poderia favorecer o processo de mineralização em relação ao nanocompósito PLA/CLO20A, uma vez que espécies de baixo peso molecular, capazes de serem assimiladas por microorganismos, tendem a se formar mais rápido. No entanto, a presença da Cloisite 30B levou a um retardo na mineralização do PLA, conforme reportado previamente. Este comportamento indica que a capacidade de acelerar a degradação hidrolítica pode não ser um fator determinante para a melhoria da mineralização, e que o fator de maior significância para a degradação biológica no processo de compostagem pode ter sido a diferença entre a efetividade da atividade antimicrobiana dos modificadores orgânicos presentes nas argilas Cloisite 20A e Cloisite 30B, conforme descrito anteriormente.

Entre os materiais avaliados, o PLA apresentou uma taxa de degradação superior em relação às amostras PLA/CLO30A e PLA/CLO30B, o que pode estar relacionado ao efeito de barreira das camadas de argila para a difusão de moléculas de água e/ou ao maior grau de cristalinidade nas amostras dos nanocompósitos. No entanto, todos os materiais atingiram, ao longo dos 30 dias, valores de $\overline{Mn}$ inferiores a 40.000 Da, valor crítico a partir do qual os microorganismos podem continuar o processo de degradação, convertendo os componentes de baixo peso molecular em metabólitos (GRUBER, 2001).

4.5. Bioensaio com o organismo *Allium cepa*

A Tabela 14 representa a percentagem média de sementes germinadas para cada um dos tratamentos. Em geral os valores foram próximos e satisfatórios para a continuidade do ensaio. Houve uma maior inibição de germinação apresentada nos tratamentos expostos à trifluralina, efeito esperado para este herbicida (ALMEIDA, 1985). Ainda assim, a taxa de germinação obtida foi suficiente para o prosseguimento das análises.

Tabela 14. Percentagem de sementes de *Allium cepa* germinadas para os diferentes tratamentos

Tratamento	Germinação (%)
CN	73 ± 2
MMS	65 ± 4
TRF	39 ± 1
COMP	67 ± 4
COMP-PLA	62 ± 8
COMP-PLA/CLO20A	65 ± 8
COMP-PLA/ CLO30B	71 ± 4

As Figuras 38 e 39 ilustram as alterações encontradas ao longo das análises para a avaliação de genotoxicidade e mutagenicidade, respectivamente. Os valores de Índice Mitótico, a frequência de alterações, bem como o Índice de Alterações Cromossômicas e o Índice de Mutagenicidade, obtidos pela análise de células da região meristemática de *Allium cepa* encontram-se na Tabela 15.

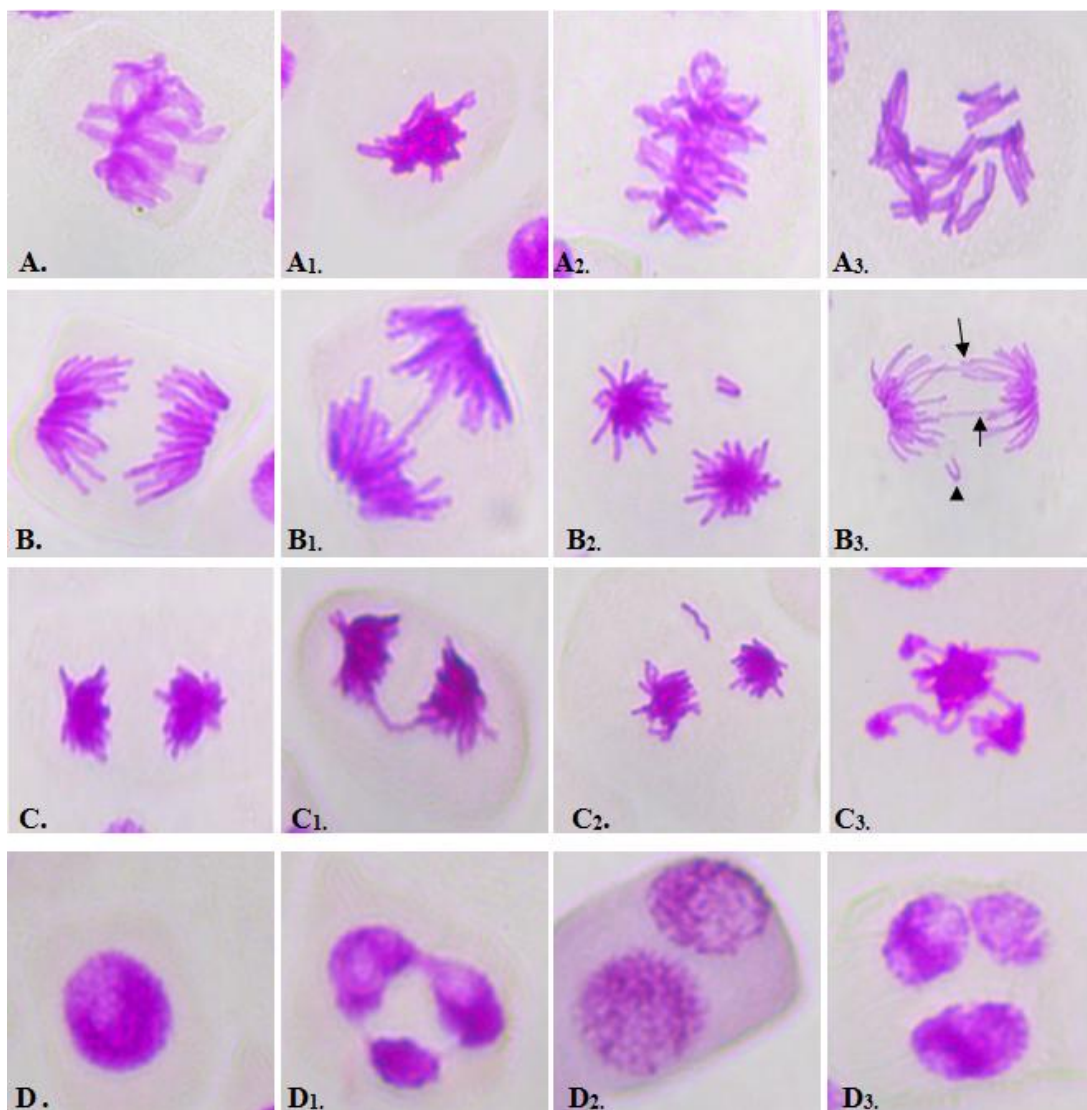


Figura 38. Aberrações cromossômicas e anormalidades nucleares verificadas em células meristemáticas de *Allium cepa*. **A.** Metáfase normal; **A₁.** Metáfase com aderência cromossômica; **A₂.** Metáfase poliplóide; **A₃.** C-metáfase; **B.** Anáfase normal; **B₁.** Anáfase com ponte cromossômica; **B₂.** Anáfase com perda cromossômica; **B₃.** Anáfase com ponte (seta) e perda cromossômica (cabeça de seta); **C.** Telófase normal; **C₁.** Telófase com ponte cromossômica; **C₂.** Telófase com perda cromossômica; **C₃.** Telófase multipolar com ponte cromossômica e aderência; **D.** Núcleo normal; **D₁.** Núcleo lobulado; **D₂.** Célula binucleada; **D₃.** Célula trinucleada.

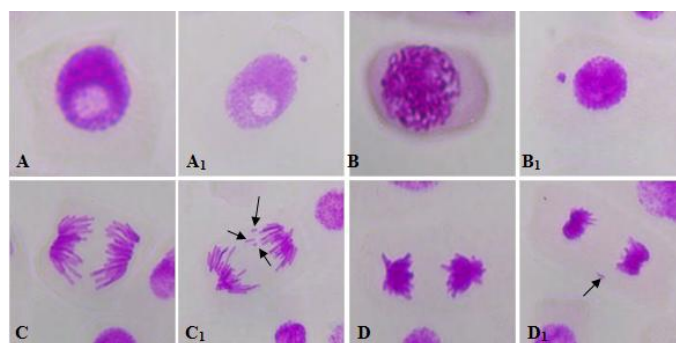


Figura 39. Endpoints de mutagenicidade verificados em células meristemáticas de *Allium cepa*. **A.** Intérfase normal; **A₁.** Intérfase com micronúcleo; **B.** Prófase normal; **B₁.** Prófase com micronúcleo; **C.** Anáfase normal; **C₁.** Anáfase com quebra cromossômica; **D.** Telófase normal; **D₁.** Telófase com quebra cromossômica.

Tabela 15. Índice Mitótico, frequência de aberrações cromossômicas e anormalidades nucleares, Índice de Alterações Cromossômicas e Índice de mutagenicidade avaliados em células meristemáticas de *Allium cepa*.

Alterações		Repetições	CN	MMS	TRF
IM		1	23,43±6,72	16,32±2,53*	15,81±2,69*
		2	26,08±2,69	18,27±3,14*	14,77±2,13*
Aberrações cromossômicas	Aderência	1	0,19±0,21	0,25±0,24	0,62±0,48
		2	0,17±0,16	0,44±0,46	0,79±0,39
	Poliploidia	1	0,00±0,00	0,00±0,00	0,43±0,63
		2	0,00±0,00	0,00±0,00	0,92±0,47
	C-metáfase	1	0,07±0,18	0,02±0,06	0,39±0,40
		2	0,00±0,00	0,00±0,00	0,47±0,40
	Multipolaridade e ponte	1	0,00±0,00	0,00±0,00	0,16±0,24
		2	0,00±0,00	0,00±0,00	0,12±0,25
	Perda cromossômica	1	0,02±0,05	0,04±0,08	0,10±0,19
		2	0,00±0,00	0,00±0,00	0,08±0,17
	Ponte cromossômica	1	0,02±0,06	0,00±0,00	0,37±0,35
		2	0,00±0,00	0,02±0,06	0,31±0,23
	Perda e ponte cromossômica	1	0,00±0,00	0,02±0,06	0,06±0,13
		2	0,00±0,00	0,00±0,00	0,08±0,14
Alterações nucleares	Célula binucleada	1	0,00±0,00	0,00±0,00	0,49±0,53
		2	0,00±0,00	0,00±0,00	0,96±0,64
	Célula trinucleada	1	0,00±0,00	0,00±0,00	0,51±0,36
		2	0,00±0,00	0,00±0,00	0,57±0,51
	Núcleo lobulado	1	0,00±0,00	0,00±0,00	2,84±1,30
		2	0,00±0,00	0,00±0,00	4,18±1,64
IAC		1	0,30±0,47	0,33±0,27	5,97±1,90*
		2	0,17±0,16	0,46±0,47	8,48±2,88*
Micronúcleo		1	0,00±0,00	12,27±5,54	0,78±0,78
		2	0,00±0,00	12,47±4,68	1,85±0,97
Quebra cromossômica		1	0,00±0,00	0,26±0,34	0,06±0,09
		2	0,00±0,00	0,50±0,42	0,00±0,00
IMut		1	0,00±0,00	12,53*±5,36	0,84*±0,79
		2	0,00±0,00	12,97*±4,35	1,85*±0,97

*Valores estatisticamente significativos ($p < 0,05$) em relação ao controle negativo pelo teste estatístico de Mann-Whitney.

Tabela 15 (continuação). Índice Mitótico, frequência de aberrações cromossômicas e anormalidades nucleares, Índice de Alterações Cromossômicas e Índice de mutagenicidade avaliados em células meristemáticas de *Allium cepa*.

Alterações		Repetições	COMP	COMP- PLA	COMP- PLA/ CLO20A	COMP- PLA/ CLO30B
IM		1	28,35±2,66	18,04±2,31*	19,14±2,47*	19,46±2,56*
		2	25,50±2,26	17,51±3,88*	21,57±2,59*	22,88±3,70*
Aberrações cromossômicas	Aderência	1	0,29±0,23	0,32±0,13	0,33±0,15	0,46±0,37
		2	0,21±0,17	0,35±0,15	0,36±0,26	0,37±0,26
	Poliploidia	1	0,00±0,00	0,12±0,13	0,23±0,25	0,14±0,16
		2	0,00±0,00	0,18±0,22	0,30±0,25	0,16±0,15
	C-metáfase	1	0,00±0,00	0,08±0,17	0,04±0,12	0,04±0,08
		2	0,00±0,00	0,02±0,06	0,02±0,06	0,08±0,19
	Multipolaridade e ponte	1	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00
		2	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00
	Perda cromossômica	1	0,02±0,06	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00
		2	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00
	Ponte cromossômica	1	0,02±0,06	0,00±0,00	0,00±0,00	0,04±0,12
		2	0,00±0,00	0,02±0,06	0,00±0,00	0,06±0,13
Perda e ponte cromossômica	1	0,00±0,00	0,02±0,06	0,00±0,00	0,00±0,00	
	2	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	
Alterações nucleares	Célula binucleada	1	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00
		2	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00
	Célula trinucleada	1	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00
		2	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00
	Núcleo lobulado	1	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00
		2	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00
IAC		1	0,33±0,26	0,54±0,28*	0,60±0,33*	0,68±0,34*
		2	0,21±0,17	0,57±0,34*	0,68±0,38*	0,67±0,53*
Micronúcleo		1	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,04±0,08
		2	0,00±0,00	0,00±0,00	0,10±0,25	0,00±0,00
Quebra cromossômica		1	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00
		2	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00
IMut		1	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,04±0,08
		2	0,00±0,00	0,00±0,00	0,10±0,25	0,00±0,00

*Valores estatisticamente significativos ($p<0,05$) em relação ao controle negativo pelo teste estatístico de Mann-Whitney.

Os resultados obtidos pela análise do Índice Mitótico (IM) para os tratamentos com o MMS e TRF indicaram um decréscimo estatisticamente significativo ($p<0,05$) da divisão celular. A inibição do processo mitótico pelos compostos TRF e MMS também foi observada por Fernandes *et al.*(2007) e Mazzeo *et al.*(2010), respectivamente. Os tratamentos realizados com o solubilizado do composto puro (COMP) não apresentaram diferenças significativas de IM em relação ao controle negativo. No entanto, a análise

estatística indicou a inibição de divisão celular para os tratamentos COMP-PLA, COMP-PLA/CLO20A e COMP-PLA/CLO30B.

Com relação ao Índice de Alterações Cromossômicas (IAC) a análise estatística revelou diferença significativa para os tratamentos com TRF. Conforme Fernandes *et al.* (2009) a concentração de 0,84 ppm do herbicida pode ser considerada como “concentração de diagnóstico” para a genotoxicidade, uma vez que provoca altas taxas de irregularidades incluindo alterações cromossômicas e nucleares, indicando um efeito aneugênico. Portanto, o resultado obtido indica uma resposta adequada do sistema para a avaliação dos efeitos genotóxicos. Os tratamentos realizados com os solubilizados de composto após a degradação do PLA, e dos nanocompósitos também apresentaram valores estatisticamente significativos para o IAC, indicando a indução de efeitos genotóxicos dos produtos de degradação destes materiais, uma vez que os tratamentos com o solubilizado do composto puro não apresentaram valores significativos para este parâmetro.

Os tratamentos com o MMS apresentaram as maiores frequências de quebras e micronúcleos, evidenciando a ação clastogênica, e resultando em valores significativos para o Índice de Mutagenicidade (IMut). Este comportamento indica uma resposta adequada do sistema, uma vez que este composto é utilizado como controle positivo para efeitos mutagênicos (RANK, NIELSEN, 1998). O herbicida TRF também apresentou valores de IMut estatisticamente significativos. No caso da TRF, o efeito mutagênico está associado à sua ação aneugênica, pois a inativação do fuso mitótico impede a perfeita migração dos cromossomos para os polos da célula que, uma vez dispersos no citoplasma, levam às perdas, a partir das quais podem se formar micronúcleos (FERNANDES *et al.*, 2007). Com relação aos outros tratamentos, não foram observados efeitos mutagênicos.

A análise estatística dos parâmetros IM, IAC e IMut também foi realizada para a comparação dos tratamentos com nanocompósitos em relação aos tratamentos com PLA puro, para avaliação dos efeitos das argilas organofílicas. Os parâmetros comparados encontram-se compilados na Tabela 16.

Tabela 16. Valores de IM, IAC e IMut avaliados em células meristemáticas de *Allium cepa*

Parâmetro	Repetição	COMP-PLA	COMP-PLA/CLO20A	COMP-PLA/CLO30B
IM	1	18,04±2,31	19,14±2,47	19,46±2,56
	2	17,51±3,88	21,57±2,59	22,88±3,70
IAC	1	0,54±0,28	0,61±0,33	0,68±0,34
	2	0,57±0,34	0,68±0,38	0,67±0,53
IMut	1	0,00±0,00	0,00±0,00	0,04±0,08
	2	0,00±0,00	0,10±0,25	0,00±0,00

Nenhum dos parâmetros avaliados mediante o bioensaio para os tratamentos COMP-PLA/CLO20A e COMP-PLA/CLO30B foram estatisticamente significativos quando comparados aos tratamentos COMP-PLA. Dessa forma, os efeitos citotóxicos e genotóxicos observados para os tratamentos com nanocompósitos possivelmente estão associados com a toxicidade dos produtos de degradação do PLA, não sendo possível atribuí-los a uma contribuição das argilas organofílicas.

Mitelut e Popa (2011) avaliaram a toxicidade de composto após a degradação de materiais à base de blendas de PLA/PBAT (50-50), com variações na composição e espessura. Para a avaliação, foi realizada a germinação de sementes da espécie *Raphanus sativus*. A germinação foi realizada com o extrato aquoso das amostras de composto após a degradação dos materiais, incluindo a amostra de composto puro (controle) e, posteriormente, foi quantificado o índice de germinação conforme metodologia proposta por Gariglio *et al.* (2002). Os autores reportaram que todas as amostras foram mais tóxicas do que o controle. Rudeekit *et al.* (2012) avaliou a ecotoxicidade de amostras de composto resultante da desintegração do PLA e blendas do polímero com amido, comparando com o composto puro (controle), utilizando um ensaio baseado na norma OECD 208 (2006). As amostras de composto foram misturadas com solo (em proporções iguais) e foi realizada a germinação. Os seguintes parâmetros foram quantificados: taxa de germinação e o crescimento das plantas *Oryza sativa* (monocotiledônea) e *Vigna radiate* (dicotiledônia). Os autores concluíram que os materiais avaliados são seguros para o ecossistema e satisfazem os requisitos para a compostagem.

Não foram encontrados na literatura estudos a respeito da toxicidade de amostras de composto após desintegração do PLA mediante parâmetros genéticos. Pela análise do bioensaio com o organismo *Allium cepa* conduzida neste estudo, foram observadas baixas frequências de quebras e micronúcleos, mas valores significativos de alterações durante a divisão celular, o que indica um possível efeito aneugênico dos produtos de degradação do polímero (espécies resultantes da hidrólise do polímero e/ou resíduos de catalisador) presentes nas amostras de solubilizado. Ressalta-se que o bioensaio permitiu uma informação preliminar a respeito da ecotoxicidade do PLA, um tema pouco explorado, o que demanda a continuidade dos estudos.

5. CONCLUSÕES

Pelos resultados obtidos mediante a caracterização e avaliação de aspectos relacionados à compostagem do polímero PLA e seus nanocompósitos com as argilas organofílicas Cloisite 20A (PLA/CLO20A) e Cloisite 30B (PLA/CLO30B), pode-se concluir que:

- o método de intercalação do fundido permitiu a obtenção de nanocompósitos com estrutura intercalada/esfoliada;
- os nanocompósitos apresentaram menor estabilidade térmica em relação ao polímero puro, possivelmente pela instabilidade dos modificadores orgânicos;
- as camadas argilas organofílicas promoveram um pequeno aumento no grau de cristalinidade do PLA, indicando que suas camadas atuam como agentes nucleantes;
- a argila Cloisite 20A não afetou o processo de biodegradação do PLA. No caso da argila Cloisite 30B, foi verificada influência sobre o processo de biodegradação do polímero, levando à redução das taxas de mineralização, o que pode estar relacionado a um efeito adverso de seu modificador orgânico sobre microorganismos atuantes no processo de compostagem.
- a presença das argilas na matriz do PLA levou a uma diminuição na taxa de degradação hidrolítica do polímero, possivelmente pelo favorecimento da propriedade de barreira e/ou maior grau de cristalinidade dos nanocompósitos. A cisão de cadeia, no entanto,

foi significativa mesmo nas amostras de nanocompósitos, indicando que argilas não comprometem a redução do peso molecular, processo fundamental para a degradação do PLA durante a compostagem;

- o bioensaio realizado com o organismo teste *Allium cepa* constituiu uma ferramenta sensível para a avaliação de ecotoxicidade dos materiais testados após sua desintegração em composto;
- as análises realizadas em células meristemáticas de *Allium cepa* permitiram observar a inibição da divisão celular e um efeito genotóxico das amostras de composto após a degradação de todos os materiais testados (PLA e nanocompósitos), indicando a presença de resíduos tóxicos provenientes da degradação do polímero.

6. SUGESTÕES PARA OS TRABALHOS FUTUROS

Diante dos resultados obtidos no presente trabalho sugerimos como possibilidades para trabalhos futuros:

- avaliação das propriedades antimicrobianas das argilas organofílicas Cloisite 20A e Cloisite 30B, bem como dos nanocompósitos;
- quantificação da mineralização até a obtenção do grau máximo de mineralização do PLA, seguida de análises mediante o bioensaio com o organismo *Allium cepa*;
- investigação dos produtos de degradação do PLA presentes nas amostras de solubilizado e realização do teste com *Allium cepa* com os compostos puros;
- realização das análises do bioensaio com *Allium cepa*, não só pela avaliação das células da região meristemática, mas também incluir a avaliação de micronúcleos na região F1, bem como a avaliação após tratamento de recuperação das raízes;
- análise de mutagenicidade mediante o teste de Ames;
- avaliação de toxicidade com culturas de células humanas.

7. REFERÊNCIAS

- ABIQUIM- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA QUÍMICA. **Consumo aparente no Brasil**. Disponível em: <http://www.abiquim.org.br/resinastermoplasticas/estatisticas_32.asp>. Acesso em: 7 de maio de 2012.
- ABNT - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 10.006: Procedimento para obtenção de extrato solubilizado de resíduos sólidos**, ABNT, Rio de Janeiro, 2004.
- ADAMS, S. M. **Biological Indicators of Aquatic Ecosystem Stress**. Bethesda: American Fisheries Society, 2002.
- ALBERTINI, R.J.; ANDERSON, D.; DOUGLAS, D.; HAGMAR, L.; HEMMINKI, K.; MERLO, F.; NATARAJAN, A.T.; NORPPA, H.; SHUKER, D.E.G.; TICE, R.; WATERS, M.D.; AITIO, A. IPCS guidelines for the monitoring of genotoxic effects of carcinogens in humans. **Mutation Research**. v. 463, p. 111-172, 2000.
- ALBERTSSON, A.; VARMA, I.K. Recent developments in ring opening polymerization of lactones for biomedical applications. **Biomacromolecules**. v. 4, p. 1466-1486, 2003.
- ALEXANDRE, M.; DUBOIS, P. Polymer-layered silicate nanocomposites: preparation, properties and uses of a new class of materials. **Materials Science and Engineering**. v. 28, p.1-63, 2000.
- ALMEIDA, F.S. **Guia de herbicidas; recomendações para o uso adequado e plantio direto e convencional**. Londrina: IAPAR, 1985.
- ALMENAR, E.; AURAS, R. Permeation, sorption, and diffusion in poly(lactic acid). In: AURAS, R.; LIM, L.; SELKE, S.E.M.; TSUJI, H (Eds). **Poly(lactic acid): synthesis, structures, properties, processing, and application**. Hoboken: John Wiley & Sons, 2010, p.155-179.
- AHMED, J.; VARSHNEY, S.K. Polylactides-chemistry, properties and green packaging technology: a review. **International Journal of Food Properties**. v. 14, p. 37-58, 2011.
- AURAS, R.; HARTE, B.; SELKE, S. An overview of polylactides as packaging materials. **Macromolecular Bioscience**. v. 4, p. 835-864, 2004.
- AVEROUS, L.; BOQUILLON, N. Biocomposites based on plasticized starch: thermal and mechanical behaviours. **Carbohydrate Polymers**. v. 56, p.11-122, 2004.

ASTM-AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIAL D6400-04- “Standard Specification for Compostable Plastics”. 2004.

ASTM-AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIAL D5338-11- “Determining Aerobic Biodegradation of Plastic Materials Under Controlled Composting Conditions, Incorporating Thermophilic Temperatures”. 2011.

ASTM- AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIAL D6400-12-“Standard Specification for Labeling of Plastics Designed to be Aerobically Composted in Municipal or Industrial Facilities”. 2012.

BIANCHI, J.; ESPINDOLA, E.L.G.; MARIN-MORALES, M.A. Genotoxicity and mutagenicity of water samples from the Monjolinho River (Brazil) after receiving untreated effluents. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. v. 74, p. 826-833, 2011.

BORDES, P.; POLLET, E.; AVÉROUS, L. Nano-biocomposites: biodegradable polyester/nanoclay systems. **Progress in Polymer Science**. v. 34, p. 125-155, 2009.

CABRERA, G.L.; RODRIGUES, D.M.G. Genotoxicity of the extracts from the compost of the organic and the total municipal garbage using three plant bioassays. **Mutation Research**. v.426, p. 201-206, 1999.

CARITÁ, R.; MARIN-MORALES, M. Induction of chromosome aberrations in the *Allium cepa* test system caused by the exposure of seeds to industrial effluents contaminated with azo dyes. **Chemosphere**. v. 72, p. 722-725, 2008.

CEMPRE-COMPROMISSO EMPRESARIAL PARA RECICLAGEM. **Lixo municipal: manual de gerenciamento integrado**. São Paulo, SP, IPT, 1995.

CONMED. Duet Suture Anchor. Disponível em: <http://www.conmed.com/products_shoulder_duet.php>. Acesso em: 2 de janeiro de 2013.

CHANG, J.; AN, Y.U.; SUR, G.S. Poly(lactic acid) nanocomposites with various organoclays. I. Thermomechanical properties, morphology, and gas permeability. **Journal of Polymer Science: Part B: Polymer Physics**. v. 41, p. 94-103, 2003.

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

CHOWDHURY, S. R. Some important aspects in designing high molecular weight poly (l-lactic acid)-clay nanocomposites with desired properties. **Polymer International**. v. 57, p. 1326-1332, 2008.

CHU, C.C. Degradation phenomena of two linear aliphatic polyester fibers used in medicine and surgery. **Polymer**. v. 25, p. 591-594, 1985.

CIWMB- CALIFORNIA INTEGRATED WASTE MANAGEMENT BOARD. Avaliação do desempenho de Embalagens Plásticas Ambientalmente Degradáveis e de Utensílios Plásticos Descartáveis para Alimentos- Relatório Final. Califórnia, 2007.

DAVIDSON, P.M.; PARISH, M.E. Methods for testing the efficacy of food antimicrobials. **Food Technology**. v. 43, p. 148-155, 1989.

DENYER, S.P. Mechanisms of action of antibacterial biocides. **International biodeterioration & biodegradation**. v. 36, p. 227-245, 1995.

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

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

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

FISCHER, E.W., STERZEL, H. J.; WEGNER, G. Investigation of the structure of solution grown crystals of lactide copolymers by means of chemical reactions. **Colloid & Polymer Science**. v. 251, n. 11, p. 980-990, 1973.

FISKEJÖ, G. The *Allium* test as a standard in the environmental monitoring. **Hereditas**. v.102, p. 99-112, 1985.

FORNES, T.D.; YOON, P.J.; KESKKUKA, H.; PAUL, D.R. Nylon 6 nanocomposites: the effect of matrix molecular weight. **Polymer**. v. 42, p. 9929-9940, 2001.

FUKUSHIMA, K.; ABBATE, C.; TABUANI, D.; GENNARI, M.; CAMINO, G. Biodegradation of poly(lactic acid) and its nanocomposites. **Polymer Degradation and Stability**. v. 94, p. 1646-1655, 2009.

FUKUSHIMA, K.; GIMÉNEZ, E.; CABEDO, L. LAGARÓN, J.M.; FEIJOO, J.L. Biotic degradation of poly (DL-lactide) based nanocompósitos. **Polymer Degradation and Stability**. v. 97, p. 1278-1284, 2012.

GARIGLIO, N.F.; BUYATTI, M.A.; PILATTI, R.A.; ROSSIA, D.E.G.; ACOSTA, M.R. Use of a germination bioassay to test compost maturity of willow (*Salix* sp.) sawdust. **New Zeland Journal of Crop and Horticultural Science**, v. 30, p. 135-139, 2002.

GARLOTTA, D. A literature review of poly (lactic acid). **Journal of Polymers and the Environment**. v.9, n.2, p. 63-84, 2002.

GILBERT, P.; MOORE, L.E. Cationic antiseptics: diversity of action under a common epithet. **Journal of Applied Microbiology**. v. 99, p. 703-715, 2005.

GILMAN, J.W. Flammability and thermal stability studies of polymer layered-silicate (clay) nanocomposites. **Applied Clay Science**. v.15, p.31-49, 1999.

GONZÁLEZ, A.; DASARI, A.; HERRERO, B.; PLANCHER, E.; SANTARÉN, J.; ESTEBAN, A.; LIM, S. Fire retardancy behavior of PLA based nanocomposites. **Polymer Degradation and Stability**. v. 97, p. 248-256, 2012.

GRANT, W. F. Chromosome aberration assays in *Allium*. **Mutation Research**. v. 99, p. 273-291, 1982.

GRIJPM, D.W.; PENNING, A.J. Co-polymers of L-lactide, mechanical properties. **Macromolecular Chemistry and Physics**. v. 195, p. 1649-1663, 1994.

GROOT, W.; KRIEKEN, J. Production and purification of lactic acid and lactide. In: AURAS, R.; LIM, L.; SELKE, S.E.M.; TSUJI, H (Eds). **Poly(lactic acid): synthesis, structures, properties, processing, and application**. Hoboken: John Wiley & Sons, 2010, p. 3-18.

GRUBER, P.R. Commodity Polymers from Renewable Resources: Polylactic Acid. In: **Carbon Management: Implications for R & S in the Chemical Sciences and Technology, a Workshop Report to the Chemical Sciences Roundtable**. Washington: National Academic Press, 2001, p. 166-184.

HENTON, D.E.; GRUBER, P.; LUNT, J.; RANDALL, J. Polylactic acid technology. In: MOHANTY, A.K.; MISRA, M.; DRZAL, L.T. (Eds.). **Natural Fibers, Biopolymers, and Biocomposite**. Boca Raton: Taylor & Francis, 2005, p. 527-577.

HONG, S-I.; RHIM, J-W. Antimicrobial activity of organically modified nanoclays **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**. v. 8, p.5818-5824, 2008.

HOSHINA, M.M.; MARIN-MORALES, M.A. Micronucleus and chromosome aberrations induced in onion (*Allium cepa*) by a petroleum refinery effluent and by river water that

receives this effluent. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. v. 72, p. 2090-2095, 2009.

HSIEH, A.J.; MOY, P.; BEYER, F.L.; MADISON, P.; NAPADENSKY, E.; REN, J.; KRISHNAMOORTI, R. Mechanical response and rheological properties of polycarbonate layered-silicate nanocomposites. **Polymer Engineering and Science**, v.44, n.5., p. 825-837, 2004.

HUSSAIN, F.; HOJJATI, M.; OKAMOTO, M.; GORGA, R.E. Review article: polymer-matrix nanocomposites, processing, manufacturing, and application: and overview. **Journal of Composite Materials**. v. 40, p.1511-1575, 2006.

IKURA, Y.; KUDO, T. Isolation of a microorganism of degrading poly-(L-lactide). **Journal of General and Applied Microbiology**. v. 45, p. 247-251, 1999.

INÁCIO, C.T.; MILLER, P.R.M. **Compostagem: ciência e prática para a gestão de resíduos orgânicos**. Rio de Janeiro, RJ, Embrapa Solos, 2009.

ISO-INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION-14855-2. "Determination of the ultimate aerobic biodegradability of plastic materials under controlled composting conditions -- Method by analysis of evolved carbon dioxide - Part 2: Gravimetric measurement of carbon dioxide evolved in a laboratory-scale test". 2007.

JAMSHIDIAN. M.; TEHRANY, E.A.; IMRAN, M.; JACQUOT, M.; DESOBRY, S. Poly-lactic acid: production, applications, nanocomposites, and release studies. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**. v.9, p. 553-571, 2010.

JARERAT, A.; TOKIWA, Y. Degradation of poly(L-lactide) by a fungus. **Macromolecular Bioscience**. v. 1, p. 136-140, 2001.

JARERAT, A.; TOKIWA, Y. Poly(L-lactide) degradation by *Saccharothrix waywayandensis*. **Biotechnology Letters**. v. 25, p.401-404, 2003a.

JARERAT, A.; TOKIWA, Y. Poly(L-lactide) degradation by *Kibdelosporangium aridum*. **Biotechnology Letters**. v. 25, p. 2035-2038, 2003b.

JOHN, R. P.; NAMPOOTHIRI, K.M.; PANDEY, A. Fermentative production of lactic acid from biomass: an overview on process developments and future perspectives. **Applied Microbiology and Biotechnology**. v. 74, p. 524-534, 2007.

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

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

KATIYAR, V.; GERDS, N.; KOCH, C.B.; RISBO, J.; HANSEN, H.C.B.; PLACKETT, D. Melt processing of poly(l-lactic acid) in the presence of organomodified anionic or cationic clays. **Journal of Applied Polymer Science**. v.122, p.112-125, 2011.

KATIYAR, V.; NANAVATI, H. In situ synthesis of high molecular weight poly (l-lactic acid) clay nanocomposites. **Polymer Engineering and Science**. v.51, p. 2066-2077, 2011.

KE, Y. C.; STROEVE, P. **Polymer-layered silicate and silica nanocomposites**. 1.ed. Amsterdam: Elsevier, 2005. 394p.

KIEHL, J.E. **Fertilizantes orgânicos. Piracicaba: Agronômica Ceres**, 1985.

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

KIJCHAVENGKUL, T.; AURAS, R. Perspective compostability of polymers. **Polymer International**. v. 57, p.793-804, 2008.

KOH, H.C.; PARK, J.S.; JEONG, M.A.; HWANG, H.Y.; HONG, Y.T.; HA, S.Y.; NAM, S.Y. Preparation and gas permeation properties of biodegradable polymer/layered silicate nanocomposite membranes. **Desalination**. v. 233, p. 201-209, 2008.

KOLSTAD, J.J. Crystallization kinetics of poly(l-lactide-co-meso-lactide). **Journal of Applied Polymer Science**. v. 62, p. 1079-1091, 1996.

KOWALSKI, A.; DUDA, A.; PENCZEK, S. Kinetics and mechanism of cyclic esters polymerization initiated with tin(II) octoate. 3. Polymerization of L,L-dilactide. **Macromolecules**. v. 33, p. 7359-7370, 2000.

KRAMSCHUSTER, A.; GONG, S. TURNG, L.; LI, T.; LI, T. Injection-molded solid microcellular polylactide and polylactide nanocomposites. **Journal of biobased materials and bioenergy**. v.1, p. 37-45, 2007.

KRICHELDORF, H. R.; SUMBÉL, M. Polylactones-18. Polymerization of L,L-lactide with Sn(II) and Sn(IV) halogenides. **European Polymer Journal**. v. 25, n. 6, p. 585-591, 1989.

KRISHNAMACHARI, P.; ZHANG, J.; LOU, J.; YAN, J.; UITENHAM, L. Biodegradable poly(lactic acid)/clay nanocomposites by melt intercalation: a study of morphological, thermal, and mechanical properties. **International Journal of Polymer Analysis and Characterization**. v.14, p. 336-350, 2009.

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

LI, T.; TURNG, L.; GONG, S.; ERLACHER, K. Polylactide, nanoclay, and core-shell rubber composites. **Polymer Engineering and Science**. v. 46, n.10, p. 1419-1427, 2006.

LIM, L.; AURAS, R.; RUBINO, M. Processing Technologies for poly(lactic acid). **Pogress in Polymer Science**. v.33, p. 820-852, 2008.

LITCHFIELD, D. W.; BAIRD, D.G.; RIM, P.B.; CHEN, C. Improved mechanical properties of poly(ethylene terephthalate) nanocomposites fibers. **Polymer Engineering and Science**. v. 50, p. 2205-2215, 2010.

LIU, R.; CAO, J.; OU-YANG, L. Degradation of wood flour/poly(lactic acid) composites reinforced by coupling agents and organo-montmorillonite in a compost test. **Wood and Fiber Science**, v. 45, p. 105-118, 2013.

LUCAS, E.F.; SOARES, B.G.; MONTEIRO, E. **Caracterização de Polímeros: Determinação de Peso Molecular e Análise Térmica**. Rio de Janeiro, RJ, e-papers, 2001.

LUCKHAM, P. F.; ROSSI, S. The colloidal and rheological properties of bentonite suspensions. **Advances in Colloid and Interface Science**. v. 82, p. 43-92, 1999.

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

MAITI, P.; YAMADA, K.; OKAMOTO, M.; UEDA, K.; OKAMOTO, K. New polylactide/layered silicate nanocomposites: role of organoclays. **Chemistry of Materials**. v. 14, p. 4654-4661, 2002.

MANDALIA, T.; BERGAYA, F. Organo Clay mineral-melted polyolefin nanocomposites: effect of surfactant/CEC ratio. **Journal of Physics and Chemistry of Solids**. v. 67, p. 836-845, 2006.

MAPA - MINISTÉRIO da AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. INSTRUÇÃO NORMATIVA Nº28: Manual de Métodos Analíticos Oficiais para Fertilizantes Minerais, Orgânicos, Organominerais e Corretivos, 2007.

MARIN-MORALES, M.A.; MANZANO, B.C.; VENTURA, B. C.; CHRISTOFOLETTI, C.A.; MAZZEO, D.E.C.; LEME, D.M.; PEDRO, J.; BIANCHI-AMBROSIO, J.; HOSHINA, M. M. ; ROBERTO, M. M.; CARITÁ, R.; SOUZA, T.S.; FERNANDES, T.C.C. Utilização de *Allium cepa* como organismo teste na detecção da genotoxicidade ambiental. 2008. Apostila de curso de extensão.

MASAKI, K.; KAMINI, N.R.; IKEDA, H.; IEFUJI, H. Cutinase-like enzyme from the yeast *Cryptococcus* sp. strain S-2 hydrolyzes polylactic acid and other biodegradable plastics. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 71, p. 7548-7550, 2005.

MASSI, L.; GUITARD, F.; GÉRIBALDI, S.; LEVY, R.; DUCCINI, Y. Antimicrobial properties of highly fluorinated bis-ammonium salts. **International Journal of Antimicrobial Agents**. v. 21, p. 20-26, 2003.

MATWEB. NatureWorks Ingeo 4042D. Disponível em: <<http://www.matweb.com/search/datasheettext.aspx?matguid=b0fb785721a145b28dbfced3a2dbf30b>>. Disponível em: 6 de março de 2013.

MAZZEO, D.E.C. **Avaliação dos efeitos citotóxicos, genotóxicos e mutagênicos do BTEX, antes e após o processo de biorremediação por microorganismos, utilizando os sistemas teste de *Allium cepa* e cultura de células de mamífero**. 2009. 143f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Instituto de Biociências do Campus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2009.

MAZZEO, D.E.C.; LEVY, C.E. ANGELIS, D.F.; MARIN-MORALES, M.A. BTEX biodegradation by bacteria from effluents of petroleum refinery. **Science of the Total Environment**. v. 408, p. 4334-4340, 2010.

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

MEI, L.H.I.; MARIANI, P.D.S.C. **Visão geral sobre polímeros ou plásticos ambientalmente degradáveis (PADs)**. Campinas: Editora e Gráfica Flamboyant, 2005.

MENKE, M.; CHENG, I.P.; ANGELIS, K.J.; SCHUBERT, I. DNA damage and repair in *Arabidopsis thaliana* as measured by the comet assay after treatment with different classes of genotoxins **Mutation Research**. v. 493, p. 87-93, 2001.

MERIANOS, J.J. Quaternary ammonium antimicrobial compounds. In: BLOCK, S.S. (Ed.). **Disinfection, sterilization, and preservation**. Philadelphia: Lea & Febiger, 1991.

MIGLIARESI, C.; LOLLIS, A.; FAMBRI, L.; COHN, D. The effect of thermal history on the crystallinity of different molecular weight PLLA biodegradable polymers. **Clinical Materials**. v. 8, p. 111-118, 1991.

MITELUT, A.C.; POPA, M.E. Seed germination bioassay for toxicity evaluations of different composting biodegradable materials. **Romanian Biotechnological Letters**. v. 16, p. 121-129, 2011.

MORALES, A.R.; CRUZ, C.V.M.; PERES, L. Nanocompósitos de PEAD/PEBDL-avaliação da esfoliação da argila organofílica pela aplicação do modelo de Nielsen e das propriedades mecânicas, ópticas e permeabilidade. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**. v. 20, n.1, p. 39-45, 2010.

NAKAMURA, K.; TOMITA, T; ABE, N.; KAMIO, Y. Purification and characterization of an extracellular poly(L-lactic acid) depolymerase from a soil isolate, *Amycolatopsis* sp. strain K104-1. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 67, p.341- 353, 2001.

NAM, J. Y.; RAY, S. S.; OKAMOTO, M. Crystallization behavior and morphology of biodegradable polylactide/layered silicate nanocomposite. **Macromolecules**. v. 36, p. 7126-7131, 2003.

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.

NIELSEN, L.E. Models for the permeability of filled polymer systems. **Journal of Macromolecular Science, Part A: Pure and Applied Chemistry**. v.1, n.5, p. 929-942, 1967.

NIGMATULLIN, R.; GAO, F.; KONOVALOVA, V. Polymer-layered silicate nanocomposites in the design of antimicrobial materials. **Journal of Materials Science**. v. 43, p. 5728-5733, 2008.

OBUCHI, S.; OGAYA, S. Packaging and other commercial applications. In: AURAS, R.; LIM, L.; SELKE, S.E.M.; TSUJI, H. (Eds). **Poly(lactic acid): synthesis, structures, properties, processing, and application**. Hoboken: John Wiley & Sons, 2010, p.155-179.

OECD- Organisation for Economic Co-operation and Development 208-“Terrestrial Plant Test: Seedling Emergence and Seedling Growth Test”. 2006.

OGATA, N.; JIMENEZ, G.; KAWAI, H.; OGIHARA, T. Structure and thermal/mechanical properties of poly(l-lactide)-clay blend. **Journal of Polymer Science, Part B: Polymer Physics**. v. 35, p. 389-396, 1997.

OHKITA, T.; LEE, S. Thermal degradation and biodegradability of poly(lactic acid)/ corn starch biocomposites. **Journal of Applied Polymer Science**. v. 100, p. 3009-2017, 2006.

OKAMOTO, M.; MALLAPRAGADA, S.; NARASIMHAN, B. Biodegradable polymer/layered silicate nanocomposites: a review. In: BASTIOLI, C. (Ed.). **Handbook of Biodegradable Polymeric Materials and Their Applications**. Valencia: American Scientific Publishers, 2005, p. 1-45.

OZKOC, G.; SEBNEM, K. Morphology, biodegradability, mechanical and thermal properties of nanocomposite films based on PLA and plasticized PLA. **Journal of Applied Polymer Science**. v. 144, p. 2481-2487, 2009.

PAIVA, L.B.; MORALES, A.R.; GUIMARÃES, T.R. Propriedade mecânicas de nanocompósitos de polipropileno e montmorilonita organofílica. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**. v. 16, n. 2, p. 136-140, 2006.

PAIVA, L.B.; MORALES, A.R., BRANCIFORTI, M.C.; BRETAS, R.S. Organophilic bentonites based on Argentinean and Brazilian bentonites. Part 2: potential evaluation to obtain nanocomposites. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**. v. 29, p. 751-762, 2012.

PAN, P.; ZHU, B.; INOUE, Y. Enthalpy relaxation and embrittlement of poly(l-lactide) during physical aging. **Macromolecules**. v. 40, p. 9664-9671, 2007.

PAN, P.; LIANG, Z.; ZHU, B.; DONG, T.; INOUE, Y. Roles of physical aging on crystallization kinetics and induction period of poly(l-lactic acid). **Macromolecules**. v. 41, p. 8011-8019, 2008.

PAUL, M.; DELCOURT, C.; ALEXANDRE, M.; DEGÉE, P.; MONTEVERDE, F.; DUBOIS, P. Polylactide/montmorillonite nanocomposites: study of the hydrolytic degradation. **Polymer Degradation and Stability**. v. 87, p. 535-542, 2005.

PLUTA, M.; GALESKI, A.; ALEXANDRE, M.; PAUL, M.; DUBOIS, P. Polylactide/montmorillonite nanocomposites and microcomposites prepared by melt blending: structure and some physical properties. **Journal of Applied Polymer Science**. v. 86, p. 1497-1506, 2002.

PLUTA, M.; PAUL, M.; ALEXANDRE, M.; DUBOIS, P. Plasticized polylactide/Clay nanocomposites. I. The role of filler content and its surface organo-modification on the

physic-chemical properties. **Journal of Polymer Science: Part B: Polymer Physics**. v. 44, p. 299-311, 2006.

PRADELLA, J. G. C. **Biopolímeros e Intermediários Químicos**. Relatório técnico no 84396-205, Centro de Tecnologia de Processos e Produtos, Laboratório de Biotecnologia Industrial – LBI/CTPP 2006.

PRANAMUDA, H.; TOKIWA, Y.; TANAKA, H. Polylactide degradation by an *Amycolatopsis* sp. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 63, p. 1637-1640, 1997.

PRANAMUDA, H.; TSUCHII, A.; TOKIWA, Y. Poly(L-lactide)-degrading enzyme produced by *Amycolatopsis* sp. **Macromolecular Bioscience**. v.1, p.25-29, 2001.

RANK, J.; NIELSEN, M.H. *Allium cepa* anaphase-telophase root tip chromosome aberration assay on N-mthyl-N-nitrosourea, maleic hydrazide, sodium azide, and ethyl methanesulfonate. **Mutation Research**. v. 390, p. 121-127, 1997.

RANK, J.; NIELSEN, M.H. Genotoxicity testing of wastewater sludge using *Allium cepa* anaphase-telophase chromosome aberration assay. **Mutation Research**. v. 418, p. 113-119, 1998.

RASAL, R.M.; JANORKAR, A.V.; HIRT, D. E. Poly(lactic acid) modifications. **Progress in Polymer Science**. v. 35, p. 338-356, 2010.

RAY, S.; YAMADA, K.; OKAMOTO, M.; UEDA, K. New polylactide-layered silicate nanocomposites.2.concurrent improvements of material properties, biodegradability and melt rheology. **Polymer**. v.44, p. 857-866, 2003.

RAY, S.S.; OKAMOTO, M. Biodegradable polylactide and its nanocomposites: opening a new dimension for plastics and composites. **Macromolecular Rapid Communications**. v. 24, p. 815-840, 2003a.

RAY, S.; OKAMOTO, M. Polymer/layered silicate nanocomposites: a review from preparation to processing. **Progress in Polymer Science**. v. 28, p. 1539-1641, 2003b.

RAY, S.S.; BOUSMINA, M. Layered silicate based polymeric nanocomposites. In: NALWA, H.S. (Ed.). **Polymeric nanostructures and their applications**. Los Angeles: American Scientific Publishers, 2008, p. 1-97.

RHIM, J-W.; HONG, S.I.; PARK, H.M.; NG, P.W. Preparation and characterization of chitosan-based nanocomposite films with antimicrobial activity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 54, p. 5814-5822, 2006.

RHIM, J-W.; HONG, S-I.; HA, C-S. Tensile, water vapor barrier and antimicrobial properties of PLA/nanoclay composites films. **Food Science and Technology**. v. 42, p. 612-617, 2009.

RIBEIRO, L.R.; SALVADORI, D.M.F.; MARQUES, E.K. **Mutagênese Ambiental**. Canoas: ULBRA, 2003.

RUDEEKIT, Y.; SIRIYOTA, P. INTARAKSA, P.; CHAIWUTTHINAN, P. Compostability and ecotoxicity of poly(lactic acid) and starch blends. **Advanced Materials Research**. v. 506, p. 323-326, 2012.

RUDNIK, E.; BRIASSOULIS, D. Degradation behavior of poly (lactic acid) films and fibers in soil under Mediterranean field conditions and laboratory simulations testing. **Industrial Crops and Products**. v. 33, p. 648-658, 2011.

SANTOS, P. S. **Ciência e Tecnologia de Argilas**. São Paulo: Ed. Edgard Blucher, 1989.

SERRES, F.J. Introduction: utilization of higher plant systems as monitors of environmental mutagens. **Environmental Health Perspectives**. v. 27, p. 3-6, 1978.

SMAKA-KINCL, V.; STEGNAR, P.; LOVKA, M.; TOMAN, M.J. The evaluation of waste, surface and ground water quality using the Allium test procedure. **Mutation Research**. v. 368, p. 171-179, 1996.

SODERGARD, A.; STOLT, M. Properties of lactic acid based polymers and their correlation with composition. **Progress in Polymer Science**. v.27, p. 1123-1163, 2002.

SOLARSKI, S. ; MAHJOUBIU, F. ; FERREIRA, M. ; DEVAUX, E. ; BACHELET, P. ; BOURBIGOT, S. ; DELOBEL, R. ; COSZACH, P. ; MURARIU, M. ; FERREIRA, A.S. ; ALEXANDRE, M. ; DEGEE, P. ; DUBOIS, P. (Plasticized) polylactide/clay nanocomposites textile: thermal, mechanical, shrinkage and fire properties. **Journal of Materials Science**. v. 42, n. 13, p. 5105-5117, 2007.

SONNEVELD, C. ; ENDE, J. ; DIJK, P.A. Analysis of growing media by means of 1:1 $\frac{1}{2}$ volume extract. **Communications in soil science and plant analysis**. v. 5, p. 183-202, 1974.

SOUTHERN CLAY. **Material Safety Data Sheet**. Disponível em : <<http://www.scprod.com/nafta/index.html>>. Acesso em : 29 de janeiro de 2013.

SOUTHERN CLAY. **Products bulletins.** Disponível em :
< http://www.scprod.com/product_bulletins.asp>. Acesso em: 6 de março de 2013.

STOEFFLER, K.; LAFLEUR, P. G.; DENAULT, J. Thermal decomposition of various alkyl onium organoclays: effect on polyethylene terephthalate nanocomposites' properties. **Polymer Degradation and Stability.** v. 93, p. 1332-1350, 2008.

SUZUKI, S.; IKADA, Y. Medical applications. In: AURAS, R.; LIM, L.; SELKE, S.E.M.; TSUJI, H. (Eds). **Poly(lactic acid): synthesis, structures, properties, processing, and application.** Hoboken: John Wiley & Sons, 2010, p.155-179.

SUYAMA, T.; TOKIWA, Y.; OUCHANPAGDEE, P.; KANAGAWA, T.; KAMAGATA, Y. Phylogenetic affiliation of soil bacteria that degrade aliphatic polyesters available commercially as biodegradable plastics. **Applied and environmental microbiology.** v. 64, p.5008-5011, 1998.

TANSENGCO, M.L.; TOKIWA, Y. Comparative population study of aliphatic polyesters-degrading microorganisms at 50°C. **Chemistry letters.** v. 27, p. 1043-1044, 1998.

THELLEN, C.; ORROTH, C.; FROIO, D.; ZIEGLER, D.; LUCCIARINI, J.; FARREL, R.; SOUZA, N.A.; RATTO, J.A. Influence of montmorillonite layered silicate on plasticized poly(L-lactide) blown films. **Polymer.** v. 46, p. 11716-11727, 2005.

TOKIWA, Y.; KONNO, M.; NISHIDA, H. Isolation of silk degrading microorganisms and its poly(L-lactide) degradability. **Chemistry letters.** v. 28, p.355-356, 1999.

TOKIWA, Y.; CALABIA, B.P. Biodegradability and biodegradation of poly(lactide). **Applied Microbiology and Biotechnology.** v. 72, p.244-251, 2006.

TOKIWA, Y.; CALABIA, B.P.; UGWU, C.U.; AIBA, S. Biodegradability of plastics. **International Journal of Molecular Sciences.** v.10, p. 3722-3742, 2009.

TOMITA, K.; KUROKI, Y.; NAGAI, K. Isolation of thermophiles degrading poly (l-lactic acid). **Journal of bioscience and bioengineering.** v. 87, n. 6, p. 752-755, 1999.

TOMITA, K.; TSUJI, H.; NAKAJIMA, T.; KIKUCHI, Y.; IKARASHI, K.; IKEDA, N. Degradation of poly(D-lactic acid) by a thermophile. **Polymer Degradation and Stability.** v. 81, p. 167-171, 2003.

TOMITA, K.; NAKAJIMA, T.; KIKUCHI, Y.; MIWA, N. Degradation of poly(L-lactic acid) by a newly isolated thermophile. **Polymer Degradation and Stability.** v. 84, p. 433-438, 2004.

VAN DIJK, J.A.P.P.; SMIT, J.A.M.; KOHN, F.E.; FEIJEN, J. Characterization of poly(d,l-lactic acid) by gel permeation chromatography. **Journal of Polymer Science: Polymer Chemistry Edition**. v. 21, p. 197-208, 1983.

VAN GINKEL, C.G. Biodegradation of cationic surfactants: an environmental perspective. In: ZOLLER, U. (Ed.). New York: Marcel Dekker, 2004, p. 523-549.

VENTURA, B.C. **Avaliação dos efeitos citotóxicos, genotóxicos e mutagênicos do herbicida atrazina, utilizando *Allium cepa* e *Oreochromis niloticus* como sistema-teste**. 2004. 124f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Instituto de Biociências do Campus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2004.

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, 2003.

VAN VLACK, L.H.V. **Elements of Materials Science and Engineering**. Ann Arbor: Addison-Wesley, 1990.

WALKER, C.M.; HOPKIN, S.P.; SIBLY, R.M.; PEAKALL, D.B. **Principles of Ecotoxicology**. Bristol: Taylor e Francis, 1996.

WEIR, N.A.; BUCHANAN, F.J.; ORR, J.F.; FARRAR, D.F.; DICKSON, G.R. Degradation of poly-L-lactide. Part 2: increased temperature accelerated degradation. **Proceedings of the Institution of Mechanical Engineers, Part H: Journal of Engineering in Medicine**. v. 218, p. 321-3330, 2004.

WHITE, D.G.; MCDERMOTT, P.F. Biocides, drug resistance and microbial evolution. **Current Opinion in Microbiology**. v. 4, p. 313-317, 2001.

WILDE, B. International and national norms on biodegradability and certification procedures. In: **Handbook of biodegradable polymers**. United Kingdom: Rapra Technology Limited, 2005, p. 145-181.

WU, D.; WU, L.; WU, L.; ZHANG, M. Rheology and thermal stability of polylactide/clay nanocomposites. **Polymer degradation and stability**. v. 91, p. 3149-3155, 2006.

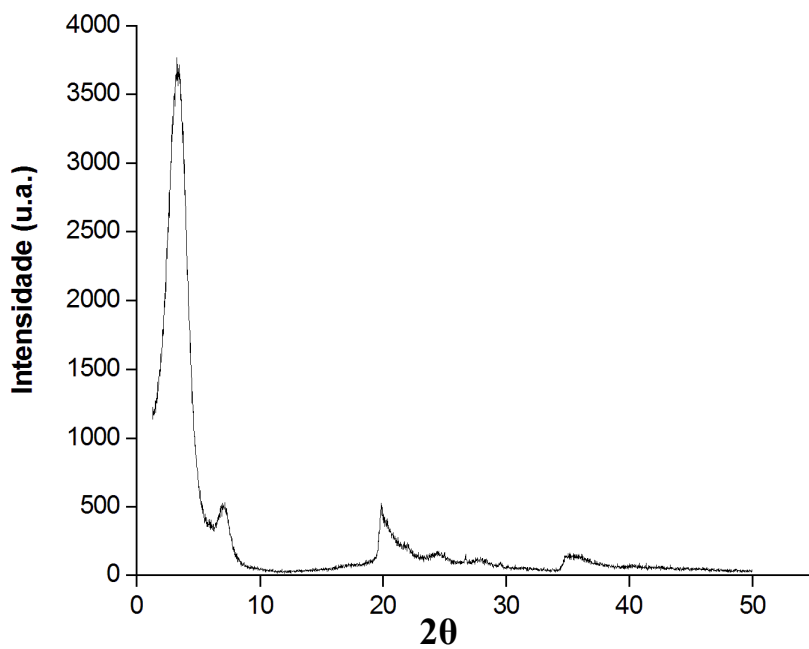
ZENG, Q.H.; YU, A.B.; LU, G.Q.M.; PAUL, D.R. Clay-based polymer nanocomposites: research and commercial development. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**. v.5, p. 1574-1592, 2005.

ZENKIEWICZ, M.; MALINOWKI, R.; RYTLEWSKI, P.; RICHERT, A.; SIKORSKA, W.; KRASOWSKA, K. Some composting and biodegradation effects of physically or chemically crosslinked poly(lactic acid). **Polymer Testing**. v. 31, p. 83-92, 2012.

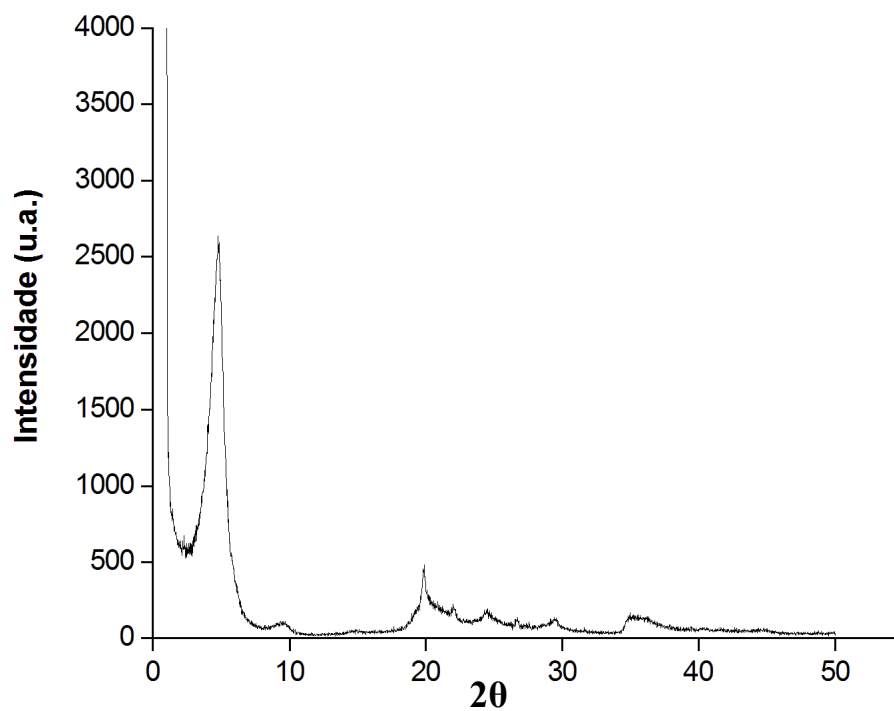
ZHU, J.; MORGAN, A.B.; LAMELAS, F. J.; WILKIE, C.A. Fire properties of polystyrene-clay nanocomposites. **Chemistry of Materials**. v. 13, p. 3772-3780, 2001.

YANG, K.; WANG, X.; WANG, Y. Progress in nanocomposites of biodegradable polymer. **Journal of Chemical Industry and Engineering**. v.13, n.4, p. 485-500, 2007.

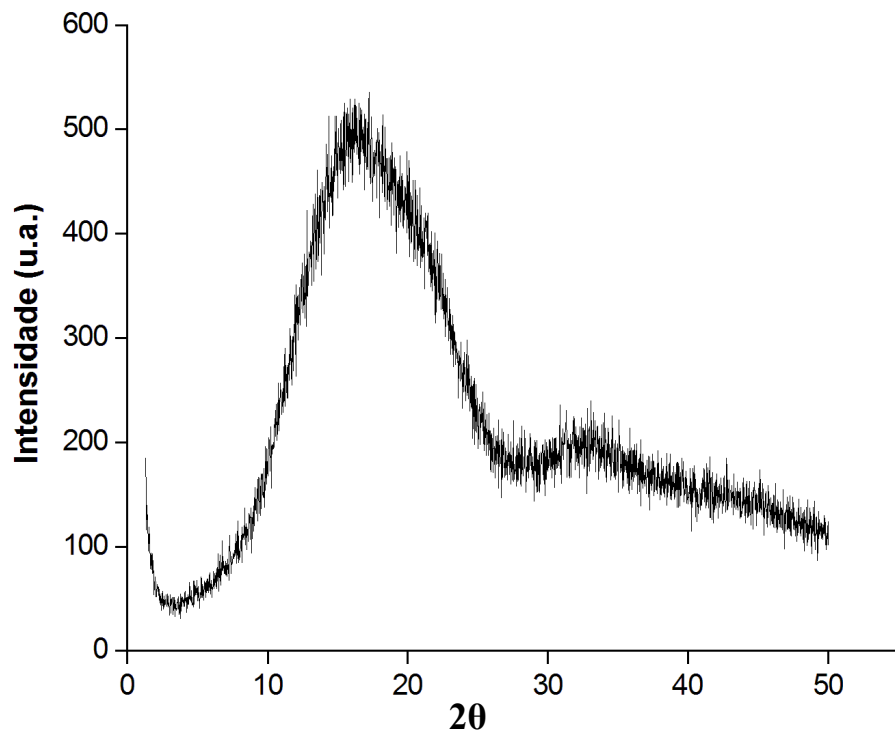
APÊNDICE A- Difratomogramas das argilas organofílicas, do PLA, e seus nanocompósitos



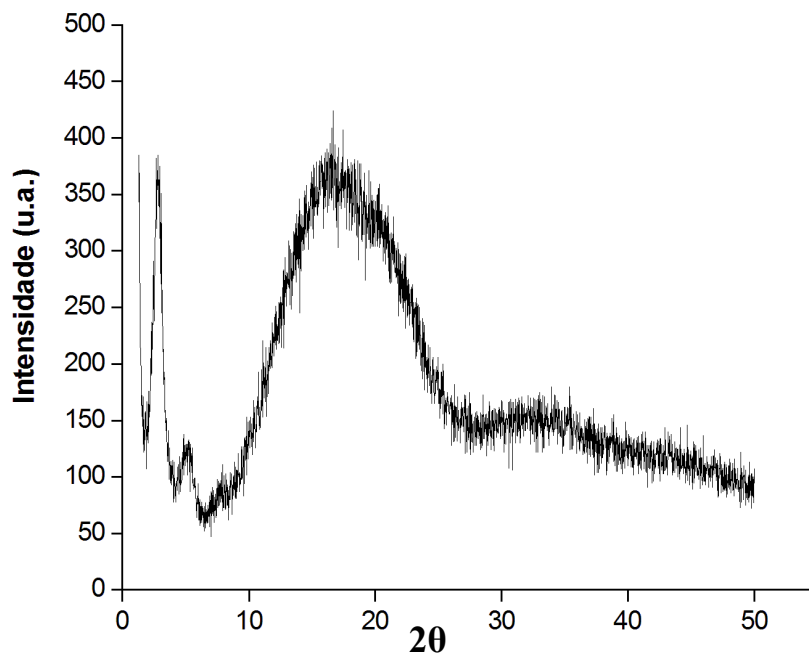
Difratograma da argila Cloisite 20A.



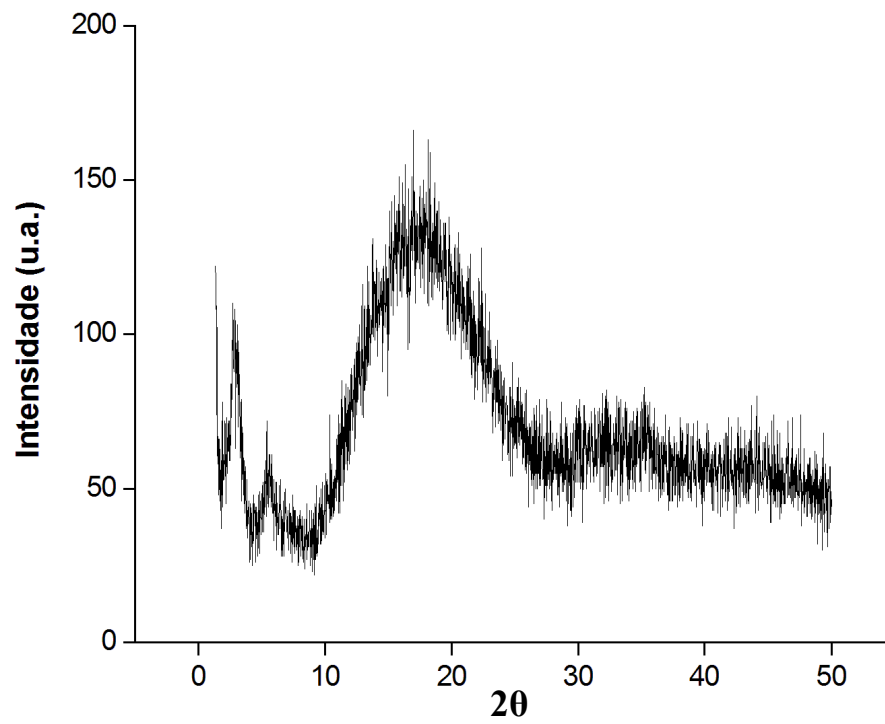
Difratograma da argila Cloisite 30B.



Difratograma do PLA.

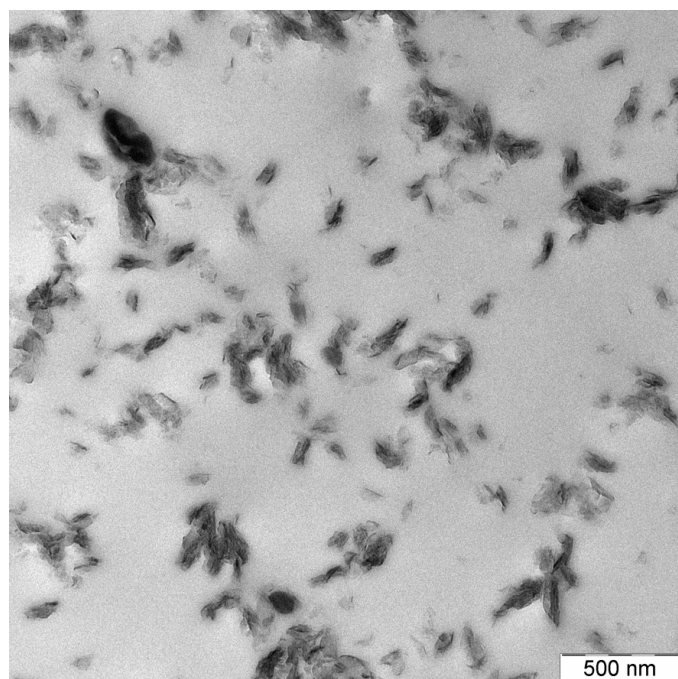
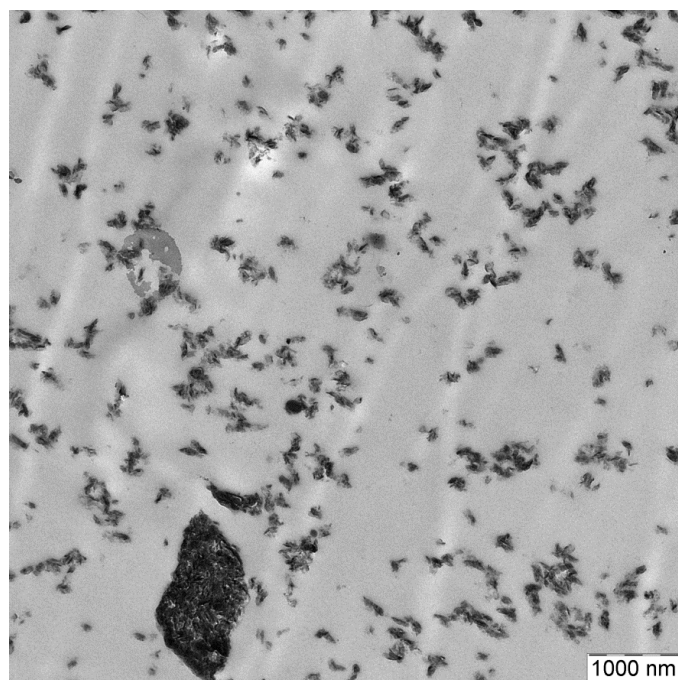


Difratograma do nanocompósito PLA/CLO20A.

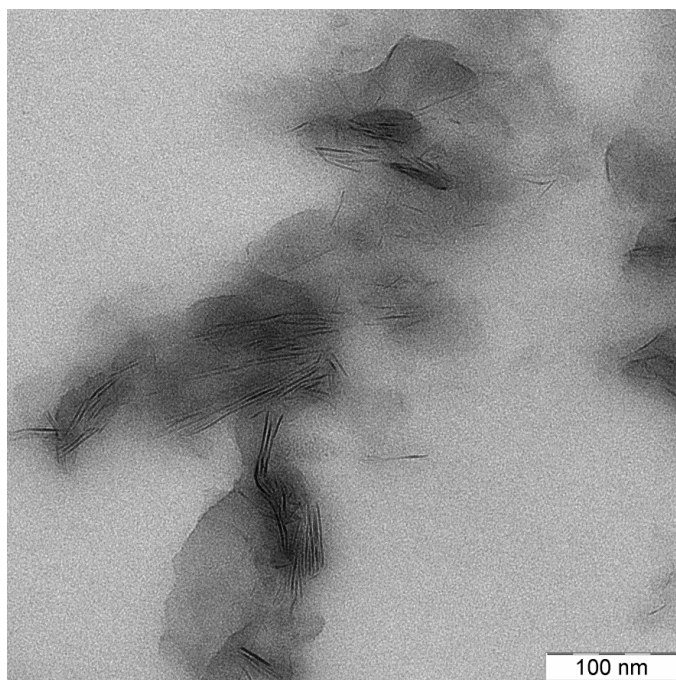
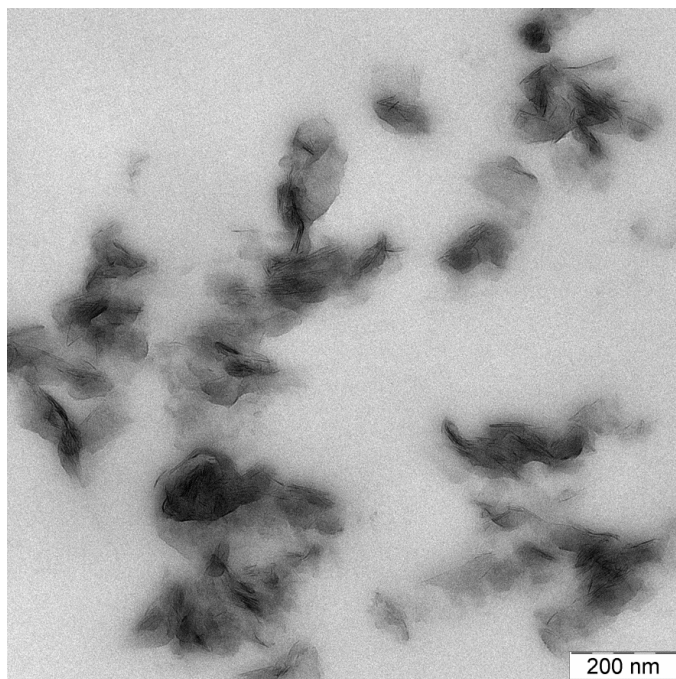


Difratograma do nanocompósito PLA/CLO30B.

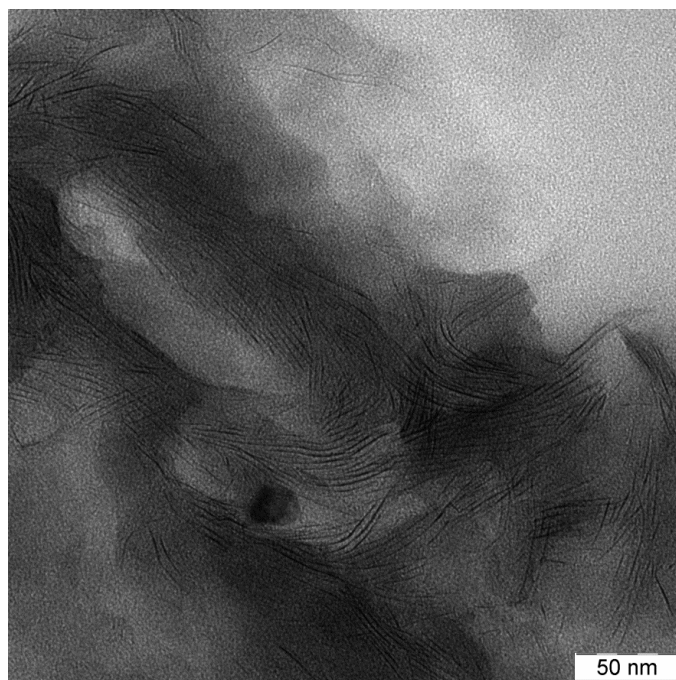
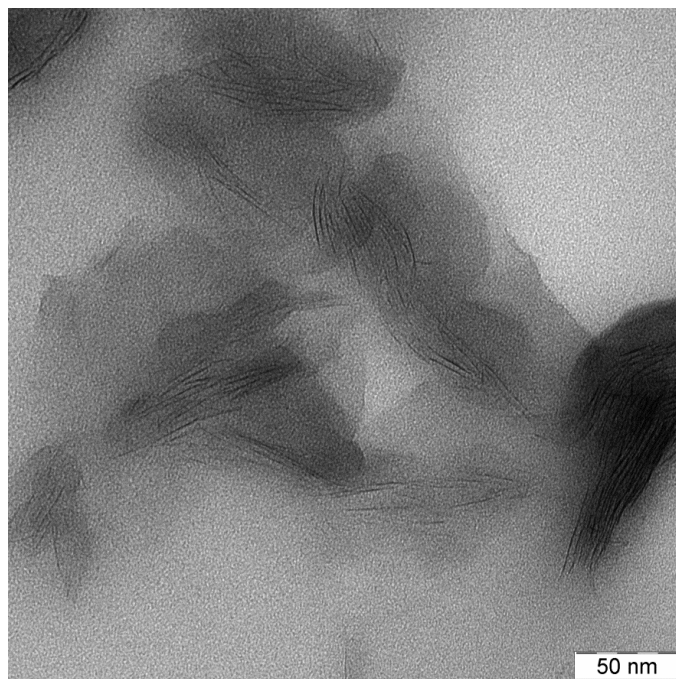
APÊNDICE B- Micrografias dos nanocompósitos



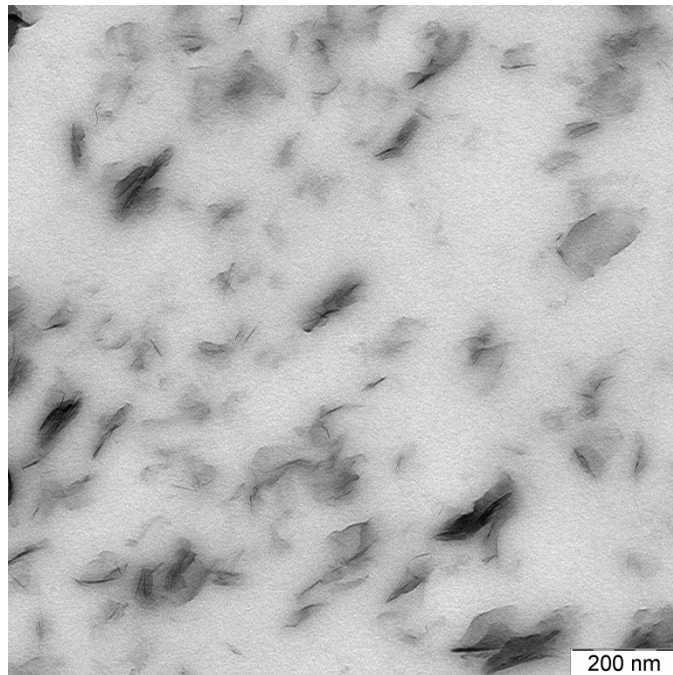
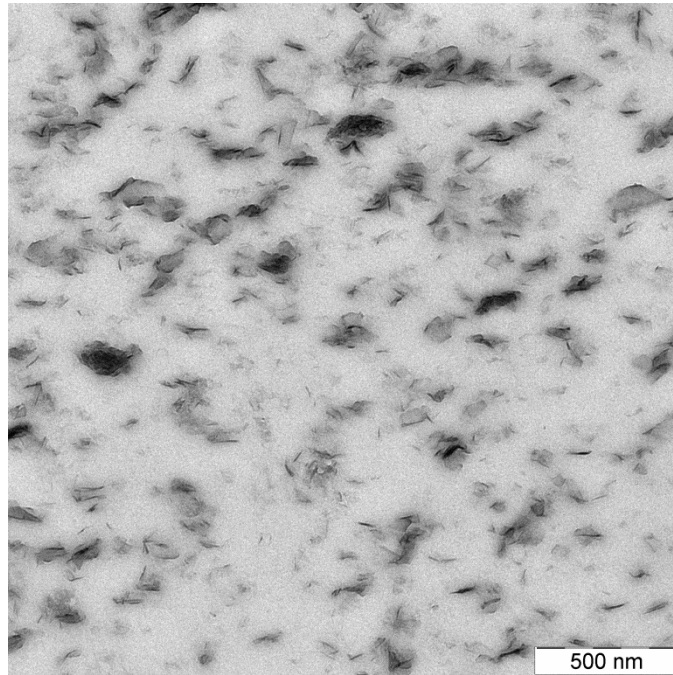
Micrografias do nanocompósito PLA/CLO20A.



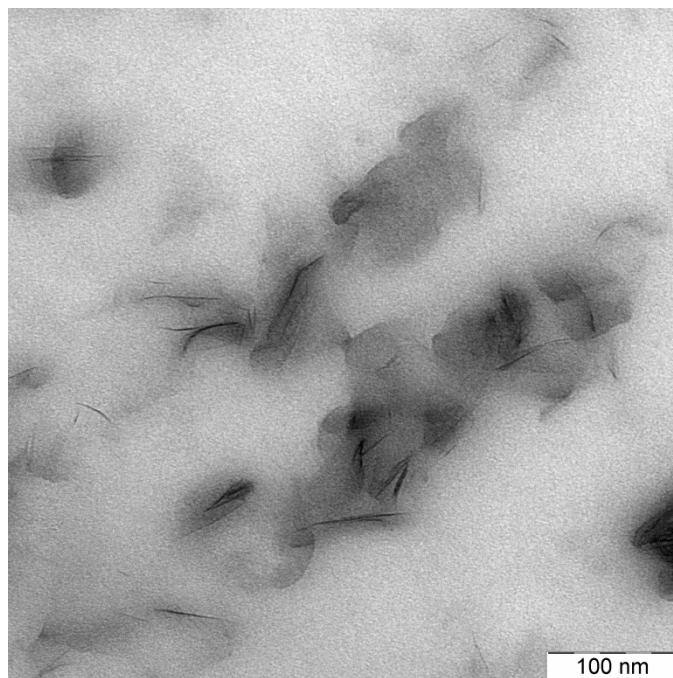
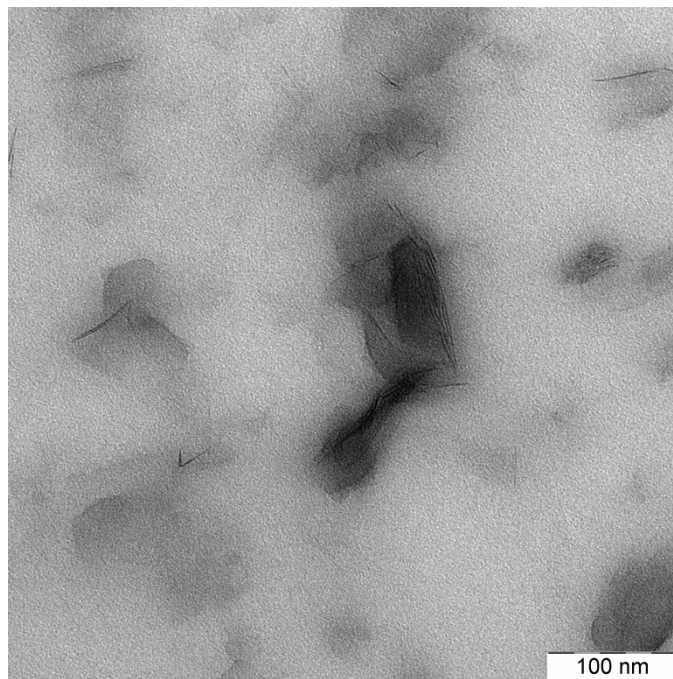
Micrografias do nanocompósito PLA/CLO20A.



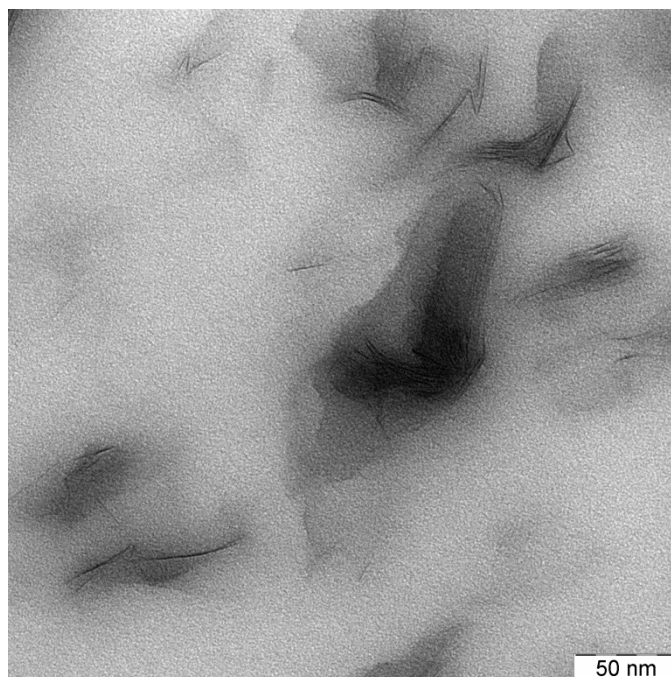
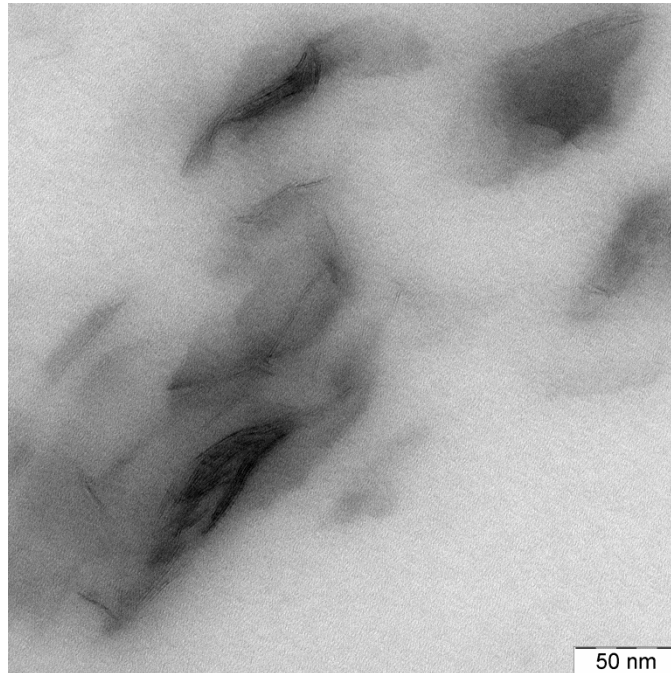
Micrografias do nanocompósito PLA/CLO20A.



Micrografias do nanocompósito PLA/CLO30B.

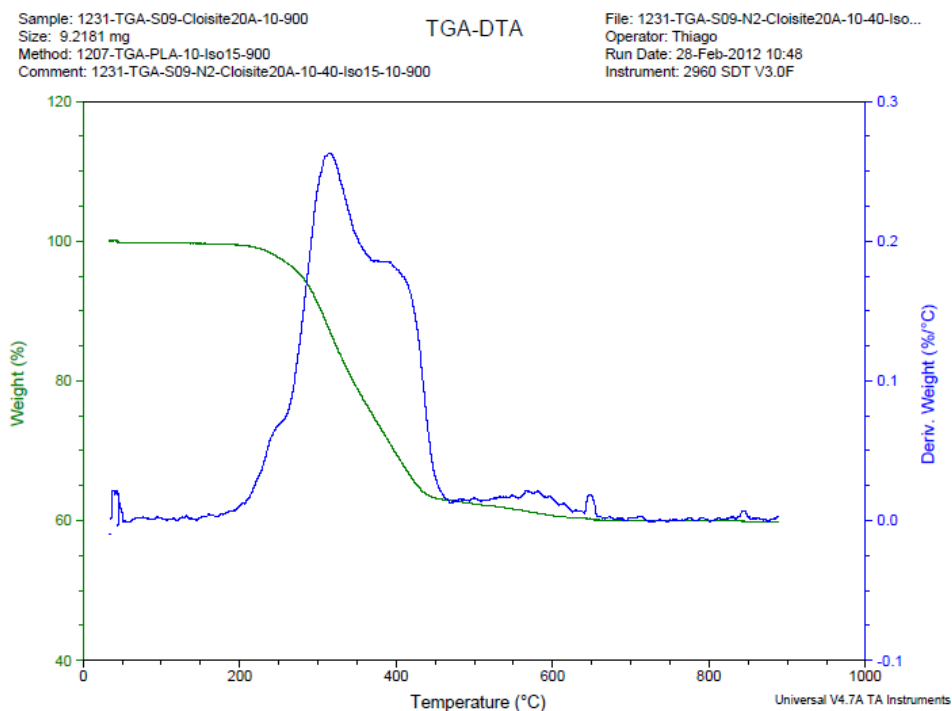


Micrografias do nanocompósito PLA/CLO30B.

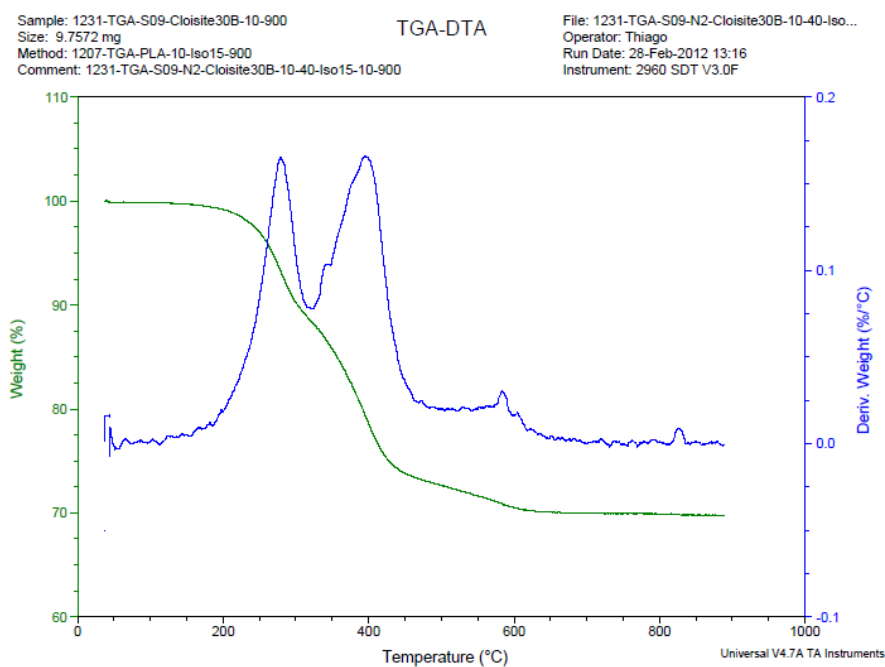


Micrografias do nanocompósito PLA/CLO30B.

APÊNDICE C- Curvas de TGA das argilas organofílicas, PLA e nanocompósitos



Curvas de TGA e DTG da argila organofílica Cloisite 20A.

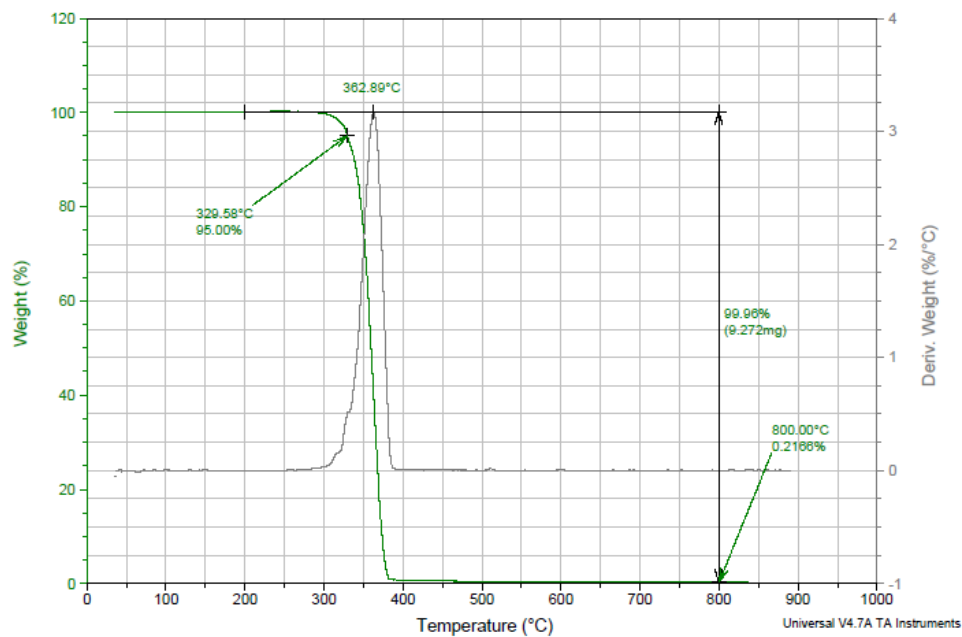


Curva de TGA e DTG da argila organofílica Cloisite 30B.

Sample: 1231-TGA-S08-N2-PLA-Iso15-10-900
 Size: 9.2757 mg
 Method: 1207-TGA-PLA-10-Iso15-900
 Comment: 1231-TGA-S08-N2-PLA-10-40-Iso15-10-900

TGA-DTA

File: 1231-TGA-S08-N2-PLA-10-40-Iso15-10-90...
 Operator: Thiago
 Run Date: 24-Feb-2012 15:00
 Instrument: 2960 SDT V3.0F

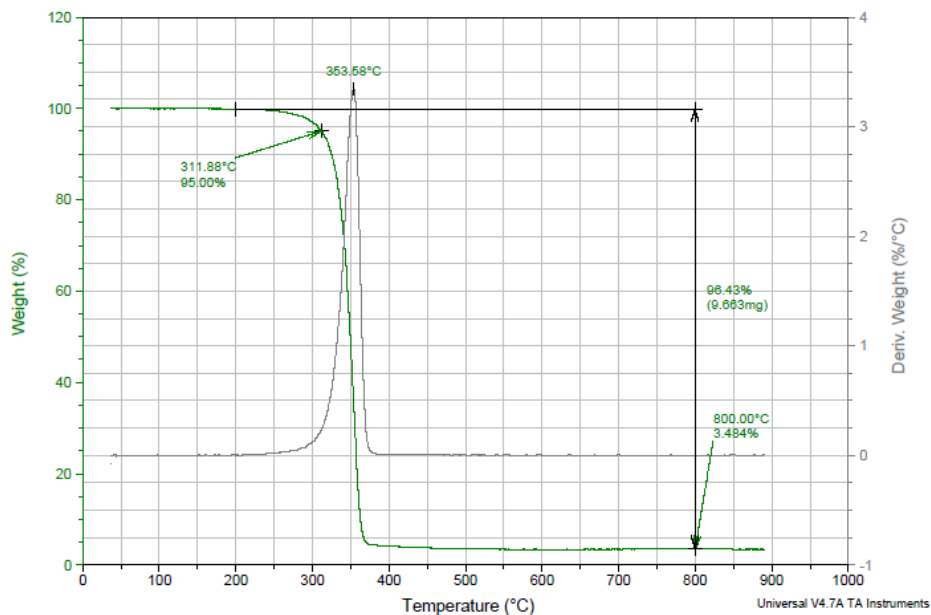


Curvas de TGA e DTG do PLA.

Sample: 1231-TGA-S09-PLAClos20A-10-900-3
 Size: 10.0206 mg
 Method: 1207-TGA-PLA-10-Iso15-900
 Comment: 1231-TGA-S09-N2-PLACloisite20A-10-40-Iso15-10-900

TGA-DTA

File: 1231-TGA-S09-N2-PLACloisite20A-10-40-...
 Operator: Thiago
 Run Date: 29-Feb-2012 15:00
 Instrument: 2960 SDT V3.0F

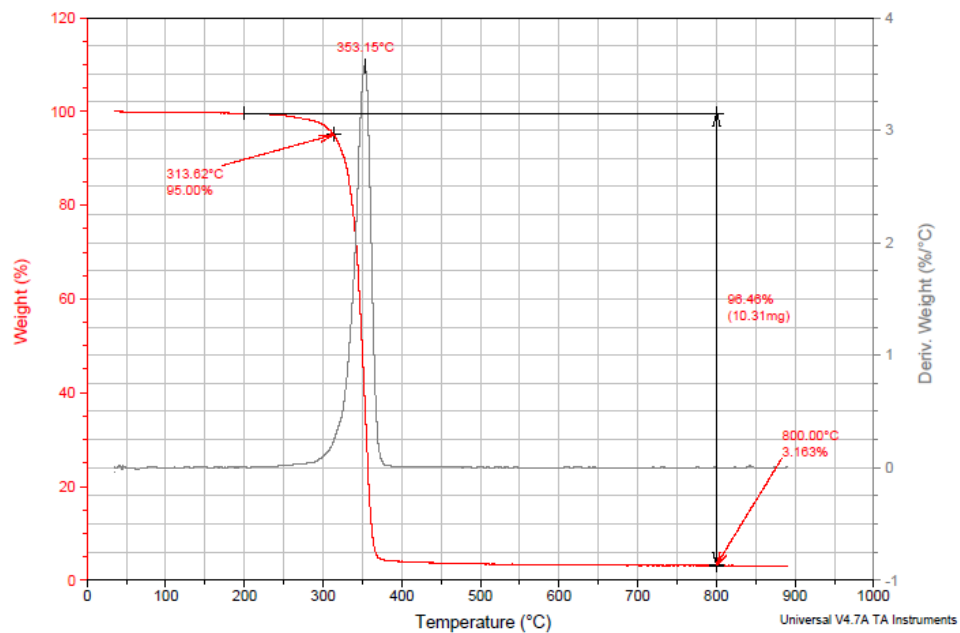


Curvas de TGA e DTG do nanocompósito PLA/CLO20A.

Sample: 1231-TGA-S09-N2-Clos30B-10-900-2
Size: 10.6859 mg
Method: 1207-TGA-PLA-10-Iso15-900
Comment: 1231-TGA-S09-N2-Cloisite30B-10-40-Iso15-10-900

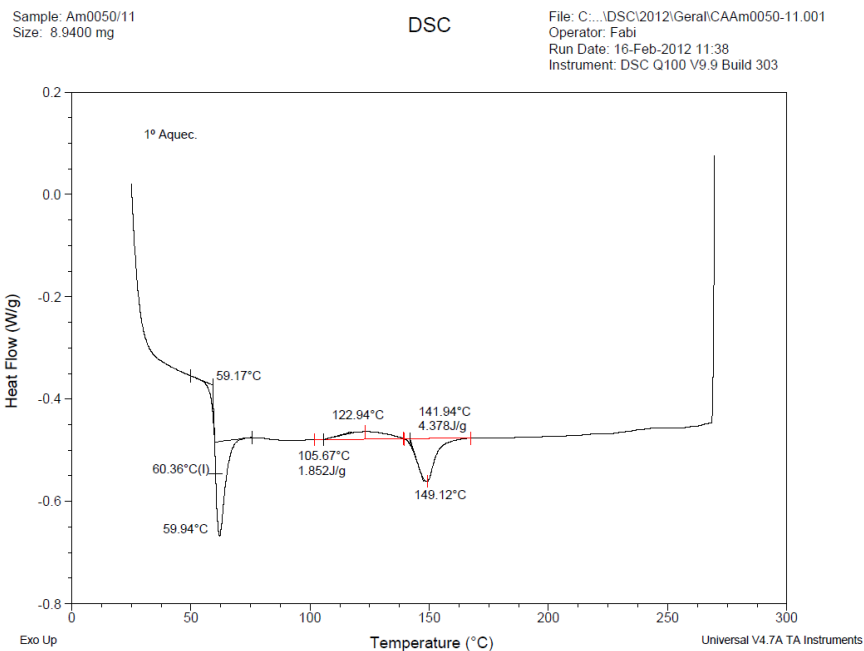
TGA-DTA

File: 1231-TGA-S09-N2-PLACloisite30B-10-40-...
Operator: Thiago
Run Date: 29-Feb-2012 10:04
Instrument: 2960 SDT V3.0F

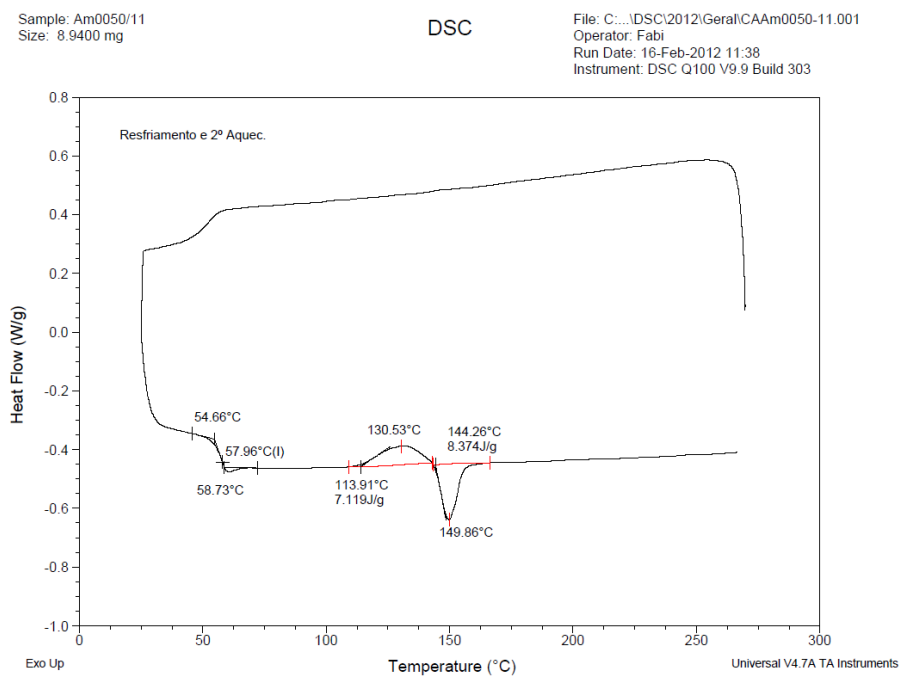


Curvas de TGA e DTG do nanocompósito PLA/CLO30B.

APÊNDICE D - Curvas de DSC do PLA e nanocompósitos



Curva de DSC do PLA no primeiro aquecimento.

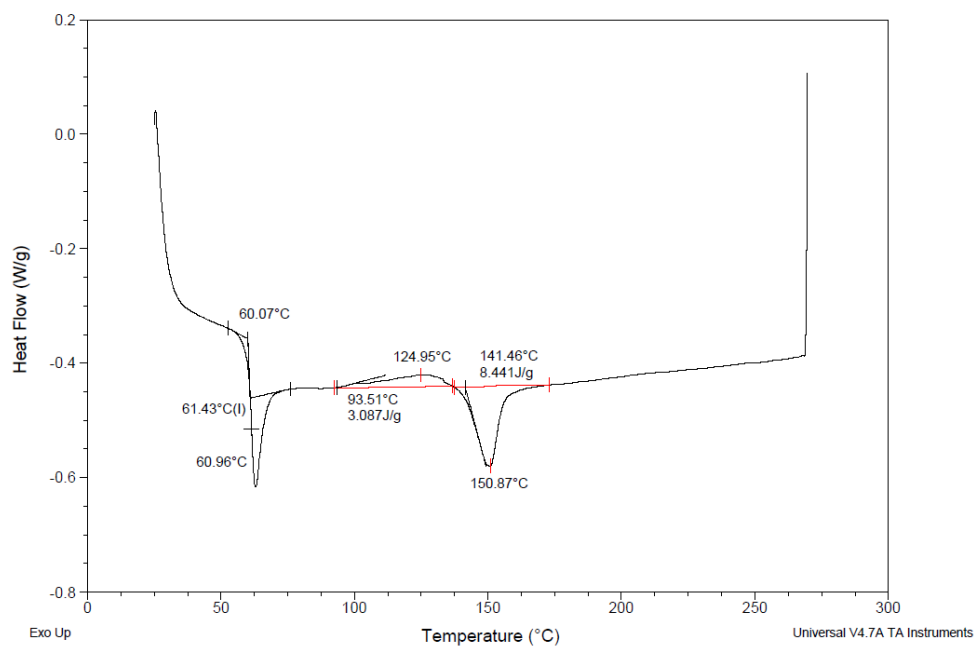


Curvas de DSC do PLA no resfriamento e segundo aquecimento.

Sample: Am0051/11
Size: 8.6100 mg

DSC

File: C:\DSC\2012\Geral\CAAm0051-11.001
Operator: Fabi
Run Date: 16-Feb-2012 13:56
Instrument: DSC Q100 V9.9 Build 303

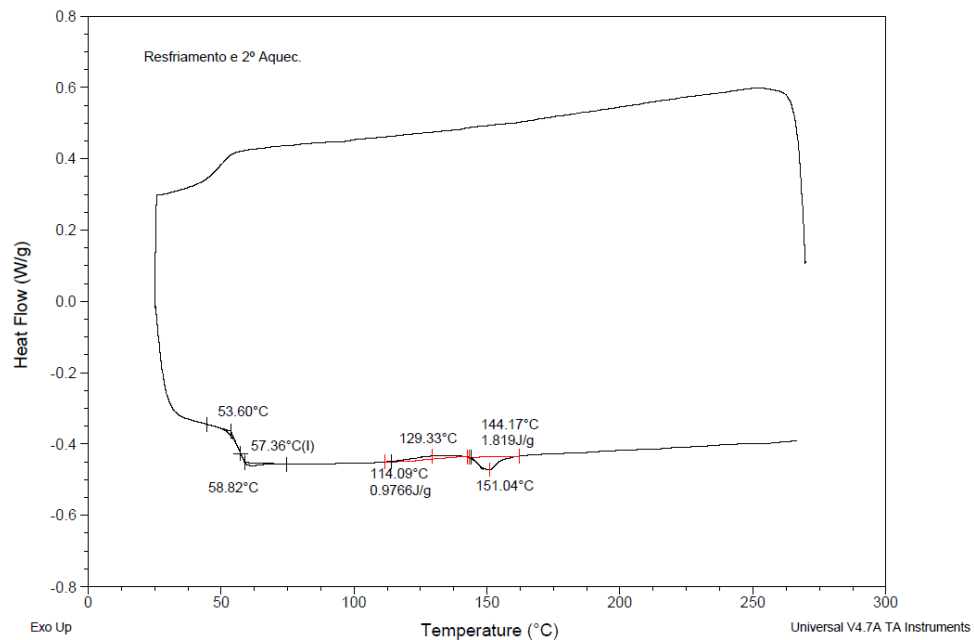


Curva de DSC do nanocompósito PLA/CLO20A no primeiro aquecimento.

Sample: Am0051/11
Size: 8.6100 mg

DSC

File: C:\DSC\2012\Geral\CAAm0051-11.001
Operator: Fabi
Run Date: 16-Feb-2012 13:56
Instrument: DSC Q100 V9.9 Build 303

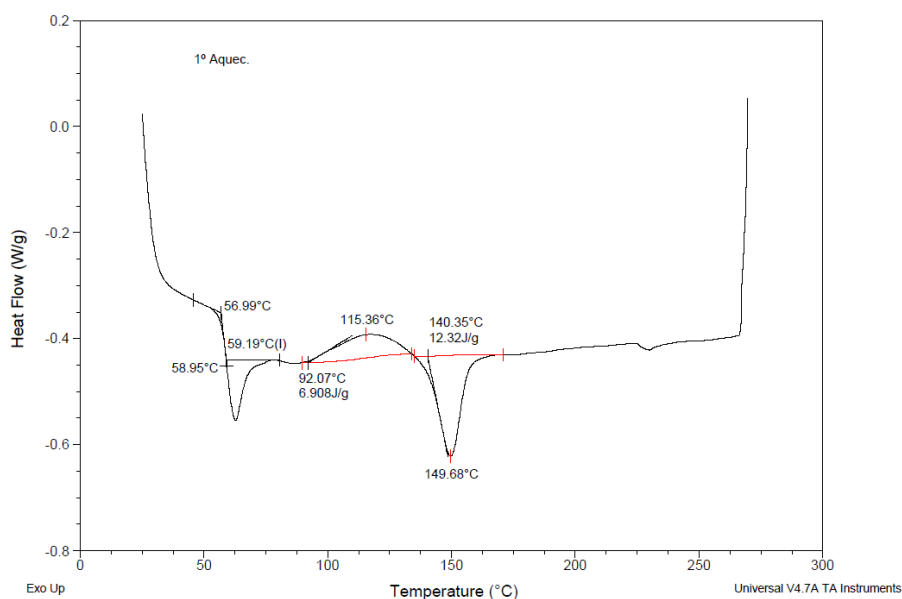


Curvas de DSC do nanocompósito PLA/CLO20A no resfriamento e segundo aquecimento.

Sample: Am0052/11
Size: 8.2800 mg

DSC

File: C:\DSC\2012\Gera\CAAm0052-11.001
Operator: Fabi
Run Date: 16-Feb-2012 15:27
Instrument: DSC Q100 V9.9 Build 303

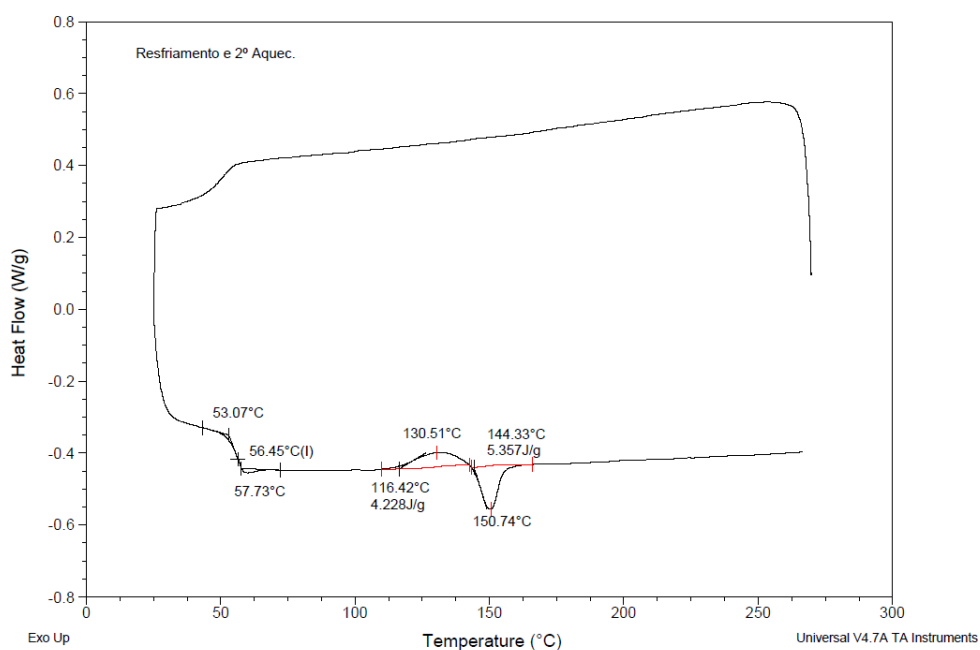


Curva de DSC do nanocompósito PLA/CLO30B no primeiro aquecimento.

Sample: Am0052/11
Size: 8.2800 mg

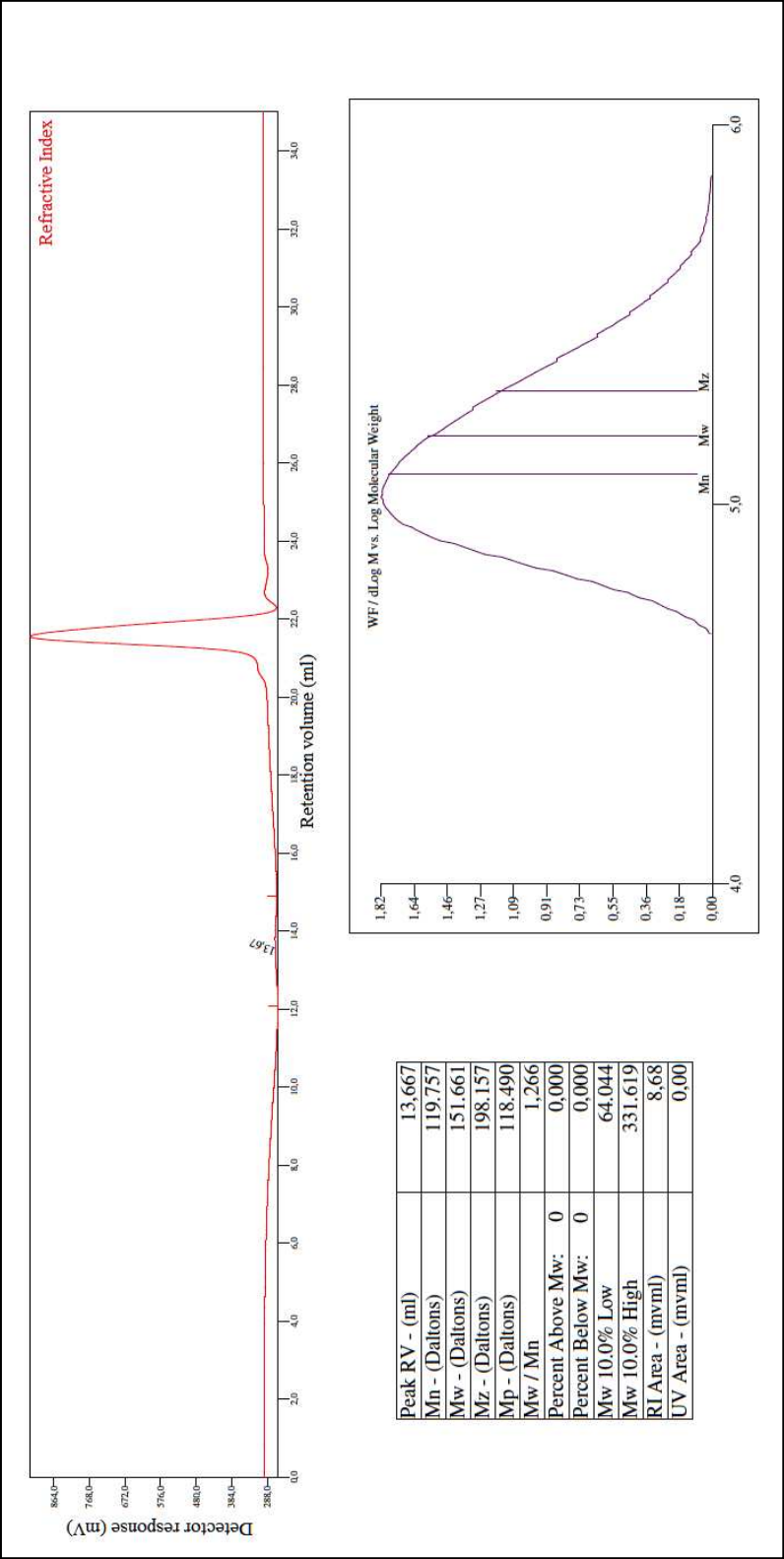
DSC

File: C:\DSC\2012\Gera\CAAm0052-11.001
Operator: Fabi
Run Date: 16-Feb-2012 15:27
Instrument: DSC Q100 V9.9 Build 303

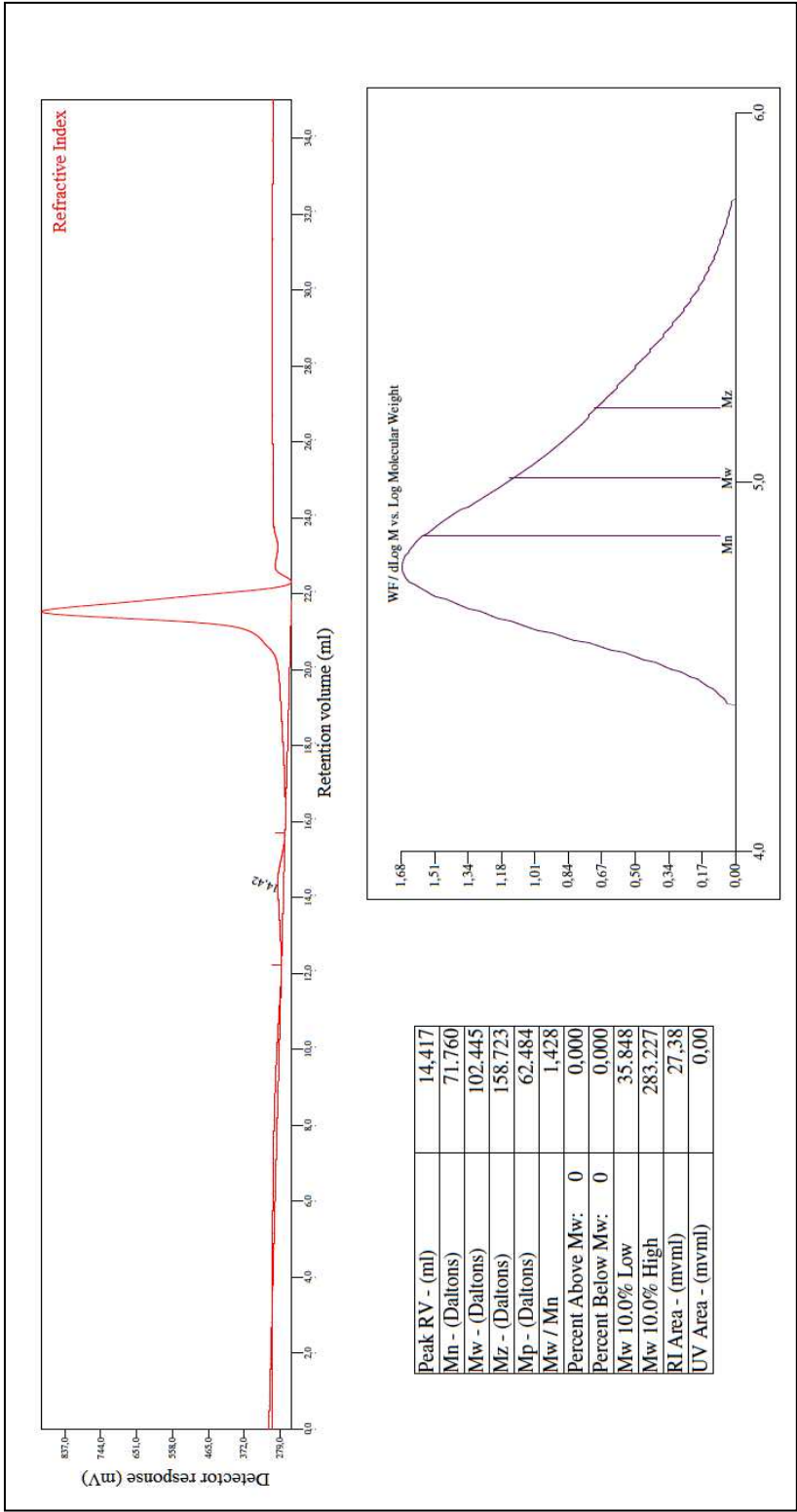


Curvas de DSC do nanocompósito PLA/CLO30B no resfriamento e segundo aquecimento.

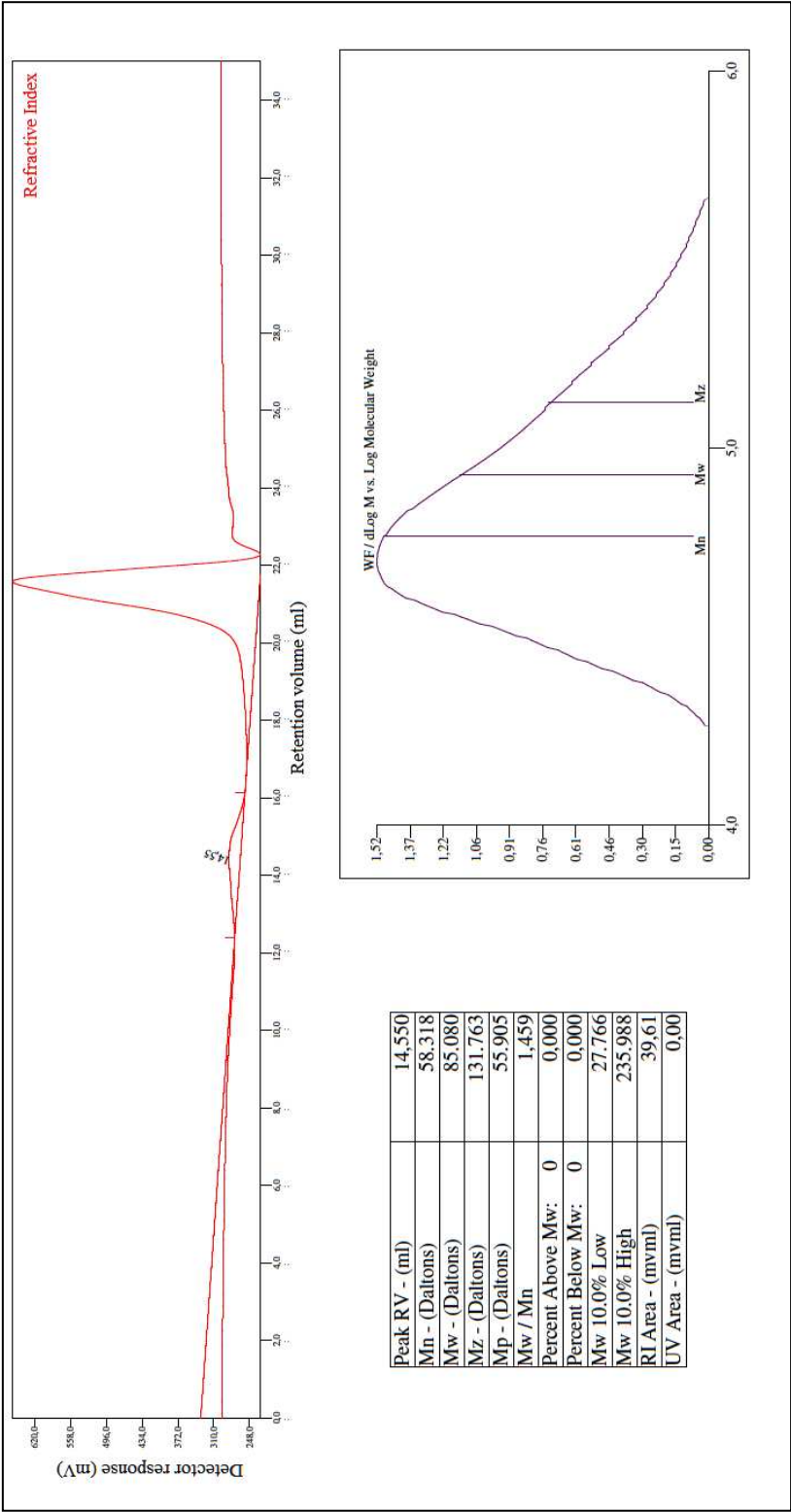
APÊNDICE E- Resultados da análise de GPC do PLA e nanocompósitos.



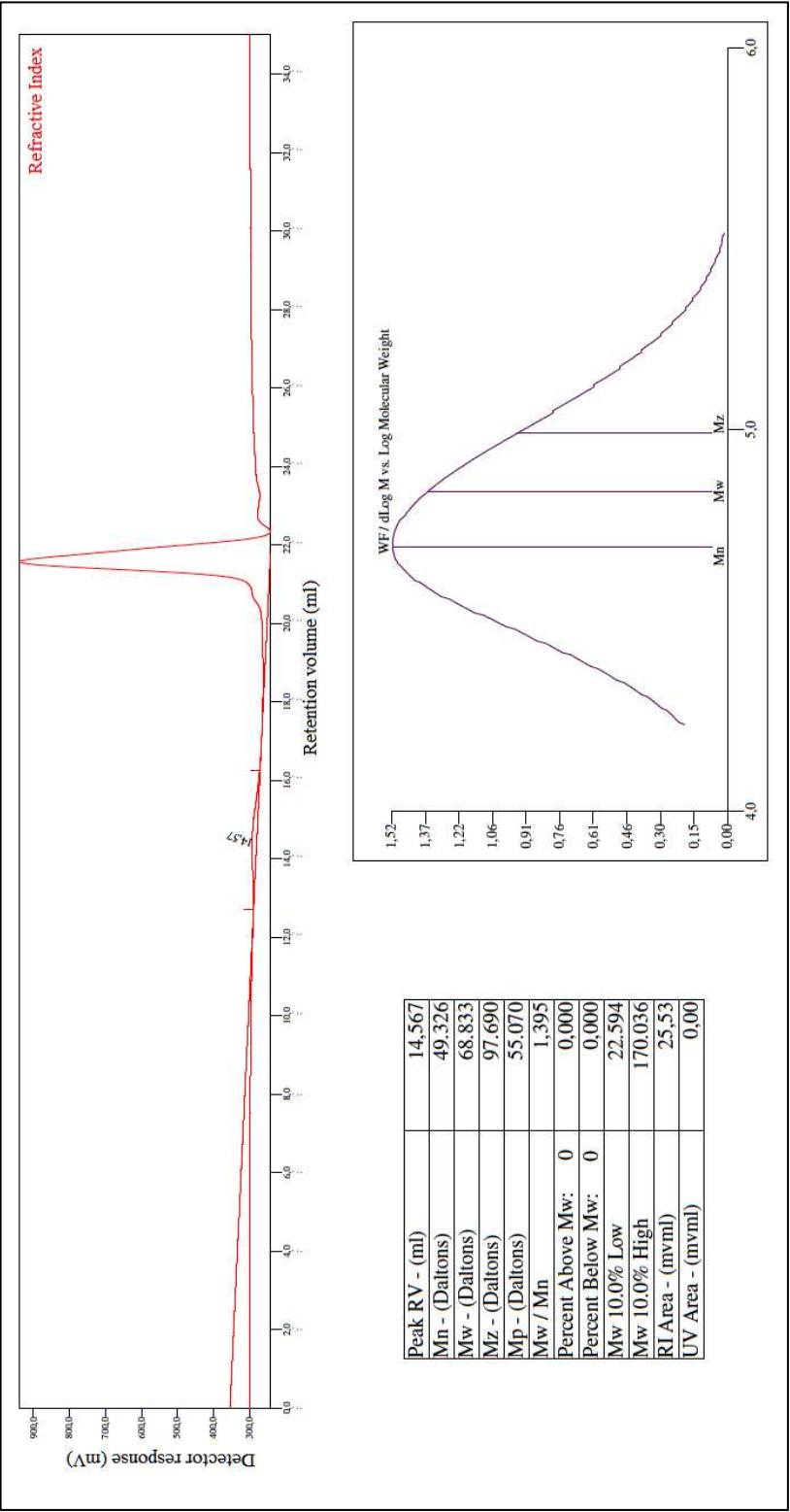
Resultados da análise de GPC do PLA, antes da degradação em composto.



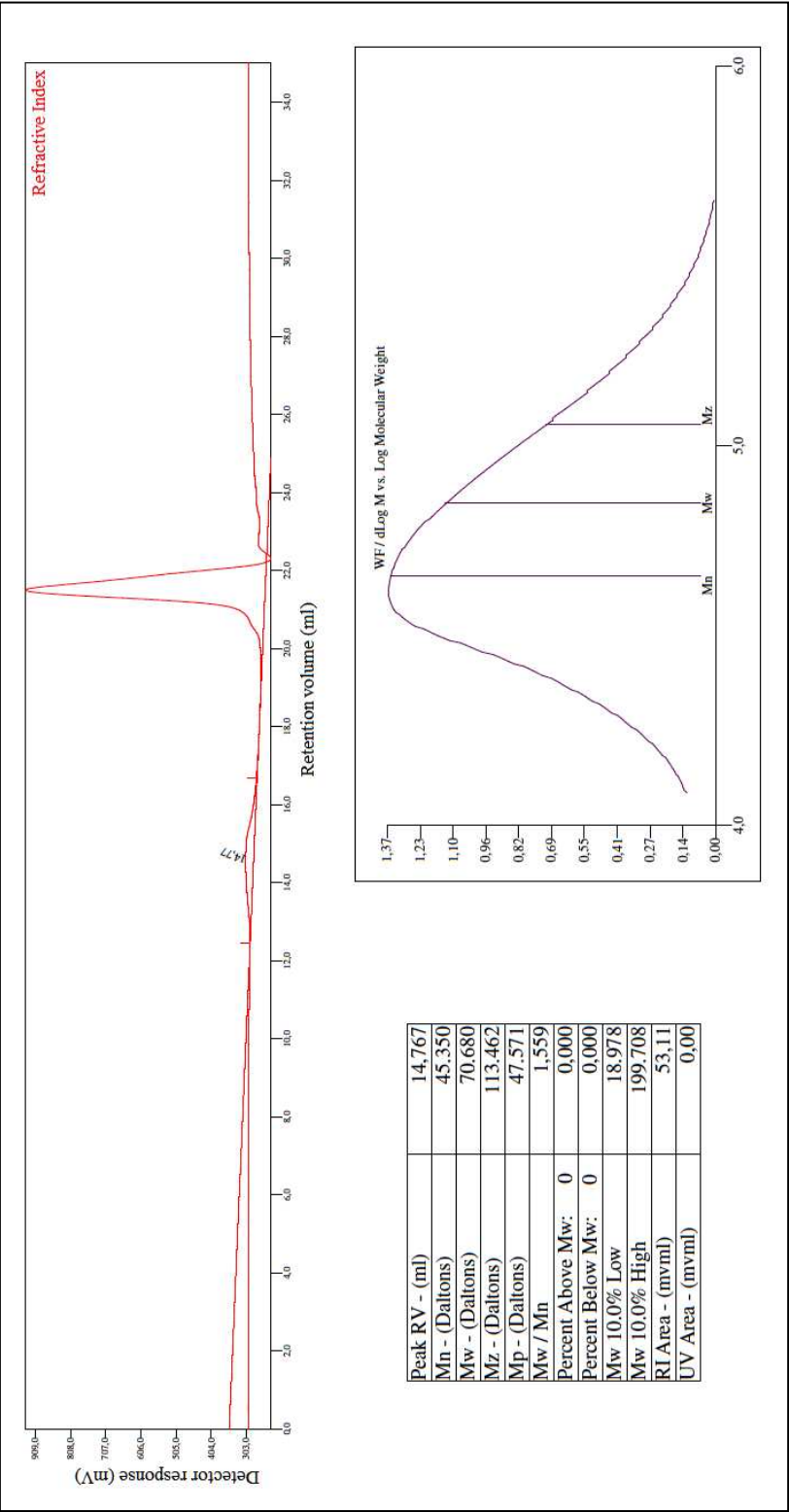
Resultados da análise de GPC do nanocompósito PLA/CLO20A, antes da degradação em composto.



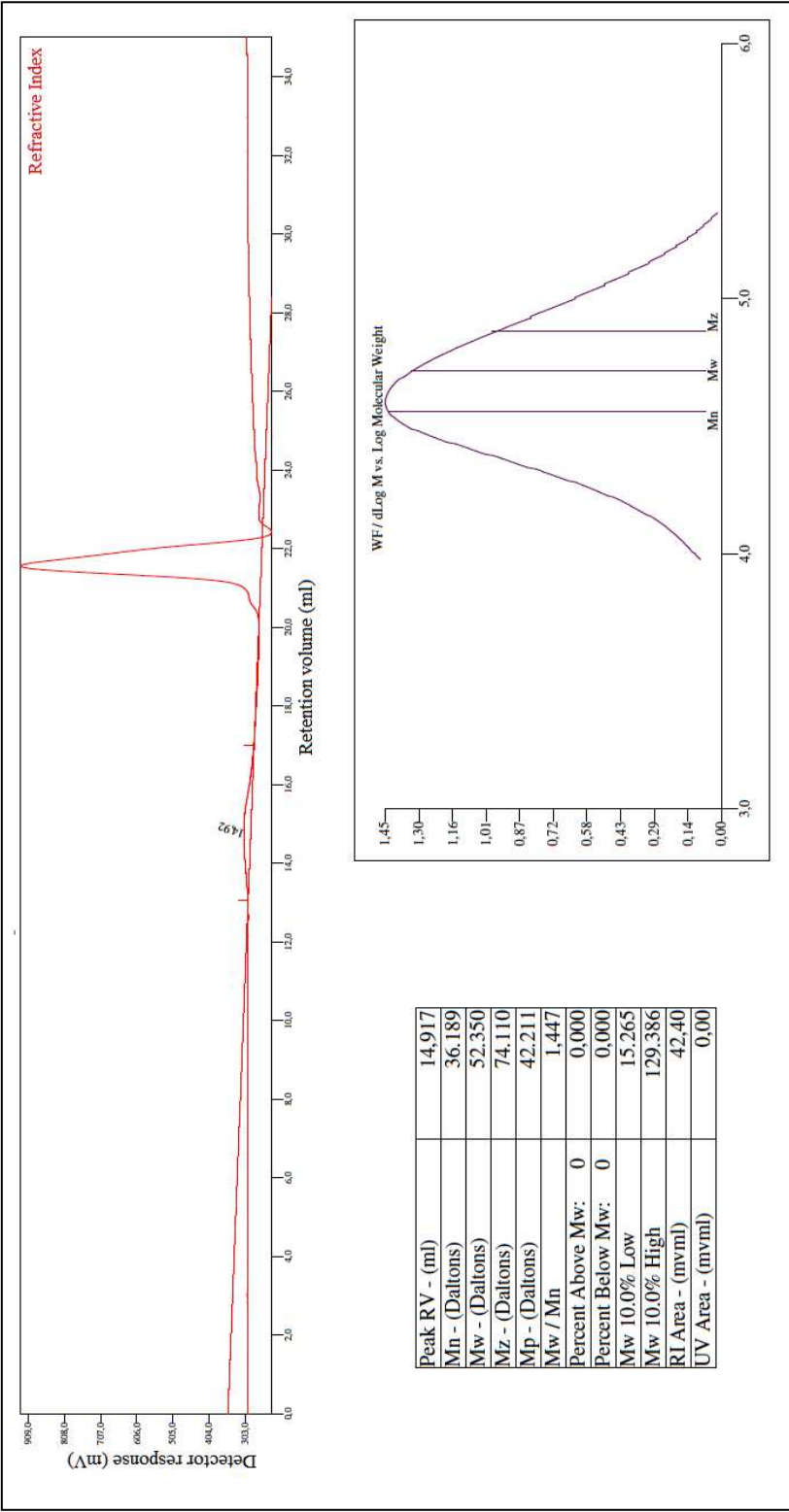
Resultados da análise de GPC do nanocompósito PLA/CLO30B, antes da degradação em composto.



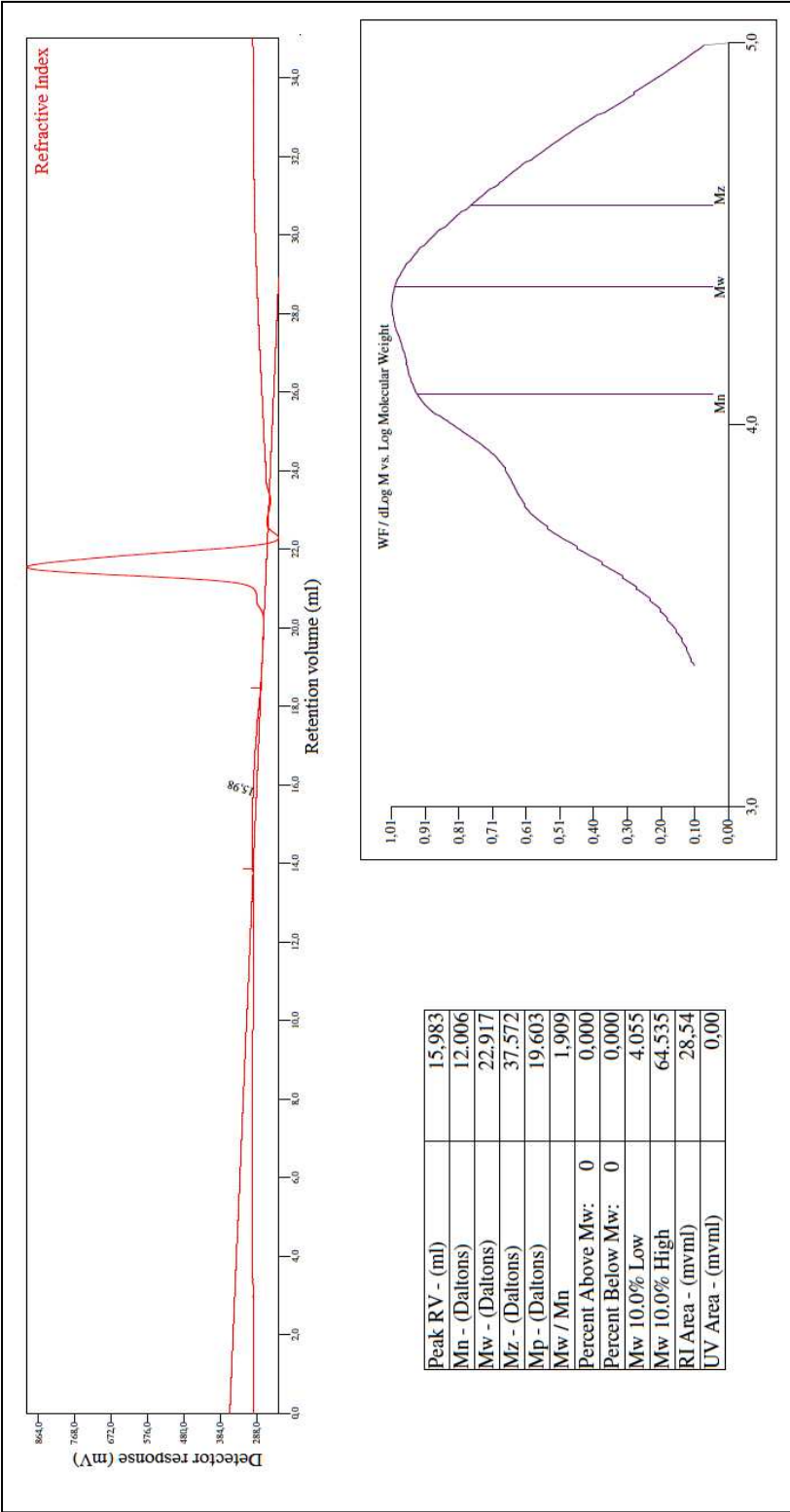
Resultados da análise de GPC do PLA após 15 dias de degradação em composto.



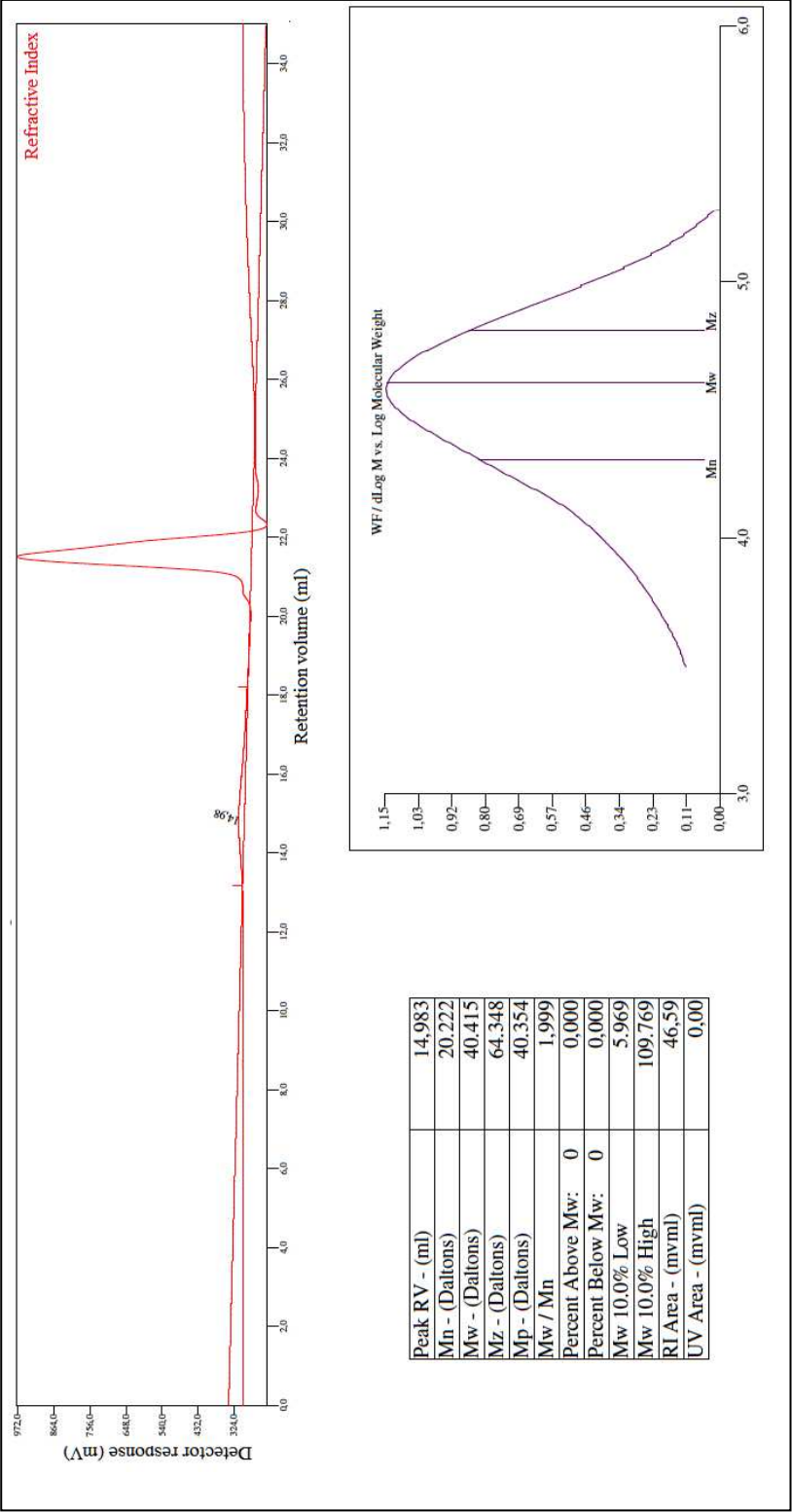
Resultados da análise de GPC do nanocompósito PLA/CLO20A após 15 dias de degradação em composto.



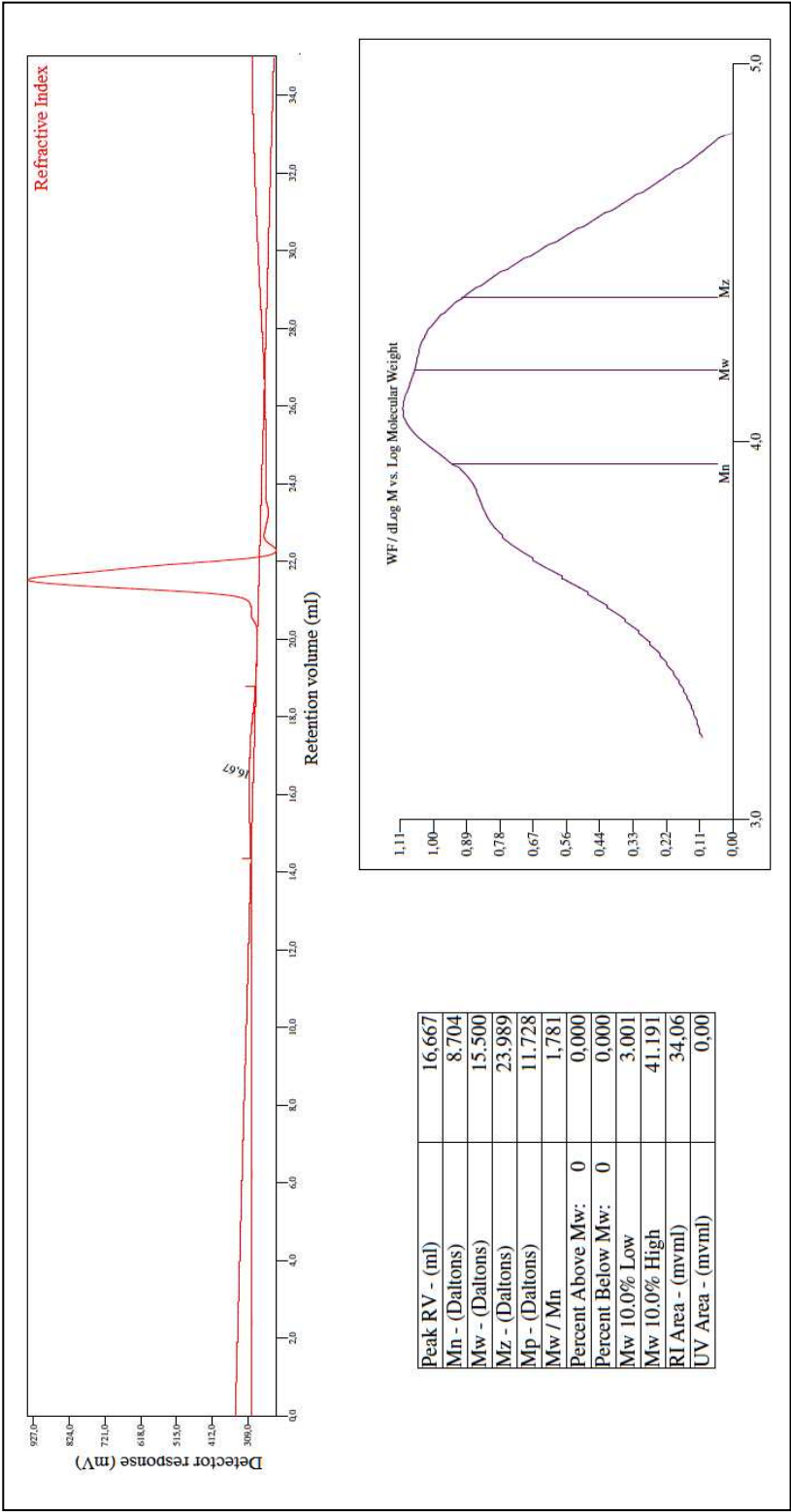
Resultados da análise de GPC do nanocompósito PLA/CLO30B após 15 dias de degradação em composto.



Resultados da análise de GPC do PLA após 30 dias de degradação em composto.



Resultados da análise de GPC do nanocompósito PLA/CLO20A após 30 dias de degradação em composto.



Resultados da análise de GPC do nanocompósito PLA/CLO30B após 30 dias de degradação em composto.

Glossário

Ação aneugênica: é caracterizada pela indução de quebras cromossômicas durante a divisão celular.

Ação clastogênica: decorre da inativação de estruturas citoplasmáticas da célula, como o fuso mitótico.

Anáfase: fase da mitose em que ocorre a migração das cromátides para os polos opostos.

Aneuploidia: corresponde às mudanças no número cromossômico de uma célula, resultando em ganho ou perda de um ou mais cromossomos durante o ciclo de divisão celular.

Ciclo celular: compreende os processos que ocorrem desde a formação de uma célula até sua divisão em duas células-filhas, todas iguais entre si. Consiste em duas etapas: a interfase, que ocorre entre duas divisões sucessivas, e a mitose, que é a divisão propriamente dita, seguida pela divisão do citoplasma, chamada citocinese.

Cromátide: os filamentos de DNA recebem essa designação nos cromossomos das células em divisão.

Cromatina: material internuclear da célula, constituído por DNA e proteínas; corresponde aos cromossomos da célula que não está em divisão.

Cromossomo: são resultantes da condensação da cromatina que ocorre durante a divisão celular.

Intérfase: período da vida da célula entre duas divisões mitóticas. Neste período a célula cresce e se prepara para a divisão.

Metáfase: fase da mitose caracterizada pela condensação máxima dos cromossomos e pelo alinhamento dos mesmos na região equatorial da célula.

Mitose: fase do ciclo celular durante a qual a célula se divide em duas células filhas, todas idênticas entre si.

Poliploidia: aumento no número cromossômico, dado pela multiplicação do conjunto cromossômico, dado pela multiplicação do conjunto cromossômico haploide.

Prófase: fase da mitose caracterizada pela condensação gradual de cromatina, inicialmente com 30 nm de diâmetro e muito alongadas, que vão progressivamente se tornando mais curtas e espessas até formar cromossomos.

Telófase: fase da mitose que se inicia quando as cromátides atingem os polos da célula. Nessa fase ocorre também é caracterizada pela descondensação da cromatina.