

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA**

ÁREA DE CONCENTRAÇÃO

CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE MATERIAIS

**“ESTUDO DA BIODEGRADAÇÃO DA BLENDA DE POLI (ϵ -
CAPROLACTONA) E AMIDO MODIFICADO EM MEIOS SÓLIDO E
LÍQUIDO”**

Autora: Pilar Drummond Sampaio Corrêa Mariani

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Lúcia Helena Innocentini Mei

Co-Orientadora: Profa. Dra. Elisa Espósito

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Engenharia Química como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Mestre em Engenharia Química.

Campinas – São Paulo

Maio/2005

**UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE**

UNIDADE	BC
Nº CHAMADA	Unicamp M337e
V	EX
TOMBO BC/	64483
PROC.	16-P-00086-05
C	<input type="checkbox"/>
D	<input checked="" type="checkbox"/>
PREÇO	11,00
DATA	22/06/05
Nº CPD	

Bibid: 354268

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

M337e Mariani, Pilar Drummond Sampaio Corrêa
Estudo da biodegradação da blenda de poli (ϵ -caprolactona) e amido modificado em meios sólido e líquido / Pilar Drummond Sampaio Corrêa Mariani.--Campinas, SP: [s.n.], 2005.

Orientadores: Lúcia Helena Innocentini Mei, Elisa Espósito

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química.

1. Biodegradação. 2. Polímeros – Biodegradação. 3. Mistura (Química). 4. Polissacarídeos. 5. Amido. I. Mei, Lúcia Helena Innocentini. II. Espósito, Elisa. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia Química. III. Título.

Titulo em Inglês: Study of biodegradation of Poly (ϵ -caprolactone) / modified starch blend in solid and liquid medium.

Palavras-chave em Inglês: Biodegradation, Polymers biodegradation, Blends, Polysaccharides e Starch.

Área de concentração: Ciência e tecnologia de Materiais

Titulação: Mestre em Engenharia Química

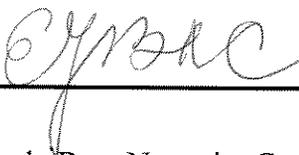
Banca examinadora: Elke Jurandy Bran Nogueira Cardoso e Leila Peres

Data da defesa: 06/05/2005

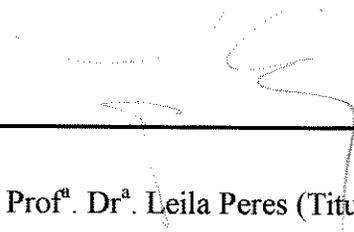
Dissertação de Mestrado defendida por Pilar Drummond Sampaio Corrêa Mariani e aprovada dia 06 de maio de 2005 pela banca examinadora constituída pelos doutores:



Prof.^a. Dr.^a. Lucia Helena Innocentini Mei (Orientadora)



Prof.^a. Dr.^a. Elke Jurandy Bran Nogueira Cardoso (Titular)



Prof.^a. Dr.^a. Leila Peres (Titular)

Este exemplar corresponde à versão final da Dissertação de Mestrado em Engenharia Química.



Prof^a. Dr^a. Lucia Helena Innocentini Mei

AGRADECIMENTOS

À professora Dra. Lucia Mei pela orientação, pelo incentivo, pela confiança depositada, pela atenção e sobre tudo pela consideração e amizade.

À professora Dra. Elisa Espósito pela co-orientação.

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

Ao instituto de Química - UNICAMP, na pessoa de Prof. Dr. Nelson Duran, por conceder o espaço de seu laboratório para a realização de parte deste trabalho.

Aos técnicos e amigos do DTP e LUC Rodolfo, Adriano e Kelly pela ajuda na realização das análises.

Aos técnicos e amigos do Laboratório de Microbiologia do Solo ESALQ/USP Denise, Fernando, Pereira e Fernanda pelo auxílio na realização dos experimentos, pela atenção e amizade.

Ao Wanderson pelo processamento dos filmes e ao Antônio pelo isolamento das bactérias e coleta do solo.

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

Aos meus amigos e companheiros de grupo Maria Gabriela, Giovana, Adriana, Livia, André e Clara obrigada pela amizade e companheirismo.

Ao meu marido Custódio que, mesmo passando por momentos difíceis, sempre me apoiou e me incentivou com muito amor, carinho, paciência e compreensão.

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

Ao CNPq pelo apoio financeiro a esta pesquisa.

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

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

A todos o meu muito obrigado.

Só tão alto quanto o que alcanço
 posso crescer,
Só tão longe quanto exploro
 posso chegar,
Só na profundidade para que olho,
 posso ver,
Só à medida que sonho
 posso ser.
(Karen Ravn)

ÍNDICE

ÍNDICE.....	VII
NOMENCLATURA E ABREVIACÕES.....	X
ÍNDICE DE FIGURAS	XII
ÍNDICE DE TABELAS.....	XIV
RESUMO.....	XV
ABSTRACT.....	XVI
CAPÍTULO 1 – INTRODUÇÃO E OBJETIVOS.....	17
1.1 - INTRODUÇÃO.....	17
1.2 - OBJETIVOS.....	18
CAPÍTULO 2 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	20
2.1 - HISTÓRICO	20
2.2 - POLÍMEROS BIODEGRADÁVEIS	21
2.3 - POLÍMEROS BIODEGRADÁVEIS NATURAIS.....	23
2.3.1 - AMIDO	23
2.3.2 - ESTRUTURA E PROPRIEDADES DO AMIDO	23
2.3.3 - APLICAÇÕES DO AMIDO	24
2.3.4 - AMIDO TERMOPLÁSTICO.....	25
2.3.5 - AMIDO MODIFICADO	25
2.3.5.1 - <i>Amido adapatado (6704)</i>	25
2.3.6 - MECANISMO DE BIODEGRADAÇÃO DO AMIDO	26
2.4 - POLÍMEROS SINTÉTICOS BIODEGRADÁVEIS.....	26
2.4.1 - POLI (ε - CAPROLACTONA): ESTRUTURA E PROPRIEDADES	26
2.4.2 - APLICAÇÕES DO POLI (ε - CAPROLACTONA)	27
2.4.3 - BIODEGRADAÇÃO DO PCL.....	27
2.5 - BLENDS BIODEGRADÁVEIS: PCL/AMIDO	28
2.5.1 - ASPECTOS ECONÔMICOS DAS BLENDS BIODEGRADÁVEIS	28
2.6 - PROCESSO DE BIODEGRADAÇÃO	29
2.6.1 - ETAPAS DO PROCESSO DE BIODEGRADAÇÃO	29

2.7 - MÉTODOS E TESTES PARA AVALIAÇÃO DA BIODEGRADAÇÃO DE PLÁSTICOS.....	30
2.7.1 - TESTES DE BIODEGRADAÇÃO PARA SIMULAÇÃO EM LABORATÓRIO.....	31
2.7.2 - TESTES EM MEIO SÓLIDO	32
2.7.2.1 - <i>Teste em solo</i>	32
2.7.2.2 - <i>Teste em composto</i>	32
2.7.2.3 - <i>Teste em meio líquido</i>	33
2.8 - ANÁLISE E CARACTERIZAÇÃO DA BIODEGRADAÇÃO.....	34
2.8.1 - RESPIROMETRIA.....	34
2.8.2 - GRAU DE BIODEGRADAÇÃO	35
2.8.3 - PROPRIEDADES MECÂNICAS X BIODEGRADAÇÃO.....	35
2.8.4 - CRISTALINIDADE E SUA AVALIAÇÃO.....	35
2.8.5 - MORFOLOGIA	36
CAPÍTULO 3 - MATERIAIS E MÉTODOS.....	37
3.1 - MATERIAIS	37
3.2 - COMPOSIÇÃO E PREPARO DOS FILMES.....	37
3.3 - ESTERILIZAÇÃO DOS FILMES.....	38
3.4 - SOLO	38
3.5 - TESTES DE BIODEGRADAÇÃO	38
3.5.1 - BIODEGRADAÇÃO EM SOLO	38
3.5.2 - DETERMINAÇÃO DA UMIDADE DO SOLO.....	39
3.5.3 - DETERMINAÇÃO DA CAPACIDADE DE RETENÇÃO MÁXIMA DE ÁGUA (MÉTODO DO FUNIL)	39
3.6 - DETERMINAÇÃO DO NÚMERO MAIS PROVÁVEL DE MICRORGANISMOS DO SOLO ..	40
3.7 - MÉTODO DA RESPIROMETRIA	41
3.7.1 - DETERMINAÇÃO DA MINERALIZAÇÃO	42
3.8 - BIODEGRADAÇÃO EM MEIO LÍQUIDO	43
3.8.1 - ISOLAMENTO DAS BACTÉRIAS	44
3.8.2 - PREPARO DO INÓCULO.....	44
3.8.3 - TESTE DE BIODEGRADAÇÃO.....	45
3.8.4 - COMPOSIÇÃO DOS MEIOS DE CULTURA UTILIZADOS	46
3.8.4.1 - <i>Meio mínimo mineral</i>	46
3.8.4.2 - <i>Meio ágar nutriente</i>	46
3.8.4.3 - <i>Meio de Martin</i>	46

3.8.4.4 – Meio caldo triptona de soja (TSB)	46
3.9 - DETERMINAÇÃO DA PERDA DE MASSA DOS FILMES	47
3.10 - CALORIMETRIA EXPLORATÓRIA DIFERENCIAL (DSC)	47
3.11 - MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV): ESTUDO DA MORFOLOGIA..	48
CAPÍTULO 4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO	49
4.1 -TESTE EM SOLO.....	49
4.1.2 – CARACTERIZAÇÃO VISUAL.....	49
4.1.3 – MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)	50
4.1.4 - MINERALIZAÇÃO– SOLO	51
4.1.5 - PERDA DE MASSA.....	53
4.1.6 – ANÁLISES TÉRMICAS	54
4.1.7 – NÚMERO MAIS PROVÁVEL DE MICROORGANISMOS	56
4.1.8 – FUNGOS IDENTIFICADOS	57
4.2 - TESTE EM MEIO LÍQUIDO.....	59
4.2.1 – CARACTERIZAÇÃO VISUAL	59
4.2.2 – PERDA DE MASSA.....	59
4.2.3 – MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)	61
CAPÍTULO 5 - CONCLUSÕES.....	67
CAPÍTULO 6 – SUGESTÕES.....	68
CAPÍTULO 7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	69
ANEXO I.....	74
ANEXO II.....	75
ANEXO III.....	76

NOMENCLATURA E ABREVIACÕES

Símbolo	Descrição	Unidade
ASTM	Sociedade Americana de Testes e Materiais	**
BaCl ₂	Cloreto de bário	**
BaCO ₃	Carbonato de bário	**
C	Carbono	**
CC	Capacidade de retenção máxima de água	%
CEN	Comitê Europeu de normas	**
CH ₄	Metano	**
CO ₂	Dióxido de carbono	**
DIN	Organização de padronização da Alemanha	**
DSC	Calorimetria exploratória diferencial	**
H ₂ O	Água	**
HCl	Ácido Clorídrico	**
ISO	Organização Internacional de padronização	**
KH ₂ PO ₄	Fosfato de potássio dibásico	**
KOH	Hidróxido de potássio	**
MEV	Microscopia eletrônica de varredura	**
Mf	Massa final	g
MgSO ₄ .7H ₂ O	Sulfato de magnésio hepta-hidratado	**
Mo	Massa inicial	g
MpCO ₂	Massa de dióxido de carbono produzido	g
Ms	Massa seca	g
MtCO ₂	Massa de dióxido de carbono teórico	g
Mu	Massa úmida	g
Na ₂ HPO ₄	Fosfato de sódio monobásico	**
NaOH	Hidróxido de sódio	**
NH ₄ Cl	Cloreto de amônio	**
NMP	Número mais provável	**
O ₂	Oxigênio	**
P	Probabilidade estatística	**

NOMENCLATURA E ABREVIÇÕES

Símbolo	Descrição	Unidade
ASTM	Sociedade Americana de Testes e Materiais	**
BaCl ₂	Cloreto de bário	**
BaCO ₃	Carbonato de bário	**
C	Carbono	**
CC	Capacidade de retenção máxima de água	%
CEN	Comitê Europeu de normas	**
CH ₄	Metano	**
CO ₂	Dióxido de carbono	**
DIN	Organização de padronização da Alemanha	**
DSC	Calorimetria exploratória diferencial	**
H ₂ O	Água	**
HCl	Ácido Clorídrico	**
ISO	Organização Internacional de padronização	**
KH ₂ PO ₄	Fosfato de potássio dibásico	**
KOH	Hidróxido de potássio	**
MEV	Microscopia eletrônica de varredura	**
Mf	Massa final	g
MgSO ₄ .7H ₂ O	Sulfato de magnésio hepta-hidratado	**
Mo	Massa inicial	g
MpCO ₂	Massa de dióxido de carbono produzido	g
Ms	Massa seca	g
MtCO ₂	Massa de dióxido de carbono teórico	g
Mu	Massa úmida	g
Na ₂ HPO ₄	Fosfato de sódio monobásico	**
NaOH	Hidróxido de sódio	**
NH ₄ Cl	Cloreto de amônio	**
NMP	Número mais provável	**
O ₂	Oxigênio	**
P	Probabilidade estatística	**

PADs	Polímeros ambientalmente degradáveis	**
PCL	Poli (ϵ - caprolactona)	**
PE	Polietileno	**
pH	Potencial hidrogeniônico	**
PHAs	Polihidroxialcanoatos	**
PP	Polipropileno	**
Tc	Temperatura de cristalização	°C
Tf	Temperatura de fusão	°C
Tg	Temperatura de Transição Vítreas	°C
TPS	Amido termoplástico	**
TSB	Caldo triptico de soja	**
U	Porcentagem de Umidade	%
v/v	Volume por volume	mL
Xc	Porcentagem de cristalinidade	%
$\Delta H_{f100\%c}$	Varição da entalpia de fusão padrão	J/g
ΔH_f	Varição da entalpia de fusão	J/g

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura da amilose: Unidades de glicose unidas por ligações glicosídicas α 1,4.	24
Figura 2 - Estrutura da amilopectina: Unidades de glicose unidas por ligações glicosídicas α 1,4 e com pontos de ramificação α 1,6.....	24
Figura 3 - Hidrólise enzimática do amido.....	26
Figura 4 - Fórmula estrutural do Poli (ϵ - caprolactona)	27
Figura 5 - Reação de hidrólise da ligação éster.....	27
Figura 6 -Degradação polimérica em ambientes aeróbio (a) e anaeróbio (b).....	29
Figura 7 – Representação esquemática do método de gotas.....	41
Figura 8 – Representação esquemática da obtenção do inóculo.....	45
Figura 9 - Avaliação do aspecto visual dos filmes de PCL/AA e PCL durante incubação em solo agrícola, 28 °C. (a) Filme de PCL/AA durante biodegradação; (b) Filme de PCL durante biodegradação.....	49
Figura 10 - Fotomicrografias da blenda PCL/AA após incubação em solo agrícola, 28 °C, aumento de 500x. (a) Filme antes da incubação no solo (t=0 dias); (b) Filme após período de 28 dias de incubação no solo; (c) Filme após período de 56 dias de incubação no solo; (d) Filme após período de 90 dias de incubação no solo.....	50
Figura 11 - Fotomicrografias do filme de PCL após incubação em solo agrícola, 28 °C, aumento de 500x.(a) Filme antes da incubação no solo (t=0 dias); (b) Filme após período de 28 dias de incubação no solo; (c) Filme após período de 56 dias de incubação no solo; (d) Filme após período de 90 dias de incubação no solo.....	51
Figura 12 - Mineralização dos filmes de PCL, PCL/AA e AA durante 90 dias de incubação em solo agrícola, 28 °C.	53
Figura 13 - Porcentagem de cristalinidade dos filmes de PCL e PCL/AA em relação ao período de incubação no solo agrícola, 28 °C.	56
Figura 14 - Avaliação do aspecto visual do filme de PCL/AA durante incubação em meio mínimo mineral (28 °C, 175 rpm) . (a) Filme de PCL/AA durante o período de incubação com o inóculo 1; (b) Filme de PCL/AA durante o período de incubação com o inóculo 2.....	59

Figura 15 - Fotomicrografias da blenda PCL/AA em MEV, aumento de 500x. (a) Filme antes dos testes (t=0 dia); (b) Meio líquido com inóculo 1, t=28 dias; (c) Meio líquido com inóculo 2, t=28 dias; (d) Controle negativo em meio líquido, t=28 dias.....61

Figura 16 - Fotomicrografias da blenda PCL/AA em MEV, aumento de 500x. (a) Meio líquido com inóculo 1, t=56 dias; (b) Meio líquido com inóculo 2, t=56 dias; (c) Controle negativo em meio líquido, t=56 dias.62

Figura 17 - Fotomicrografias do polímero PCL em MEV, aumento de 500x. (a) Filme antes dos testes (t=0 dias); (b) Teste em meio líquido com inóculo 1, t=28 dias; (c) Teste em meio líquido com inóculo 2, t=28 dias; (d) Controle negativo em meio líquido, t=28 dias.63

Figura 18 - Fotomicrografias do polímero PCL em MEV, aumento de 500x. (a) Meio líquido com inóculo 1, t=56 dias; (b) Meio líquido com inóculo 2, t=56 dias; (c) Controle negativo em meio líquido, t=56 dias.64

Figura 19 - Porcentagem de cristalinidade dos filmes de PCL e PCL/AA em relação ao período de incubação em meio líquido e inóculo.66

Figura 20 – Curvas térmicas referentes aos filmes incubados por 28, 56 e 90 dias em solo agrícola, 28 °C. (a) PCL; (b) PCL/AA.....76

Figura 21 - Curvas térmicas referentes aos filmes incubados por 28, 56 e 90 dias em meio líquido, 28 °C, 175 rpm. (a) PCL; (b) PCL/AA.....77

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 - Composição da blenda PCL/Amido adipatado.....	37
Tabela 2 - Porcentagem de mineralização dos filmes de PCL, PCL/AA e Amido adipatado, em função do tempo de incubação em solo agrícola, 28 °C.....	52
Tabela 3 - Porcentagem de perda de massa média dos filmes de PCL e PCL/AA em função do tempo de incubação e filme.	54
Tabela 4 - Propriedades térmicas dos filmes de PCL e PCL/AA em relação ao período de incubação em solo agrícola, 28 °C.....	55
Tabela 5 - Número mais provável de microrganismos do solo após a biodegradação da blenda de PCL/AA.....	57
Tabela 6 - Análises Químicas do solo agrícola antes e após a biodegradação da blenda de PCL/AA.....	58
Tabela 7 - Porcentagem de perda de massa média dos filmes de PCL e PCL/AA em função do inóculo, tempo de incubação e tipo de polímero.	60
Tabela 8 - Propriedades térmicas dos filmes de PCL e PCL/AA em relação ao período de incubação em meio líquido e inóculo	65
Tabela 9 – Tabela de probabilidade de ocorrência (Tabela de McCrady) utilizada na determinação do número mais provável de microrganismos.	75

RESUMO

A consciência ambiental crescente, somada às políticas de gerenciamento de resíduos sólidos, tem impulsionado o desenvolvimento de materiais biodegradáveis para a substituição parcial dos plásticos de origem petroquímica em algumas áreas estratégicas, como a de embalagens.

No presente trabalho, avaliou-se a biodegradabilidade da blenda de PCL/Amido adipatado em solo, de acordo com a norma ASTM D5988-96 e Anderson *et al.* (1982); e em meio líquido, de acordo com a norma ASTM 6691-01 e Mergaert *et al.* (2000).

No teste realizado em solo, a biodegradação foi acompanhada pela determinação da porcentagem de mineralização, através da medida da produção do dióxido de carbono e da perda de massa. No meio líquido, a biodegradação foi determinada somente pela perda de massa. O acompanhamento das alterações na cristalinidade da blenda foi feito em ambos os testes através de Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC).

Foi verificado que a blenda atingiu 70% de mineralização após 90 dias de incubação no solo. De acordo com a norma ASTM D 6400, esse valor permite concluir que a blenda é biodegradável. Por sua vez, a perda de massa da blenda incubada no solo foi maior do que no meio líquido, mostrando que a biodegradação no solo é bastante eficiente.

Palavras-chave: Biodegradação, Blendas, Poli (ϵ - caprolactona), Amido adipatado.

ABSTRACT

Increasing environmental concerns and the waste management policies in the last decade have prompted the use of natural-based biodegradable materials instead of nonbiodegradable petrochemical-based plastics.

The present work investigated the biodegradation in soil of a PCL/Starch-adipate blend, a natural-based material, according to the ASTM D5988-96 standard and Anderson (1982). Furthermore, it was investigated the biodegradation of this material in liquid medium, according to the ASTM 6691-01 standard and Mergaert *et al.* (2000).

During the soil tests, the biodegradation was indicated by CO₂ evolution and mass loss measurements. In the liquid medium, the biodegradation was indicated by mass loss measurements only. Differential Scanning Calorimetry (DSC) was used to follow the crystallinity change in samples treated in liquid and solid medium.

It was observed that the blend reached 70% of mineralization after 90 days of soil incubation. According to the ASTM D 6400, this is a strong indication that the blend is biodegradable. The mass loss of the blend sample incubated in soil was higher than for the sample incubated in liquid medium, showing that the biodegradation in soil was very efficient.

Keywords: Biodegradation, Blends, Poly (ϵ - caprolactone), Starch-adipate.

CAPÍTULO 1 – INTRODUÇÃO E OBJETIVOS

1.1 - Introdução

Os plásticos têm ganhado cada vez mais espaço no mercado devido à sua versatilidade, a qual garante seu uso nas mais diversas formas para diferentes finalidades. Na área alimentícia, por exemplo, as embalagens plásticas, em franca expansão, garantiram um espaço notável.

Na maioria dos casos, durabilidade e resistência à degradação são propriedades desejáveis quando os plásticos estão em uso; entretanto, a resistência do plástico por longo período, quando descartado, causa sérios danos ao ambiente. Ao serem depositados em aterros e lixões, eles formam uma camada impermeável no solo, que prejudica a degradação de outros materiais, além de contribuírem para o aumento do volume de lixo sólido.

Este fato motivou o deputado estadual Giovani Cherini a apresentar o projeto de lei número 119/2004, em abril de 2004, que dispõe sobre a proibição por todo território Gaúcho, da utilização de embalagens plásticas à base de polietileno (PE); polipropileno (PP) e de polietileno tereftalato (PET), no acondicionamento de bebidas, alimentos e cosméticos. As embalagens substituintes devem ser de plásticos biodegradáveis.

Estes projetos de substituição dos plásticos não biodegradáveis, aliados à consciência ambiental e às novas políticas de gerenciamento e disposição de resíduos, têm direcionado os estudos para a produção de plásticos ambientalmente degradáveis (PADs) (Yavuz e Babaç, 2003).

Os PADs são polímeros naturais ou sintéticos, que podem ser obtidos através de fontes renováveis e não renováveis. Sua principal característica é a de sofrer alterações nas suas estruturas química e física, sob o ataque de microrganismos após o seu descarte no ambiente.

Da família dos polímeros sintéticos biodegradáveis, o poli (ϵ -caprolactona) - (PCL) tem despertado especial interesse na substituição de polímeros não biodegradáveis, devido às suas características físicas, compatibilidade com outros materiais e disponibilidade comercial (Singh *et al.*, 2003).

Tentativas de combinar o PCL com polímeros naturais tais como o amido, têm sido realizadas com o intuito de criar um material economicamente viável, com boas propriedades físicas e que seja completamente biodegradável (Wu, 2003). Além disso, a substituição de parte da resina por amido leva à economia de insumos derivados de fontes fósseis, ao mesmo tempo em que incentiva o uso de fontes renováveis e acelera a biodegradação do produto final.

O amido, considerado a segunda maior biomassa produzida na natureza, é encontrado em vegetais como uma reserva de carboidratos. Em condições naturais, o amido é encontrado na forma de grânulos e é composto de aproximadamente 20% de amilose e 80% de amilopectina.

Com base na disponibilidade, no baixo custo e na conhecida biodegradabilidade, o amido tem sido utilizado, há décadas, como aditivo em polímeros sintéticos. Desta forma, vem sendo incorporado ao PCL na produção de blendas e compósitos biodegradáveis; como, por exemplo, o Mater-Bi[®], produzido pela Empresa Novamont, em Novara/Itália.

A crescente demanda por materiais biodegradáveis tem tornado indispensável o conhecimento completo do processo de biodegradação e do termo biodegradável. Por si só, este termo não garante que o material será degradado em qualquer ambiente, uma vez que os ambientes biologicamente ativos abrangem diferentes organismos e, por sua vez, diferentes sistemas enzimáticos. Por isso, a reprodução exata do meio natural em escala laboratorial torna-se difícil, sendo necessário o uso de testes padronizados, simulando as condições naturais. Para que um determinado material seja considerado biodegradável, este deve passar por estes testes padronizados, que simulam diversos ambientes, junto com um acompanhamento completo do processo sofrido pelo material, para se verificar o grau de biodegradação em um determinado período e a presença de recalcitrantes.

1.2 - Objetivos

O objetivo geral deste trabalho foi o de nuclear um grupo de pesquisa, com especialistas de reconhecida capacidade na área (ESALQ, UNICAMP, UMC) e o de formar recursos humanos especializado em biodegradação de polímeros ambientalmente

degradáveis (PADs), no Departamento de Tecnologia de Polímeros da FEQ. Os objetivos específicos deste trabalho foram:

- Avaliar a biodegradação da blenda composta por poli (ϵ -caprolactona)/ amido adipatado, em solo agrícola, por meio de perda de massa e do método da respirometria, seguindo a Norma ASTM D 5988 – 96 e metodologia proposta por Anderson (1982). Essa blenda foi anteriormente estudada por outros alunos do Grupo de Polímeros Ambientalmente Degradáveis da Profa. Lucia Mei (Freitas, 2004; Wanderson Bueno, em andamento).
- Avaliar através da perda de massa, a biodegradação da blenda em meio líquido, seguindo a norma ASTM D 6691 – 96 e metodologia proposta por Mergaert *et al.* (2000) com bactérias isoladas de solo agrícola.
- Caracterização da biodegradação na superfície dos filmes de PCL e PCL/Amido de milho adipatado por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), após períodos pré-determinados de incubação em solo e meio líquido.
- Caracterização da alteração na cristalinidade (X_c), na temperatura de fusão e na entalpia de fusão dos filmes de PCL e PCL/Amido adipatado, por Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) durante os ensaios de biodegradação.

CAPÍTULO 2 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 - Histórico

Os plásticos apresentam diversas vantagens em relação a outros materiais; dentre elas, pode-se citar: baixo peso, durabilidade e versatilidade (Chiellini, 2002). Suas características físicas e econômicas ajudaram a popularizar sua aplicação e, por isso, são encontrados em quase todos os setores da economia, tais como: construção civil, agricultura, calçados, móveis, alimentos, têxtil, lazer, telecomunicações, eletroeletrônicos, automobilísticos, médico-hospitalar, e no setor de distribuição de energia (Plastivida, 07/01/2004).

A versatilidade dos materiais poliméricos tornou-os indispensáveis no cotidiano das pessoas, nas mais diversas áreas. Para se ter uma idéia, o consumo *per capita* de plástico no Brasil, em 2002, foi de 21,7 kg (Cherini, 2004).

No entanto, a crescente demanda por materiais poliméricos, principalmente na área de embalagens, tem como conseqüência um aumento descontrolado na produção de lixo plástico. De acordo com Chiellini (2002), cerca de 30% do lixo mundial vem dessa origem (Chiellini, 2002). Sabe-se que determinados plásticos, principalmente aqueles produzidos através de fontes não renováveis como o petróleo, são os que mais poluem o meio ambiente, visto que a sua completa fragmentação pode levar de 100 até 400 anos. (Cherini, 2004).

Desde 1970, quando ocorreu a primeira crise do petróleo, as indústrias estudam meios de produzir plásticos a partir de fontes renováveis. Nas décadas de 1980 e 1990, ocorreu a chamada crise, ou saturação, dos aterros e lixões. Desde então, a conscientização da sociedade, aliada às novas políticas de disposição e gerenciamento de lixo, tem direcionado as pesquisas para a criação de produtos e processos ambientalmente compatíveis.

Dentre os processos encontram-se a reciclagem; a incineração; o depósito em aterros; a compostagem e a biodegradação. Quanto aos produtos, pode-se citar: polímeros recicláveis; polímeros incineráveis; polímeros degradáveis; polímeros biodegradáveis

(PAD) e polímeros compostáveis, além dos polímeros híbridos (Blendas e compósitos biodegradáveis) (Chiellini, 2002).

Dados obtidos por Amass *et al.* (1998) sobre as estratégias mais utilizadas na redução do lixo plástico, no ano de 1995 na Europa, apontam que os aterros são responsáveis por 70,7% deste lixo, seguido pela prática da incineração que responde por cerca de 20 %, sendo 16,8% convertido em energia. Por fim, a reciclagem responde pela recuperação de 8,2 % do lixo plástico, enquanto que 1,1% é exportado para a recuperação. É fato notório que o volume de plástico disposto em aterro é muito grande, devido ser esta a melhor saída para atender às limitações das outras técnicas, por diversos fatores. A incineração, por exemplo, possui o problema da emissão de gases em países com limitações tecnológicas para recuperá-los e reutilizá-los. A reciclagem, por sua vez, tem crescido rapidamente em países emergentes, como o Brasil, onde a geração de empregos é um fato a se considerar; porém, ainda existe o limite pela legislação para a utilização de plásticos reciclados para embalagens, em contato direto com alimentos. Essas limitações fizeram surgir o desenvolvimento de outras estratégias, em que o processo de biodegradação veio para atender ao forte apelo ambiental dos últimos tempos. Assim, os polímeros ambientalmente degradáveis (PADs) adquiriram grande importância, visto que reduzem naturalmente o resíduo plástico do ambiente, além de proporcionarem benefícios como: desenvolvimento de tecnologias sustentáveis para o futuro; conservação de recursos fósseis; redução na dependência de importações de matérias-primas; incentivo ao cultivo de recursos renováveis; uso de sobras e resíduos de produção de alimentos (Ibaw, 2004).

2.2 - POLÍMEROS BIODEGRADÁVEIS

Polímeros biodegradáveis, sintéticos ou naturais, possuem grande capacidade de degradação por meio de processos naturais, onde os produtos de degradação são reaproveitados no ambiente através dos ciclos elementares como: ciclo do carbono, nitrogênio e enxofre (Chandra e Rustgy, 1998). Existem hoje várias definições para estes polímeros, as quais são elaboradas pelos grupos de pesquisa ligados ao desenvolvimento de normas. Tais normas são necessárias e têm sido adotadas no mundo todo, para o acompanhamento padronizado da biodegradação. Dentre as mais conhecidas, citam-se:

➤ **Norma ISO 472:1988**

Um plástico biodegradável é aquele conhecido por sofrer alterações significantes na sua estrutura química, sob condições ambientais específicas, resultando na perda de algumas propriedades que podem ser avaliadas através das variações nas medidas realizadas por normas, métodos e testes padronizados. A alteração na estrutura química é resultado da ação dos microrganismos de ocorrência natural.

➤ **Proposta do sub-Comitê da ASTM D20.96**

Plásticos degradáveis são materiais que sofrem quebra das ligações na cadeia principal do polímero, através de forças químicas, biológicas e/ou físicas no ambiente, a uma taxa que resulta na fragmentação ou desintegração dos plásticos.

➤ **Proposta da sociedade Japonesa de Polímeros Biodegradáveis**

Plásticos biodegradáveis são materiais poliméricos que se transformam em compostos de baixo peso molecular, através de um processo de degradação, em que pelo menos um passo seja por meio de metabolismo na presença de organismos de ocorrência natural.

➤ **DIN 103.2 (grupo de trabalho em polímeros biodegradáveis)**

Biodegradação de um plástico é um processo que resulta em produtos metabólitos finais de ocorrência natural.

Atualmente tem sido feito um esforço para que estas normas possam ser reconhecidas no mundo todo, ficando a critério do usuário definir qual delas irá utilizar para desenvolver seus testes.

2.3 - Polímeros biodegradáveis naturais

Conhecidos também como biopolímeros, são sintetizados por diversos ciclos da natureza por meio de reações de polimerização ou catálise enzimática, no interior de células, por processos metabólicos complexos (Chandra e Rustgy, 1998).

Podem ser processados e transformados normalmente como os demais termoplásticos, na forma de compostos, blendas e compósitos, definidos no anexo I desta dissertação.

Citam-se abaixo as principais classes de polímeros naturais e alguns exemplos:

- **Polissacarídeos:** Amido, Celulose, Quitina, Quitosana, Ácido algínico, outros.
- **Polipeptídeos de origem natural:** Gelatina, Caseína, Albumina, Fibrinogênio, outros.
- **Poliésteres Bacterianos:** Família dos Poli (hidroxialcanoatos) (PHAs).

2.3.1 - Amido

O amido vem sendo alvo de muitos estudos na área de materiais poliméricos por ser matéria prima abundante de fonte renovável, de baixo custo e totalmente biodegradável. É encontrado como fonte de reserva de carboidratos, em plantas como a batata, a mandioca, o milho e o arroz, entre outras (Bastioli, 1995).

2.3.2 - Estrutura e propriedades do amido

O amido nativo é um homopolímero formado por unidades de glicose, encontrado na forma granular semicristalina. É uma combinação física de duas estruturas, amilose e amilopectina. Em ambas, as unidades de glicose são unidas por ligações glicosídicas α 1,4, como mostra a Figura 1. A amilose é uma molécula essencialmente linear; enquanto que, a amilopectina contém cerca de 5% de ramificações α 1,6, como ilustrado na Figura 2. As cadeias ramificadas da amilopectina estão presentes na forma de dupla hélice resultando em estruturas cristalinas (Jane, 1995).

O peso molecular da amilose varia entre 0,2 e 2 milhões e o da amilopectina entre 100 e 400 milhões (Bastioli, 1995).

A origem botânica e genética do amido altera a quantidade e o comprimento das cadeias ramificadas, a estrutura química e as propriedades funcionais. Grãos de amido de milho, por exemplo, contém aproximadamente 30% de amilose e 70% de amilopectina (Avella *et al.*, 2001).

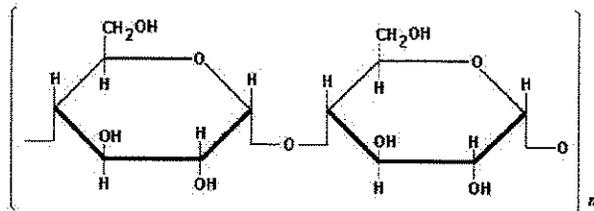


Figura 1 - Estrutura da amilose: Unidades de glicose unidas por ligações glicosídicas α 1,4.

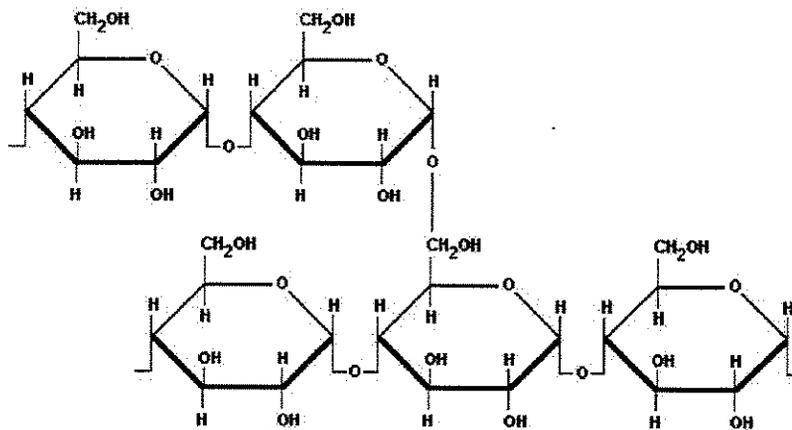


Figura 2 - Estrutura da amilopectina: Unidades de glicose unidas por ligações glicosídicas α 1,4 e com pontos de ramificação α 1,6.

2.3.3 - Aplicações do amido

O amido pode ser utilizado na forma granular, natural ou modificada, ou transformado em amido termoplástico, podendo ser processado sozinho ou em combinação com um polímero sintético (Bastioli, 1995).

O grão de amido, na sua forma natural, pode ser incorporado a uma matriz polimérica, atuando como carga. Os plásticos a base de amido podem conter de 10 a 90%

do biopolímero, e conforme esta quantidade aumenta, os compósitos se tornam mais biodegradáveis reduzindo a liberação de resíduos recalcitrantes. É muito empregado em filmes na agricultura ou em sacolas de supermercados (Chandra e Rustgy, 1998).

2.3.4 - Amido termoplástico

O amido termoplástico (TPS) é obtido por meio de um processo chamado gelatinização (Averous *et al.*, 2000). Esse processo envolve a destruição da estrutura cristalina dos grãos através de pressão, aquecimento, forças mecânicas e plastificantes, tais como: água, glicerina e óleos vegetais, entre outros (Bastioli, 1995). O TPS tem caráter altamente hidrofílico. Pode ser utilizado na composição de blendas com outros polímeros, sintéticos ou naturais (Baltieri, Bartoli e Mei 2003).

2.3.5 - Amido modificado

O termo amido modificado é utilizado para representar as modificações que podem alterar a estrutura química de algumas das unidades D-glicose na molécula de amido. A modificação da estrutura química pode ser obtida através de diversos métodos, com o objetivo de melhorar algumas propriedades como, por exemplo, a pouca estabilidade térmica causada pela absorção de água, difícil processabilidade e propriedades mecânicas pobres. Essas propriedades podem ser alteradas através de modificações químicas, físicas e enzimáticas (Jane, 1995). Dentre as alterações químicas, as mais comuns são: hidrólise, oxidação, reticulação e substituição. A reticulação é uma das tecnologias mais empregadas, sendo realizada por meio de um reagente com dois, ou mais grupos funcionais, capazes de reagir com pelo menos dois grupos hidroxilas das cadeias de amido, causando uma ligação entre eles (Mali e Grossmann, 2001).

2.3.5.1 - Amido adipatado (6704)

Ao reagir o amido com ácido adípico (ácido hexanodióico), obtém-se como produto final uma estrutura reticulada. Essa alteração na estrutura do amido aumenta a estabilidade térmica, diminui a retenção de água e também facilita a mistura com outros polímeros sintéticos, como no caso da produção de blendas (Mali e Grossmann, 2001).

2.3.6 - Mecanismo de biodegradação do amido

O amido pode sofrer hidrólise na presença de ácidos ou enzimas. A enzima extracelular, responsável pela cisão das ligações α 1,4 das moléculas de amilose e amilopectina, é a amilase, como mostra a Figura 3; por sua vez, as ligações α 1,6 são quebradas pela enzima glucosidase (Chandra e Rustgy, 1998).

A reação de hidrólise do amido pode ser conduzida por diferentes vias e gerar diferentes subprodutos, de acordo com a enzima utilizada. Enquanto a hidrólise ácida produz uma mistura de sacarídeos, as enzimas geram produtos mais específicos. A β – amilase, por exemplo, produz unidades de maltose, enquanto a amiloglucosidase produz unidades D-glicose (Merck & Co, 1968)

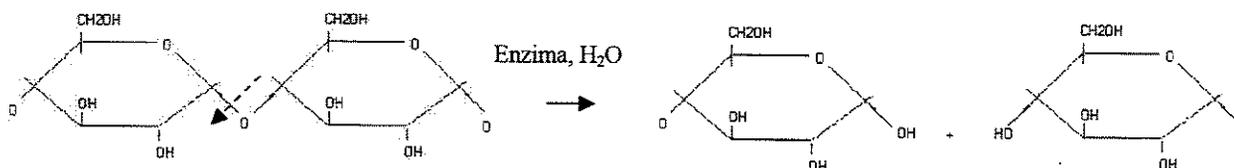


Figura 3 - Hidrólise enzimática do amido.

2.4 - Polímeros sintéticos biodegradáveis

Os polímeros sintéticos biodegradáveis possuem grupos hidrolisáveis na cadeia principal. Estes grupos, também conhecidos como sítios ativos, são reconhecidos e atacados pelas enzimas e, neste momento, se inicia a degradação (Chandra e Rustgy, 1998).

Dentre muitos polímeros sintéticos biodegradáveis, pode-se citar:

- **Poliésteres:** $\sim\sim\sim\text{COO}\sim\sim\sim$
- **Poliamidas:** $\sim\sim\sim\text{CONH}\sim\sim\sim$
- **Poliuretanos / Poliuréias:** $\sim\sim\sim\text{NHCOO}\sim\sim\sim / \sim\sim\sim\text{CONH-R}_1\text{NHCOOR}_2\sim\sim\sim$

2.4.1 - Poli (ϵ - caprolactona): estrutura e propriedades

O poli (ϵ - caprolactona), também conhecido como PCL, é um polímero sintético, de caráter hidrofóbico, muito conhecido pela sua biodegradabilidade e habilidade em formar blendas com outros polímeros (Amass *et al.*, 1998).

O PCL pertence à família dos poliésteres alifáticos, sendo sintetizado por meio de polimerização por abertura de anel de ϵ - caprolactona, para obtenção da unidade repetitiva. O polímero é semicristalino e seu peso molecular pode variar de 5.000 a 80.000. Possui baixa temperatura de fusão ($T_f = 60\text{ }^\circ\text{C}$) e a sua temperatura de transição vítrea ocorre bem abaixo da temperatura ambiente ($T_g = -60\text{ }^\circ\text{C}$). A fórmula estrutural do PCL está ilustrada na Figura 4.

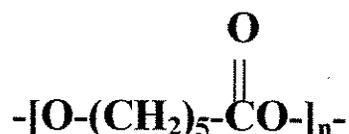


Figura 4 - Fórmula estrutural do Poli (ϵ - caprolactona)

2.4.2 - Aplicações do poli (ϵ - caprolactona)

O PCL possui várias aplicações, dependendo do peso molecular. Os oligômeros são utilizados na indústria de poliuretano; enquanto que, o PCL de alto peso molecular possui uma grande faixa de aplicação, devido ao seu fácil processamento, à sua alta compatibilidade com outros polímeros e à sua biodegradabilidade. Normalmente é empregado na indústria de termoplásticos (Solvay, 1998).

2.4.3 - Biodegradação do PCL

O Poli (ϵ - caprolactona) é biodegradado pela lipase, enzima catalítica responsável pela hidrólise das ligações éster. A lipase originada da bactéria *Pseudomonas* sp. é capaz de degradar tanto a fase amorfa quanto a fase cristalina do PCL (Hakkarainen e Albertsson, 2002). Quando enterrado em solo, ou lodo ativado, apresenta uma rápida perda de massa, o que indica um mecanismo de quebra aleatória de cadeia. (Amass *et al.*, 1998). A Figura 5 ilustra uma reação de hidrólise de ligação éster.



Figura 5 - Reação de hidrólise da ligação éster

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SECÇÃO CIRCULANTE

2.5 - Blendas biodegradáveis: PCL/Amido

A produção de blendas, formadas a partir de polímeros biodegradáveis, tem a finalidade de melhorar propriedades físicas, químicas e mecânicas; aumentar a taxa de biodegradação, e reduzir o custo total do material, visto que o alto custo é um dos maiores empecilhos na substituição dos polímeros petroquímicos por polímeros biodegradáveis, na área de embalagens (Ishiaku *et al.*, 2002).

O amido, como já visto, é um polímero natural e abundante, porém, possui algumas características negativas que impedem sua utilização na produção de plásticos, tais como: baixas propriedades mecânicas e pouca estabilidade térmica. Com o intuito de reduzir estas desvantagens e manter suas características de biodegradação, o amido tem sido normalmente misturado a um polímero sintético biodegradável como, por exemplo, o poli (ϵ - caprolactona) (Yavuz e Babaç, 2003). O PCL possui boas propriedades físicas e é facilmente compatível com outros polímeros, entretanto, sua biodegradação ocorre lentamente. Segundo pesquisas já realizadas (Averous *et al.*, 2000), quando o PCL é combinado com o amido termoplástico, ocorre um aumento aparente na sua taxa de biodegradação. A resposta para este fato veio de um estudo realizado por Bastioli (1995), a qual verificou que o amido é responsável pelo aumento da superfície de ataque dos microrganismos e, no caso do amido granular, o consumo microbiano deste leva ao aumento da porosidade, causando a perda da integridade da matriz polimérica.

Algumas blendas com base em amido e poli (ϵ -caprolactona) comercializadas são: Mater-Bi[®], produzido pela Novamont – Itália, e Bioplast, fabricado pela Biotec na Alemanha (Averous *et al.*, 2000).

2.5.1 - Aspectos econômicos das blendas biodegradáveis

O alto custo dos polímeros sintéticos biodegradáveis pode ser reduzido significativamente com a adição de polímeros naturais. Cerca de 50% de um poliéster sintético, a um custo de US \$ 4.00/kg, pode ser substituído por polímeros naturais como o amido, por aproximadamente US \$ 1.50/kg (Nolan - Itu, 2002).

2.6 - Processo de biodegradação

Em geral, o processo de biodegradação pode ser definido como: “fragmentação com perdas das propriedades mecânicas, ou modificações químicas através da ação de microrganismos”. A partir de meados da década de 90, esta definição vem sofrendo algumas modificações, visando não apenas o grau de biodegradação, mas também o impacto que os produtos decorrentes da degradação podem causar ao ambiente (Grima *et al.*, 2000).

A biodegradação pode ocorrer tanto em meios líquidos, como em meios sólidos, através de diferentes microrganismos, como as bactérias e os fungos. Estes microrganismos, nos diferentes meios, podem realizar a degradação na presença ou na ausência de oxigênio, processos conhecidos como aeróbio e anaeróbio, respectivamente, esquematizados na Figura 6 que segue:

(a) Condições aeróbias:



(b) Condições anaeróbias:

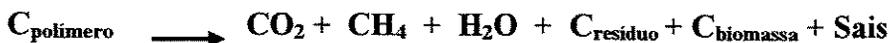


Figura 6 -Degradação polimérica em ambientes aeróbio (a) e anaeróbio (b).

2.6.1 - Etapas do processo de biodegradação

A biodegradação pode ser precedida de processos de degradação físicos e/ou químicos, como no caso de polímeros inertes ao ataque dos microrganismos. Nesse caso, para que o seu carbono se torne disponível, promove-se inicialmente sua fragmentação por reações abióticas, dentre elas, pode-se citar a fotodegradação por luz natural, a oxidação por aditivos químicos, a degradação térmica e a degradação mecânica (Scott, 1995).

Quando não há a fragmentação abiótica inicial, o processo de biodegradação pode ser dividido em duas etapas (Grima *et al.*, 2000):

1) Fragmentação:

Nesta etapa, ocorre a formação de colônias dos microrganismos na superfície do polímero. Estes, por sua vez, liberam enzimas extracelulares que reconhecem o substrato através de um sítio ativo específico (região onde se inicia a interação entre a enzima e o substrato), causando a decomposição das macromoléculas em cadeias menores (oligômeros). As enzimas extracelulares envolvidas nesta etapa são classificadas em endoenzimas (responsáveis pela clivagem aleatória das ligações internas das cadeias poliméricas) e exo-enzimas (responsáveis pela clivagem sequencial das ligações a partir das unidades monoméricas terminais da cadeia principal).

Essa primeira etapa pode ser acompanhada pela erosão da superfície do material.

2) Mineralização:

Os oligômeros, cadeias de baixo peso molecular, são transportados para o interior das células microbianas onde são bioassimilados. O processo de mineralização se completa pela produção de gases (CO₂, CH₄), água, sais minerais e biomassa. Para que a biodegradação seja completa, os organismos devem possuir via metabólica apropriada para o polímero específico, permitindo assim uma perfeita interação enzima-substrato. O ambiente onde ocorrerá o processo deve ser propício para o desenvolvimento de microrganismos, onde temperatura, umidade, pH e O₂ são fatores importantes. A estrutura do polímero também pode influenciar no grau e na velocidade da biodegradação, dependendo de características como: ligações químicas hidrolisáveis, grau e tipo de ramificação, grau de polimerização, caráter hidrofílico - hidrofóbico, distribuição do peso molecular, cristalinidade, e outros aspectos da morfologia.

2.7 - Métodos e testes para avaliação da biodegradação de plásticos

Com a crescente produção de materiais biodegradáveis, muitos testes simulando ambientes naturais foram adaptados para escala laboratorial. Diversas normas também foram criadas, para que certo padrão mundial fosse mantido ao testar estes materiais.

Na década de 90, os primeiros métodos padronizados dedicados à avaliação de plásticos biodegradáveis foram publicados pela Sociedade Americana de Testes e Materiais (ASTM). Dentre os testes de degradação ambiental (oxidação, por exemplo), a ASTM publicou testes simulando aterros, condições marítimas, ambientes aeróbios e anaeróbios.

A Organização de Padronização da Alemanha (DIN) adotou posteriormente outras normas. O Comitê Europeu de Normas (ECN) e a Organização Internacional de Padronização (ISO) também possuem alguns testes padronizados que são internacionalmente aceitos, entretanto, a ECN trata de embalagens em geral, enquanto a DIN é dedicada especialmente a plásticos. Em 2000, o Comitê de Compostagem dos Estados Unidos (US Composting Council) e o Instituto de Polímeros Biodegradáveis (BPI) anunciaram um programa de certificação de materiais compostáveis baseado na norma ASTM D-6400-99.

Em geral, os procedimentos de testes incluem três etapas: a medida da biodegradabilidade; a desintegração em um ambiente de compostagem; e a análise da qualidade do composto, associada aos testes de toxicidade. Estes três procedimentos interligados permitem uma simulação do destino final do material; bem como a caracterização precisa do mesmo, desde o descarte até a avaliação da toxicidade dos produtos finais da desintegração.

A avaliação da biodegradação pode ser realizada através de métodos respirométricos; perda de massa; quantificação dos produtos formados, e análises da morfologia do material. Estes testes têm como finalidade estimar o grau e a taxa de biodegradação de um determinado material, em um determinado ambiente.

2.7.1 - Testes de biodegradação para simulação em laboratório

Os testes devem se aproximar ao máximo das condições naturais, assim como os testes realizados em solo ou composto orgânico, entretanto, a reprodução em escala laboratorial exige uma certa velocidade, permitindo a simulação em meios de cultura inoculados com microrganismos de solos, de lodos ativados, de rios e de mares, nos quais o polímero em teste é a única fonte de carbono (Grima *et al.*, 2000). O estudo da degradação polimérica também pode ser acelerado através de testes com enzimas extraídas de microrganismos (Gan *et al.*, 1996).

2.7.2 - Testes em meio sólido

Os testes em meio sólido podem ser realizados em solo comum e em composto, podendo ambos ser realizados em escala laboratorial.

2.7.2.1 - Teste em solo

O teste realizado em solo é muito importante, pois simula um ambiente real de descarte de resíduos sólidos. Além disso, o solo envolve diferentes microrganismos com diferentes sistemas enzimáticos, o que o torna propício para estudos de biodegradação. Tais microrganismos ocupam menos de 5% do seu espaço poroso; dentre os diversos grupos, o das bactérias é o que possui maior diversidade, isto é, cerca de 800 espécies de bactérias e 460 espécies de fungos (Siqueira *et al.*, 1994). Ressalta-se que, em geral o solo consiste de 25% de ar, 25% de água e 50% de sólidos (45% de matérias minerais como areia, silte e argila e 5% de matéria orgânica).

O teste em solo deve seguir alguns padrões para que os microrganismos se desenvolvam e a biodegradação ocorra, dentre eles a umidade e a temperatura são os mais importantes. A temperatura ideal do teste em solo é em torno de 25 °C e 30 °C e a umidade corrigida a 60% da capacidade de retenção máxima de água. (Grima *et al.*, 2000).

As normas padronizadas encontradas para estes testes são: ASTM D 5525-94a, ASTM D 5526-94 (2002), ASTM D 5988-96, ISO/PRF 17556 – 2002. Elas diferem no tipo de solo utilizado (solo comum ou de aterro) e na avaliação da biodegradação.

2.7.2.2 - Teste em composto

O **composto** é um produto orgânico obtido através da decomposição aeróbia controlada de substratos orgânicos que, após sua estabilização, pode ser aplicado em solos como fertilizante. Uma de suas características principais é a diversidade microbiana, a qual favorece a aceleração dos ensaios de biodegradação. Entretanto, variações na composição

do composto podem alterar a comunidade microbiana e, conseqüentemente, a taxa de mineralização de um determinado material, o que tem favorecido a sua padronização para os diversos testes existentes. O envelhecimento do composto também tem sido recomendado pelas normas do Comitê Europeu de Normas (ECN) para evitar a produção excessiva de CO₂, que pode mascarar o teste. De acordo com estudos realizados por Grima *et al.* (2000), a taxa de biodegradação em composto é maior que no solo.

Várias normas padronizadas para estes testes já estão disponíveis: ASTM D 5512-96, ASTM D 6002-96, ASTM D 6003-96, ISO14855 – 1999, ISO/DIS 15985 – 1999, ISO 16929 – 2002, ISO/DIS 20200 – 2001, EN 13432 – 2000. Elas diferem quanto ao método de avaliação da biodegradação do material plástico.

2.7.2.3 - Teste em meio líquido

Os testes em meio líquido são mais fáceis de serem conduzidos, pois além de apresentarem uma ótima reprodutibilidade, eles propiciam uma fácil recuperação dos metabólitos produzidos durante a biodegradação. Entretanto, não representam as condições reais, o que pode acarretar em conclusões errôneas a respeito do mecanismo de biodegradação de um determinado material (Grima *et al.*, 2000). A base dos testes em meio líquido é a utilização de um meio de cultura mineral, sendo o polímero teste a única fonte de carbono existente no meio. Este meio pode ser inoculado por um extrato de solo; composto; lodo ativado, ou por microrganismos isolados específicos e posteriormente mantidos em condições aeróbias ou anaeróbias. O material teste deve ser esterilizado, para que não haja contaminação externa de microrganismos, e incubado por quatro semanas, no mínimo, a uma temperatura entre 20 e 30 °C.

Existem diversas metodologias para testes em meio líquido e, por isso, muitas normas foram estabelecidas para que alguns critérios, como preparo de meio e inóculo, sejam seguidos. Algumas das normas encontradas referentes a estes testes são: ASTM D 5210-92(2000), ASTM D 5271-02, ASTM D 6691-01, ISO 14851 – 1999, ISO 14852 – 1999, ISO/DIS 14853 – 1999. Essas normas diferem quanto ao processo (aeróbio ou anaeróbio) e quanto à fonte de microrganismos utilizada.

2.8 - Análise e caracterização da biodegradação

Informações valiosas podem ser obtidas através do acompanhamento da interação do polímero com o ambiente; assim, a degradação deve ser monitorada cuidadosamente para que todas as etapas do processo sejam registradas e uma completa avaliação sobre a utilidade do material em diferentes aplicações seja concluída.

2.8.1 - Respirometria

Os testes respirométricos têm sido adotados na determinação da mineralização, pois são baseados na medida da respiração dos microrganismos durante o processo de biodegradação.

A respiração pode ser definida como um processo de obtenção de energia, através do qual os compostos orgânicos naturais e sintéticos servem como doadores de elétrons. Dessa forma, define-se a respiração microbiana como consumo de oxigênio e/ou liberação de dióxido de carbono por bactérias, fungos, algas e células protozoárias, incluindo as trocas gasosas, resultantes do metabolismo aeróbio e anaeróbio. Estes métodos são muito utilizados na quantificação da biodegradação, pois medem a atividade biológica, ou seja, confirmam que a desintegração do material foi realizada por microrganismos. Os testes respirométricos podem ser realizados em meio líquido ou em meio sólido (solo, composto).

No caso do solo, a medida da respiração após a mistura de amostras de compostos orgânicos tem sido freqüentemente utilizada para determinar a biodegradabilidade do material, bem como a velocidade e o grau de mineralização (Anderson, 1982). A medida da respiração do solo na presença de químicos potencialmente tóxicos serve também para avaliar possíveis danos causados, por estes materiais, às funções fisiológicas do solo.

Dentre várias metodologias, a de liberação de CO_2 vem se destacando nos estudos de biodegradação. Nela, o CO_2 é capturado por uma solução aquosa alcalina (normalmente KOH ou NaOH), sendo posteriormente precipitado, na forma de BaCO_3 , pela adição de BaCl_2 saturado. A soda excedente é titulada com HCl, e o CO_2 produzido é então calculado.

2.8.2 - Grau de biodegradação

Um dos métodos mais simples empregados na quantificação da biodegradação é a pesagem das amostras antes e após os testes, para avaliar a perda de massa dos polímeros, embora a técnica de avaliação da quantidade de C do polímero convertido em CO₂ (respirometria) seja considerada pelos órgãos padronizadores (ASTM, ISO, CEN) a mais indicada para quantificar o grau de biodegradação.

2.8.3 - Propriedades mecânicas X Biodegradação

O processo de biodegradação pode causar uma grande perda de resistência mecânica, bem antes de uma perda de massa significativa, caracterizada pela resposta dos biomateriais às tensões ou deformações aplicadas. Huang e Edelmam (1995) encontraram uma perda de resistência (66,1%) maior em relação à perda de massa (1,7%) em um copoliéster semicristalino submetido a um teste de hidrólise enzimática. As análises das propriedades mecânicas podem ser realizadas através de ensaios de tração, compressão, flexão, rasgamento e cisalhamento, entre outros.

2.8.4 – Cristalinidade e sua avaliação

Os polímeros podem ser encontrados em diversos graus de organização das cadeias. Quando estão totalmente desorganizadas, o polímero é denominado amorfo. No caso onde existe um certo arranjo ordenado das cadeias, o polímero é denominado semicristalino. De fato, devido a natureza complexa das macromoléculas, ainda não foi obtido um polímero 100% cristalino. Assim, a relação entre a região amorfa e cristalina do polímero é expressa em termos de porcentagem ou grau de cristalinidade (Lucas, Soares e Monteiro, 2001).

Em função da biodegradação se iniciar na região amorfa do polímero, alterações podem ocorrer na porcentagem de cristalinidade (X_c), as quais podem ser avaliadas, dentre outros métodos, através de análise de Calorimetria exploratória diferencial (DSC). Esta técnica mede as temperaturas (T_g , T_c e T_f), bem como o fluxo de calor associado com as transições dos materiais em função do tempo (ΔH).

2.8.5 - Morfologia

O estudo da morfologia de polímeros é um campo bastante explorado na área de materiais. A microscopia ótica (MO), a microscopia eletrônica de varredura (MEV) e a microscopia eletrônica de transmissão (TEM), são as técnicas mais utilizadas no estudo da superfície de materiais.

O MEV é uma ferramenta padrão utilizada para inspeção e análise da morfologia de polímeros semicristalinos e blendas poliméricas. A imagem obtida pelo MEV provê informações topográficas da amostra uma vez que pode apresentar detalhes menores que 1 nm (Gedde, 1995). Dessa forma, características do início da biodegradação na superfície dos materiais, tais como a erosão, podem ser melhor visualizadas com a ajuda desta técnica.

CAPÍTULO 3 - MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 - Materiais

- Poli(ϵ -caprolactona) da Union Carbide do Brasil (P 787)
- Amido adipatado 6704, cedido pela Corn Products do Brasil.
- Plastificante Edenol, produzido e fornecido pela Cognis Brasil.

3.2 - Composição e preparo dos filmes

A blenda de PCL/Amido adipatado foi preparada utilizando-se Edenol como plastificante. Neste caso o plastificante tem a função de desestruturar a estrutura cristalina do amido adipatado e conseqüentemente aumentar a interação entre os dois polímeros. Uma pré-mistura, contendo o PCL, o amido adipatado e o edenol, foi preparada e processada, primeiramente, através de extrusão e posteriormente por calandragem (as definições destes processos encontram-se no anexo I). Os filmes utilizados neste trabalho foram preparados no Laboratório de processamento da Cognis Brasil,

A composição da blenda de PCL/Amido adipatado utilizada está descrita na Tabela 1.

Tabela 1 - Composição da blenda PCL/Amido adipatado

Composição	Quantidade (%)
Poli(ϵ -caprolactona)	50,0
Amido adipatado	35,0
Plastificante Edenol*	15,0

* Derivado de óleo de soja

Após o preparo dos filmes, estes foram prensados em corpos de prova com moldes vazados padronizados ASTM D 412. As espessuras médias dos corpos de prova obtidos de PCL e PCL/Amido adipatado foram, respectivamente: 0,943 mm e 0,859 mm.

O filme de amido termoplástico foi preparado pelo processo “casting” conforme metodologia proposta por Janson e Thuvander (2004). Primeiramente uma solução 18% de amido foi preparada e aquecida a 98 °C sob agitação vigorosa. Ainda sob agitação, foi adicionado o plastificante Edenol na proporção 1:10 (v/v). A solução foi então derramada

em placa de Petri de poliestireno, de 150 mm de diâmetro, e mantida à temperatura ambiente (23 °C) para secagem. A espessura média dos filmes de amido obtidos foi de 0,743 mm.

Todas as formulações a base de amido foram preparadas com amido adipatado, dessa forma, assume-se que: amido adipatado = AA.

3.3 – Esterilização dos filmes

Os filmes utilizados foram previamente esterilizados, para que não houvesse contaminação por microrganismos externos aos sistemas de biodegradação estudados. A esterilização foi feita em câmara de fluxo laminar de acordo com a metodologia proposta por Mergaert *et al.* (2000). Para tal, os filmes foram mantidos imersos em solução de etanol 70%, por dez minutos, em placas de Petri estéreis e posteriormente lavados, em água destilada estéril, e secos a 23°C.

3.4 – Solo

Para o ensaio de respirometria foi utilizado um solo agrícola, coletado em Mogi das Cruzes – S.P.

3.5 - Testes de biodegradação

Os testes de biodegradação foram realizados através de simulações laboratoriais em meio líquido e em solo.

3.5.1 - Biodegradação em solo

O teste realizado foi baseado no método da respirometria, segundo a norma ASTM D 5988 – 96 (“Standard test method for determining aerobic biodegradation in soil of plastic materials or residual plastic materials after composting”) e na metodologia proposta por Anderson (1982).

3.5.2 - Determinação da umidade do solo

O solo foi seco por 72 horas, à temperatura ambiente (23 °C), e peneirado a 2,0 mm. A determinação da umidade do solo foi feita com 5g de solo úmido, colocado em estufa a 105°C, por 24 horas. A umidade foi calculada pela diferença da massa da amostra úmida e amostra seca:

$$\text{Umidade (\%)} = \frac{Mu - Ms}{Ms} \times 100 \quad \text{(Equação 3.1)}$$

Sendo:

Mu= massa de solo úmido;

Ms= massa de solo seco.

3.5.3 - Determinação da capacidade de retenção máxima de água (método do funil)

A capacidade de retenção máxima de água (CR) representa a umidade do solo na qual a drenagem interna praticamente cessa.

A determinação da CR foi feita em um funil contendo papel filtro quantitativo na parte superior, com 30g de solo úmido, e adicionado 30 mL de água deionizada. Após o escoamento total da água, cerca de 4 horas, dez gramas de solo úmido foram pesados e colocados em estufa 105 °C, por 24 horas. O cálculo da porcentagem de retenção máxima foi feito segundo as equações abaixo,

$$\text{CR (\%)} = \frac{Mu - Ms}{Ms} \times 100 \quad \text{(Equação 3.2)}$$

$$\text{QC}_{100} = (0,60 \times \text{CC\%}) - U\% \quad \text{(Equação 3.3)}$$

onde:

CR (%) = Capacidade de retenção máxima de água;

Mu = massa de solo úmido;

Ms = massa de solo seco;

QC₁₀₀ = Quantidade de água necessária para corrigir 100g de solo;

U (%) = Umidade original do solo.

A norma ASTM D 5988 – 96, utilizada no teste de biodegradação aeróbica de plástico no solo, requer que a umidade do mesmo seja corrigida para 60% da CR, mantendo suas características originais, e padronizando para a mesma umidade todas as amostras.

3.6 - Determinação do número mais provável de microrganismos do solo

A determinação do número mais provável (NMP) de fungos e bactérias do solo foi realizada pelo método de plaqueamento por gotas, proposto por Jahnel *et al.* (1999). Neste método os meios de cultura utilizados foram o ágar nutriente, para a determinação de bactérias e o meio de Martim (Jahnel *et al.*, 1999), para determinação de fungos (vide itens 3.8.4.2 e 3.8.4.3). Tubos de ensaio contendo 900 µL dos meios de cultura correspondentes foram autoclavados por 20 minutos a 120 °C (1 atm) e posteriormente mantidos em banho-maria a 45 °C.

As diluições sucessivas foram obtidas a partir de uma suspensão contendo 10,0 g de solo em 90,0 mL de água destilada estéril, utilizando-se alíquotas de 100 µL e adicionando-as aos tubos de ensaio com os meios de cultura. A partir das diluições realizou-se o plaqueamento das gotas em placas de Petri estéreis, em câmara de fluxo laminar, sendo que para cada diluição foram feitas cinco gotas de 40 µL, num total de 25 gotas por placa. As placas foram então mantidas em estufa a 28 °C, por 48 horas. Após o período de incubação, foi observado, com o auxílio de uma lupa, o número de gotas positivas. A figura 7 representa um resumo do método de gotas.

O número mais provável (NMP) foi estimado a partir dos resultados obtidos em cada diluição, com o auxílio de uma Tabela de probabilidade de ocorrência – Tabela de McCrady, a qual é apresentada no anexo II deste trabalho. O cálculo utilizado na determinação do NMP está descrito na equação abaixo:

$$NMP = \frac{n}{Ms \times 0,04} \quad \text{(Equação 3.4)}$$

Onde:

n = número de bactérias ou fungos encontrado na Tabela de McCrady;

Ms = Massa seca de 10,0 g do solo;

0,04 = volume da gota.

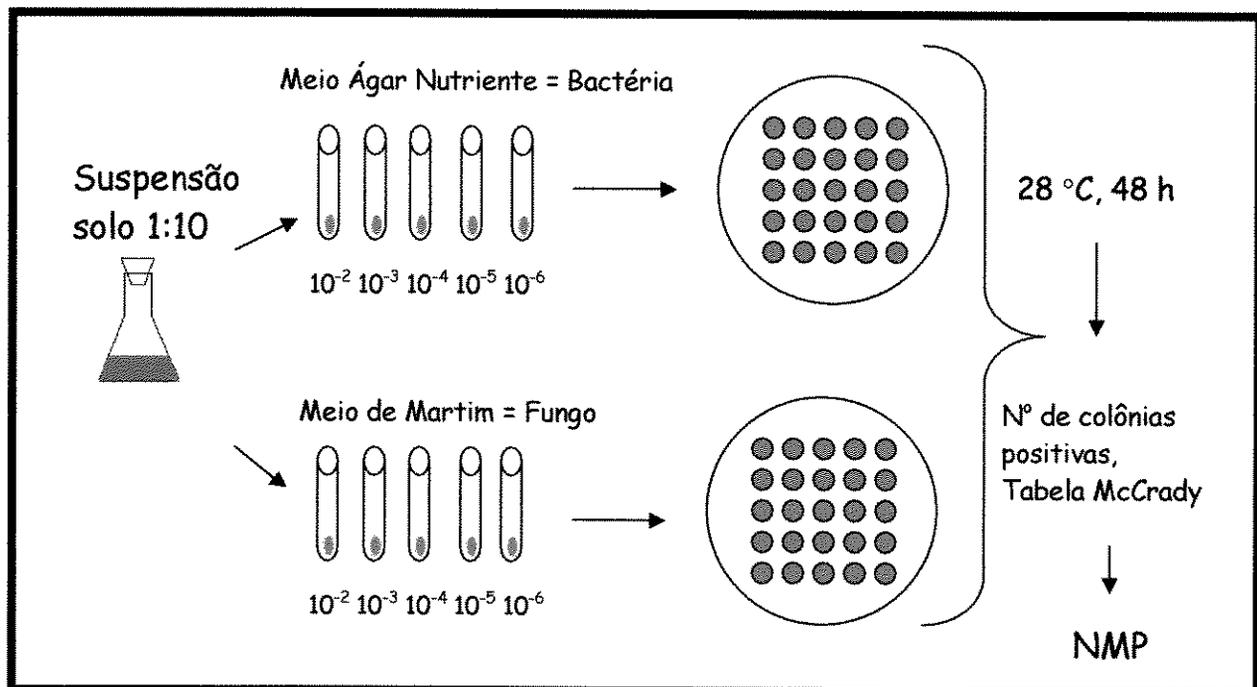


Figura 7 – Representação esquemática do método de gotas.

3.7 - Método da respirometria

Porções de 100 g de solo foram pesadas e incubadas em frascos de vidro com tampas vedantes. Os filmes foram pesados, esterilizados (vide item 3.3) e enterrados nas porções de solo. Para cada filme foram feitas três repetições. Três frascos, contendo apenas os solos, foram utilizados como controle negativo e três frascos contendo o solo e o filme de amido, como controle positivo.

A cada frasco foram adicionados 16,0 mL de água deionizada, para que a umidade estivesse a 60% da capacidade de campo.

Adicionaram-se 20,0 mL de hidróxido de sódio 0,5 N em béqueres de 50 mL, os quais foram colocados dentro dos frascos com os solos e os respectivas filmes. Após incubação a 28 °C, por períodos de três dias, os frascos foram abertos e o dióxido de carbono, capturado pela solução NaOH 0,5 N, foi precipitado com 1,0 mL de solução saturada de Cloreto de Bário. Esta solução foi posteriormente titulada com HCl 0,5 N, usando-se 1 gota de fenolftaleína como indicador.

Após sete dias de incubação, um béquer de 50 mL, contendo água destilada, foi colocado em cada frasco com a finalidade de manter a umidade.

A leitura da quantidade de dióxido de carbono liberada foi realizada de três em três dias, durante 90 dias, sendo os filmes removidos e avaliados após os seguintes períodos de incubação: 28, 56 e 90 dias.

Todos os testes em solo foram desenvolvidos no Laboratório de Microbiologia do Solo, sob responsabilidade da Profa. Dra. Elke Cardoso, Departamento de Solos e Nutrição de Plantas da ESALQ/USP.

3.7.1 - Determinação da mineralização

A determinação da quantidade de C convertido em CO₂ foi realizada apenas nos testes em solo, pois não foi possível montar um sistema de captação de CO₂ no experimento em meio líquido.

➤ Quantidade de C por peso de amostra

Os filmes de Amido, de PCL e de PCL/AA foram submetidos à análise elementar para determinação da quantidade de carbono presente (mg/100 mg de amostra). Essa análise foi realizada pela central analítica do Instituto de Química/Unicamp.

➤ Cálculo da quantidade de dióxido de carbono teórico produzido:



Considerando a equação 3.5, nota-se pela estequiometria que, 12 g C produzem 44 g CO₂, assim:

$$MtCO_2 \text{ (mg)} = \frac{44 \times Y}{12} \quad \text{(Equação 3.6)}$$

sendo:

$MtCO_2$ = Massa de dióxido de carbono teórico

Y = Quantidade de carbono (mg) da amostra.

- **Cálculo da quantidade, em peso, de CO₂ real produzido, através da seguinte equação:**

$$MpCO_2 \text{ (mg)} = (V_{cn} - V_{am}) \times 22 \times 0,5 \quad \text{(Equação 3.7)}$$

onde:

$MpCO_2$ = Massa de dióxido de carbono produzido (mg);

V_{cn} = Volume de HCl 0,5 N utilizado na titulação do frasco controle negativo;

V_{am} = Volume de HCl 0,5 N utilizado na titulação do frasco contendo a amostra;

22 = Equivalente grama do CO₂;

0,5 = Normalidade do HCl.

- **Cálculo da quantidade de C transformado em CO₂ (em % mineralização):**

$$\text{Mineralização (\%)} = \frac{MpCO_2}{MtCO_2} \times 100 \quad \text{(Equação 3.8)}$$

onde:

$MpCO_2$ = Massa de dióxido de carbono produzido (mg)

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

3.8 - Biodegradação em meio líquido

Os testes realizados em meio líquido foram baseados na norma ASTM D 6691 – 01 (“Standard test method for determining aerobic biodegradation of plastic materials in the

marine environment by a defined microbial consortium”) e na metodologia proposta por Mergaert *et al.* (2000).

3.8.1 - Isolamento das bactérias

As bactérias foram isoladas do solo agrícola, utilizado no teste em solo, e do aterro de Volta Fria, Mogi das Cruzes, no laboratório de Química biológica e biotecnologia do Núcleo de Ciências Ambientais da Universidade de Mogi das Cruzes, sob responsabilidade da Profa. Dra. Elisa Espósito.

3.8.2 - Preparo do inóculo

Tubos de ensaio contendo 3,0 mL de meio de cultura líquido, Caldo Triptico de Soja (TSB) (vide item 3.8.4.4), foram inoculados separadamente com cada bactéria isolada dos solos. Os tubos de ensaio foram mantidos a 28 °C, sob agitação de 175 rpm, por 24 horas.

Erlenmeyers de 250 mL, contendo 40,0 mL de meio TSB, foram inoculados separadamente com 250 µL de cada pré-inóculo e incubados a 28 °C e 175 rpm, por 24 horas.

Os meios contendo as diferentes bactérias foram colocados em tubos estéreis de 50 mL, próprios para centrifuga, e estes foram então centrifugados por 10 minutos, a 3.000 rpm. Descartou-se o sobrenadante, e o precipitado foi ressuscitado em 20 mL de meio mínimo mineral (vide 3.8.4.1). Repetiu-se o mesmo procedimento, ressuscitando-se o precipitado em 10 mL de meio mínimo mineral. Os tubos foram centrifugados pela terceira vez, para certificação de que toda fonte de carbono contida no meio TSB fosse eliminada. Após a remoção do sobrenadante, os precipitados foram ressuscitados em 4,0 mL de meio mínimo mineral.

As suspensões contendo as bactérias isoladas do solo agrícola foram misturadas, para a formação do inóculo 1, e as suspensões contendo as bactérias isoladas do aterro de Volta Fria formaram o inóculo 2.

A Figura 8 representa o resumo do método da obtenção do inóculo.

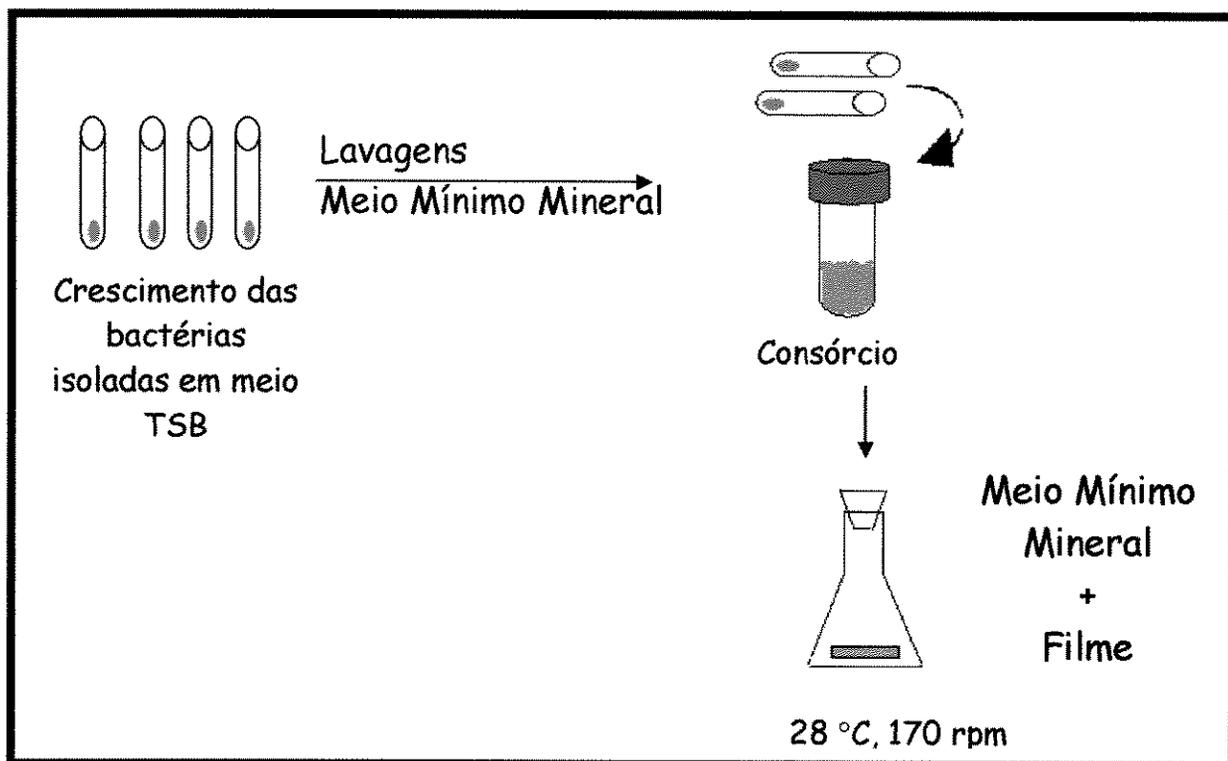


Figura 8 – Representação esquemática da obtenção do inoculo.

3.8.3 – Teste de Biodegradação

O teste de biodegradação em meio líquido foi realizado em erlenmeyers de 250 mL, contendo 130 mL de meio mínimo mineral. Os filmes de poli (ϵ -caprolactona), poli (ϵ -caprolactona)/amido adipatado e amido adipatado puro foram pesados, esterilizados e inseridos nos respectivos erlenmeyers. O estudo da biodegradação em meio líquido foi dividido em: Inóculo 1, Inóculo 2 e Controle negativo. Os erlenmeyers dos experimentos denominados inóculo 1 e inóculo 2, receberam 100 μL do consórcio das bactérias isoladas do solo Chácara São Miguel e 100 μL do consórcio das bactérias isoladas do aterro Volta Fria, respectivamente. Todos os filmes foram testados em triplicata.

Os controles negativos foram feitos em erlenmeyers contendo apenas o meio mínimo mineral e os filmes.

O experimento foi mantido em agitador a $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ sob agitação de 175 rpm por 56 dias.

3.8.4 - Composição dos meios de cultura utilizados

Todos os meios de cultura utilizados foram esterilizados em autoclave por 20 minutos, a 120 °C (1 atm).

3.8.4.1 - Meio mínimo mineral

O meio mínimo mineral foi preparado de acordo com a metodologia proposta por Mergaert *et al.* (2000).

NH ₄ Cl.....	1,0 g
MgSO ₄ .7H ₂ O.....	0,5 g
Citrato férrico de amônia	0,05 g
Tampão 33 mM Na ₂ HPO ₄ – KH ₂ PO ₄ (pH 6,8).....	1,0 L

3.8.4.2 – Meio ágar nutriente

Peptona.....	5,0 g
Extrato de carne.....	3,0 g
NaCl.....	10,0 g
Agar	12,0 g
Água destilada	1,0 L

3.8.4.3 – Meio de Martin

KH ₂ PO ₄	1,0 g
MgSO ₄ .7H ₂ O.....	1,0 g
Peptona	5,0 g
Dextrose	10,0 g
Estreptomicina.....	0,090 g
Água destilada	1,0 L

3.8.4.4 – Meio caldo triptona de soja (TSB)

Peptona de caseína.....	17,0 g
Peptona de soja.....	3,0 g

D-glicose	2,5 g
NaCl.....	5,0 g
Hidrogênio dipotássio fosfato	2,5 g
Água destilada	1,0 L

3.9 - Determinação da perda de massa dos filmes

Inicialmente os filmes foram mantidos em dessecador até peso constante e então pesados. Após os períodos de incubação de 28, 56 e 90 dias, foram retirados do meio líquido e do solo, lavados em etanol 70% e em água destilada e então mantidos em dessecador até peso constante. O cálculo da perda de massa utilizado foi o seguinte,

$$\text{Perda de massa} = \frac{M_o - M_f}{M_o} \times 100 \quad \text{(Equação 3.9)}$$

onde:

M_o = Massa inicial do plástico;

M_f = Massa final do plástico.

Para o ensaio de biodegradação em meio líquido, a perda de massa dos filmes de PCL e PCL/AA, foi acompanhada em meio mínimo mineral estéril, como controle negativo.

3.10 - Calorimetria exploratória diferencial (DSC)

Os filmes de PCL e PCL/AA foram submetidos à calorimetria exploratória diferencial (DSC) para se verificar a temperatura de fusão (T_f) e entalpia de fusão (ΔH_f), muito úteis para descrever corretamente as mudanças nas propriedades térmicas, além do grau de cristalinidade (X_c), calculado através da equação descrita por Turi (1981):

$$X_c = \frac{\Delta H_{famostra}}{\Delta H_{f100\%c}} \times 100 \quad \text{(Equação 3.10)}$$

Sendo:

X_c = cristalinidade da amostra;

$\Delta H_{f_{amostra}}$ = Variação da entalpia de fusão da amostra (J/g) obtida pela análise de DSC;

$\Delta H_{f_{100\%c}}$ = Variação da entalpia padrão de fusão do polímero (PCL) 100% cristalino, cujo valor de 136 J/g é descrito por Avella *et al.* (2001);

O equipamento de calorimetria exploratória diferencial utilizado foi o da TA Instruments, Modelo 2920, do Depto. de Tecnologia de Polímeros da FEQ/UNICAMP.

As condições de análise utilizadas foram:

Faixa de aquecimento: - 80 °C a 100 °C;

Taxa de aquecimento: 10 °C/minuto.

Atmosfera: N₂.

3.11 - Microscopia eletrônica de varredura (MEV): estudo da morfologia

O aspecto das superfícies dos filmes biodegradados foi avaliado por microscopia eletrônica de varredura, antes e após os períodos de incubação, sendo escolhidos os que apresentaram maior perda de massa. Estes foram então mantidos em dessecador, por 48 horas, para a remoção do excesso de umidade e, posteriormente, cortados em formato retangular (aproximadamente 0,7 x 0,4 cm) e adaptados em porta-amostras para a metalização com ouro e paládium (camada de 92 Å). Esses porta-amostras foram levados ao Microscópio Eletrônico de Varredura LEO, modelo LEO 440i, do Laboratório de uso comum (LUC) da FEQ/UNICAMP. As condições utilizadas foram: 15 KV e 120 mA.

3.12 – Análise Estatística

Os resultados obtidos nos ensaios de respirometria, perda de massa e número mais provável de microrganismos foram submetidos a tratamentos estatísticos, os quais foram baseados em análise de variância (ANOVA) e diferença entre médias pelo teste de Tukey e teste t, com nível de significância a 5%. Os dados foram analisados pelo software “SAS for Windows” (SAS, 2000).

CAPÍTULO 4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste trabalho estudou-se a biodegradação de blendas de PCL e Amido, em meio sólido (solo) e meio líquido, onde se obteve os resultados apresentados e discutidos nas próximas sessões.

4.1 - Teste em solo

4.1.2 – Caracterização visual

Caracterizando a biodegradação dos filmes de PCL e PCL/AA apenas por aspectos visuais, antes e durante o período de incubação, (Figura 9), foi possível notar a velocidade e a eficiência do teste realizado em solo. A decomposição dos filmes de PCL/AA, (Figura 9a), e de PCL, (Figura 9b), foi notada pela fragmentação dos mesmos durante a incubação. Observou-se a presença de fungos aderidos na superfície dos filmes de PCL e PCL/AA, os quais foram posteriormente isolados para a identificação do gênero. Resultados semelhantes foram relatados por Bastioli (1995) em ensaios de biodegradação de blendas de PCL/Amido, conduzidos em lodo ativado. Segundo o autor, o consumo microbiano do componente amido induz o aumento da porosidade e, conseqüentemente, à perda da integridade da matriz plástica, tal qual ocorreu neste trabalho.

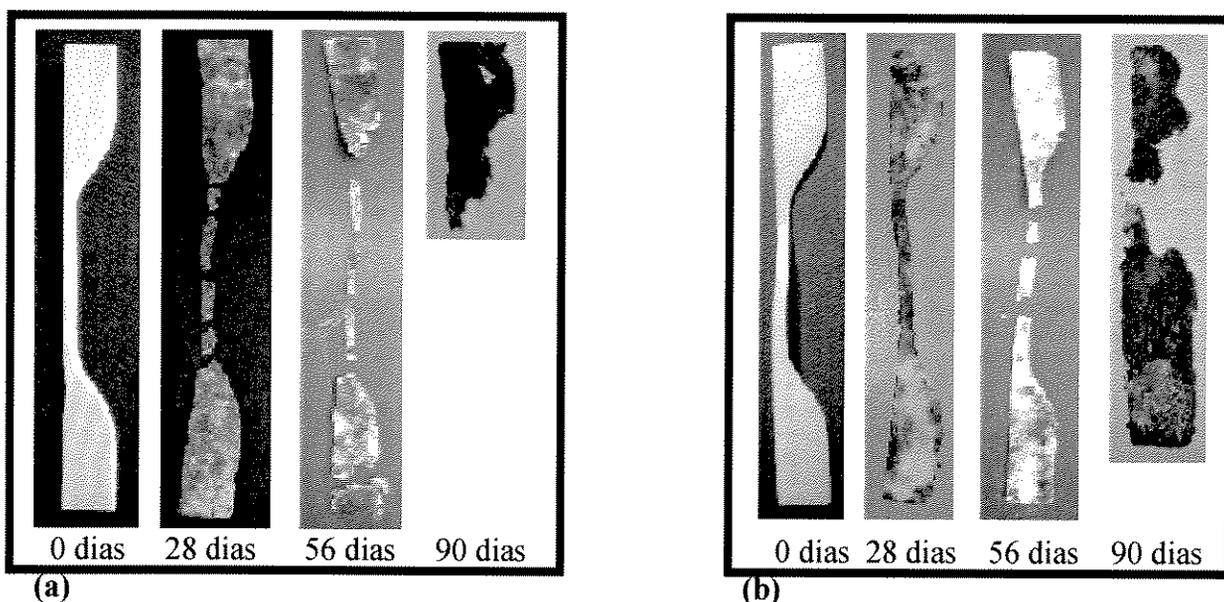


Figura 9 - Avaliação do aspecto visual dos filmes de PCL/AA e PCL durante incubação em solo agrícola, 28 °C. (a) Filme de PCL/AA durante biodegradação; (b) Filme de PCL durante biodegradação.

4.1.3 – Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A caracterização da superfície dos filmes biodegradados, por meio de microscopia eletrônica de varredura, revelou uma estrutura porosa formada após 28 dias de incubação no solo (Figura 10b). Esses poros podem ser associados ao ataque preferencial dos microrganismos aos grãos de amido, mantendo a matriz de PCL intacta. Singh *et al* (2003) observaram morfologia semelhante em estudos realizados com uma blenda de PCL e amido após 250 dias de incubação em composto orgânico. As Figuras 10c e 10d mostram o aumento da profundidade do ataque dos filmes conforme o aumento no tempo de incubação. Pode-se notar que a formação dos poros tem um papel importante na biodegradação da blenda, pois eles aumentam a superfície de contato entre a matriz polimérica (PCL) e os microrganismos, favorecendo a migração microbiana na matriz de PCL. No final da incubação, observou-se também a redução na quantidade de poros, indicando possivelmente que a massa residual do filme contém apenas PCL.

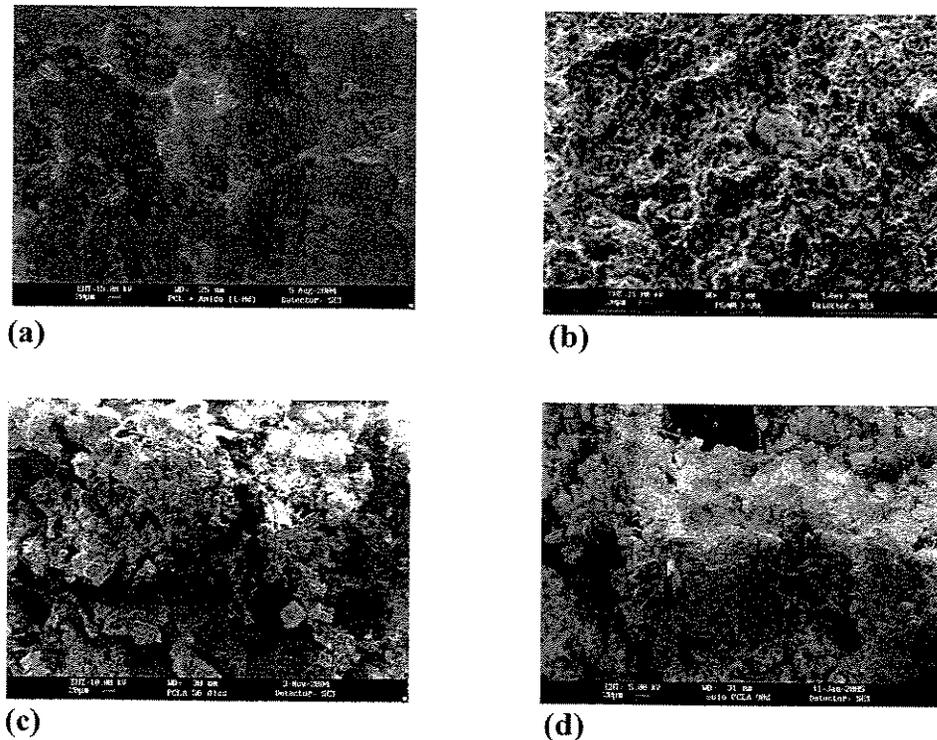


Figura 10 - Fotomicrografias da blenda PCL/AA após incubação em solo agrícola, 28 °C, aumento de 500x. (a) Filme antes da incubação no solo (t=0 dias); (b) Filme após período de 28 dias de incubação no solo; (c) Filme após período de 56 dias de incubação no solo; (d) Filme após período de 90 dias de incubação no solo.

Os filmes de PCL, cujas micrografias são demonstradas na Figura 11, apresentaram morfologia diferente da blenda após a biodegradação em solo. Neste caso, os filmes sofreram erosão superficial em formato de estrias. Observou-se nas Figuras 11b, 11c e 11d, um leve aumento na profundidade da degradação, em função do tempo de incubação, confirmando a baixa taxa de biodegradação sofrida pelo PCL puro, o que também foi verificado pela porcentagem de cristalinidade discutida no item 4.1.6.

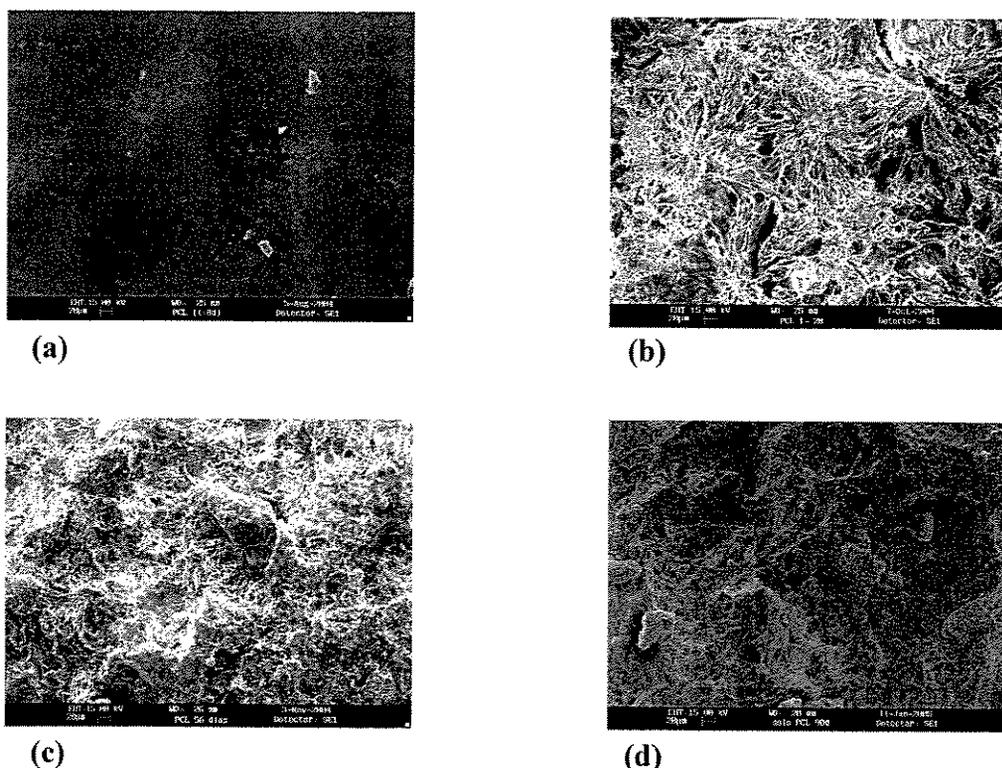


Figura 11 - Fotomicrografias do filme de PCL após incubação em solo agrícola, 28 °C, aumento de 500x. (a) Filme antes da incubação no solo (t=0 dias); (b) Filme após período de 28 dias de incubação no solo; (c) Filme após período de 56 dias de incubação no solo; (d) Filme após período de 90 dias de incubação no solo.

4.1.4 - Mineralização – solo

A porcentagem de mineralização dos plásticos foi obtida através do ensaio de respirometria, conduzido durante a incubação dos filmes em solo. A partir das médias das triplicatas e do teste de Tukey, observou-se diferença significativa ($P < 0,0001$) entre os três filmes, os quais podem ser classificados na ordem decrescente de mineralização: AA > PCL/AA > PCL. A análise estatística realizada através do teste t, para a interação filme *versus* período de incubação (Tabela 2), apresentou diferença significativa entre os filmes

após 28 dias de incubação; por outro lado, não houve diferença após 56 e 90 dias, provavelmente devido ao alto desvio padrão observado. Os erros de análises causados, por exemplo, pela contaminação dos frascos com CO₂ externo, bem como pela titulação, podem justificar esses desvios. Ainda assim, observou-se um desvio menor que 20% no final do ensaio para a substância referência (filme de amido), o que, segundo Grima *et al.* (2002) valida o teste.

Pode-se observar, pela Tabela 2, que o filme de amido adipatado (AA) foi mineralizado inicialmente a uma alta taxa, atingindo um valor de aproximadamente 68% em 28 dias, mantendo-se praticamente constante até 56 dias e com um leve acréscimo até alcançar 90 dias. Já os filmes de PCL e PCL/AA apresentaram a mesma tendência de crescimento da taxa de mineralização, embora a diferença entre os dois tenha sido de aproximadamente 10% nos períodos de 28 e 56 dias, aumentando para 20% no final do experimento. Pode-se notar também que a blenda atingiu praticamente a mesma taxa de mineralização do amido em 90 dias, embora a velocidade tenha sido menor. A taxa de mineralização do filme de PCL/AA foi maior que a do filme de PCL puro, indicando o aumento da velocidade de biodegradação do PCL devido à incorporação do amido, como sugerido por Bastioli (1995).

Tabela 2 - Porcentagem de mineralização dos filmes de PCL, PCL/AA e Amido adipatado, em função do tempo de incubação em solo agrícola, 28 °C

Filmes	Mineralização média (%)		
	28 dias	56 dias	90 dias
PCL	15,24 ± 4,03 ^a	32,88 ± 10,79 ^a	51,03 ± 8,60 ^a
PCL/AA	25,25 ± 1,57 ^b	42,42 ± 8,00 ^a	70,76 ± 7,89 ^{ab}
AA	68,77 ± 11,99 ^c	66,78 ± 7,50 ^b	78,92 ± 3,96 ^{ab}

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

A Figura 12 representa a mineralização média dos filmes durante 90 dias de incubação no solo. Como se pode notar, a dinâmica da mineralização em relação ao período de incubação foi diferente para os três filmes estudados, embora os filmes de PCL e PCL/AA apresentem dinâmicas praticamente lineares. Segundo a norma ASTM D6400, um material só pode ser considerado biodegradável quando atinge uma razão satisfatória de conversão de C em CO₂, em um período de 180 dias. Homopolímeros, assim como o PCL, devem apresentar

taxa de 60% de mineralização, enquanto que produtos compostos por mais de um polímero (compósitos, blendas), como a blenda de PCL/AA, devem alcançar 80% de mineralização. Os filmes de PCL e PCL/AA atingiram cerca de 50% e 70%, respectivamente, da conversão de C em CO₂ em 90 dias. O filme de PCL/AA apresentou taxa de mineralização maior que a do PCL, o que pode ser explicado pelo consumo microbiano preferencial do componente amido.

Pode-se notar que o controle positivo (filme de amido adipatado) atingiu cerca de 80% de mineralização em 90 dias, o que, segundo a norma ASTM D5988-96, valida o teste, uma vez que 70% do C do material controle deve ser convertido em CO₂ em 180 dias.

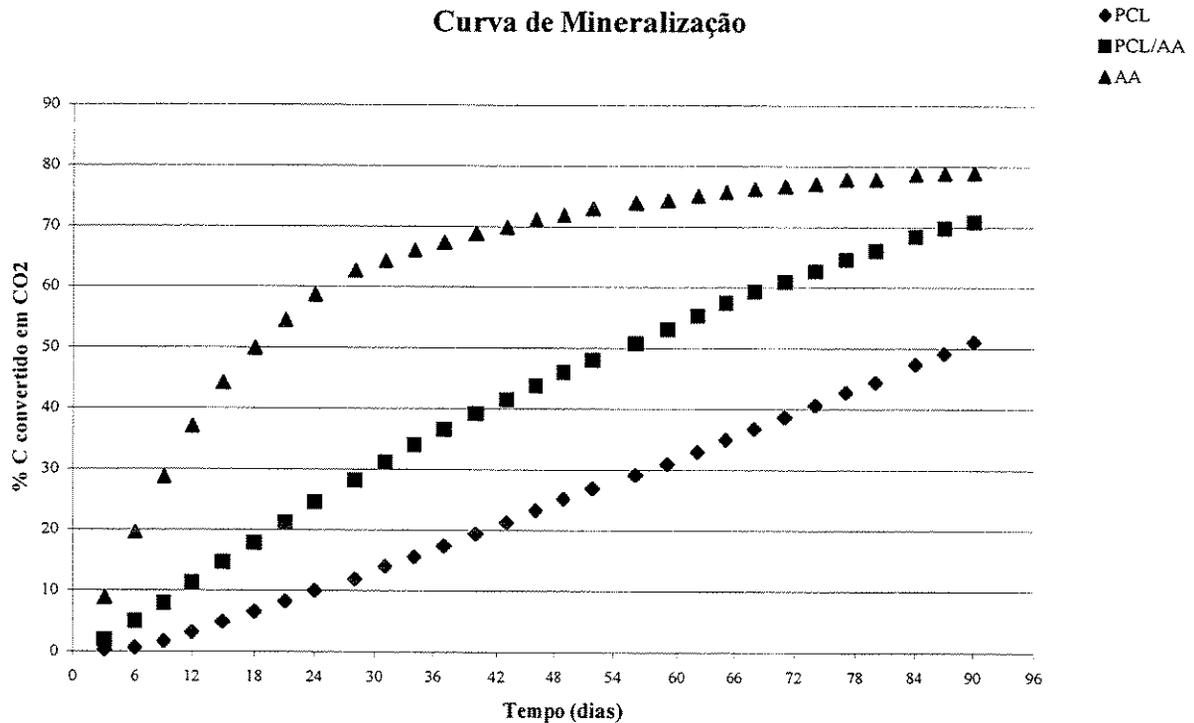


Figura 12 - Mineralização dos filmes de PCL, PCL/AA e AA durante 90 dias de incubação em solo agrícola, 28 °C.

4.1.5 - Perda de massa

A análise realizada para determinar a biodegradação em função da massa residual dos polímeros, representada na Tabela 3, revelou uma elevada perda de massa dos filmes

(PCL e PCL/AA) enterrados em solo, em função do tempo, o que foi diferente para Franco *et al.* (2004). Estes pesquisadores detectaram uma perda de massa relativamente baixa em estudos realizados com blendas de PCL/amido, incubadas em solo: 21%, 23% e 26% após 30, 60 e 90 dias de incubação, respectivamente.

A análise estatística, realizada através do teste t, não revelou interação entre os dois filmes e os períodos de incubação ($P=0,0985$). Sendo assim, a perda de massa média da blenda foi significativamente diferente ($P=0,0091$) somente após 28 dias de incubação.

Os desvios padrão encontrados para as perdas de massa, referentes aos períodos de 56 e 90 dias, foram muito altos e, provavelmente, causados pela massa de fungo aderida na superfície dos filmes e/ou pela hidrofiliabilidade da blenda. Outra questão importante a ser considerada é a dificuldade na recuperação de todos os fragmentos dos filmes com o tempo de incubação. Esses fatores foram prejudiciais na avaliação da biodegradação dos plásticos em solo, por meio da perda de massa.

Tabela 3 - Porcentagem de perda de massa média dos filmes de PCL e PCL/AA em função do tempo de incubação e filme.

Filmes	Perda de massa média do polímero (%)		
	28 dias	56 dias	90 dias
PCL	20,26 ± 2,56 ^a	39,92 ± 13,52 ^a	72,39 ± 13,84 ^a
PCL/AA	36,84 ± 4,95 ^b	54,00 ± 24,55 ^a	88,68 ± 10,37 ^a

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

4.1.6 – Análises Térmicas

A técnica de Calorimetria Exploratória Diferencial foi utilizada para estudar as variações nas propriedades térmicas dos filmes de PCL e PCL/AA, antes e após a biodegradação. As variações na temperatura de fusão (T_f) e na entalpia de fusão (ΔH_f) dos filmes foram obtidas através das curvas de DSC, as quais estão apresentadas no anexo III deste trabalho. Por meio da análise térmica (Tabela 4) observou-se inicialmente (tempo = 0) que a temperatura e a entalpia de fusão da blenda de PCL/AA são menores (redução de aproximadamente 10% e 39%, respectivamente) que a do filme de PCL. Segundo Wu (2003), a inserção do amido termoplástico entre as cadeias de PCL perturba a regularidade das suas estruturas. Conseqüentemente, a cristalinidade da blenda é reduzida (Figura 13)

devido à dificuldade das cadeias poliméricas de PCL se organizarem em retículos cristalinos, em função de o amido impedir os movimentos dos segmentos poliméricos.

À medida que o período de incubação foi aumentando, a temperatura e a entalpia de fusão da blenda atingiram valores muito próximos aos do filme de PCL, o que permite relacionar a biodegradação da blenda com a remoção preferencial do amido, tornando a massa polimérica residual, após os 90 dias de incubação, apenas de PCL.

Tabela 4 - Propriedades térmicas dos filmes de PCL e PCL/AA em relação ao período de incubação em solo agrícola, 28 °C.

Filme	Período de incubação (dias)	Tf (°C)	ΔH_f (J/g)
PCL	0	64,8	76,3
PCL	28	65,2	76,5
PCL	56	65,3	69,0
PCL	90	64,4	70,5
PCL/AA	0	58,1	46,1
PCL/AA	28	63,6	64,7
PCL/AA	56	63,9	75,9
PCL/AA	90	64,2	70,2

Observou-se também, através da Figura 13, uma sutil redução na cristalinidade do filme de PCL, a qual pode ser justificada por erros de análise ou pela menor organização das estruturas cristalinas causada pela fragmentação das cadeias poliméricas. Em contrapartida, a cristalinidade da blenda de PCL/AA aumentou em função do tempo de biodegradação até atingir a mesma porcentagem de X_c do filme de PCL, provavelmente devido à reorganização das cadeias do PCL causada pela ausência do amido que foi sendo consumido. Gattin *et al.* (2002) verificaram um incremento na cristalinidade da blenda de Poli (ácido lático)/Amido durante ensaio de biodegradação conduzido em meio líquido e vermiculita. Segundo os autores, o aumento da cristalinidade deve-se a reorganização das cadeias.

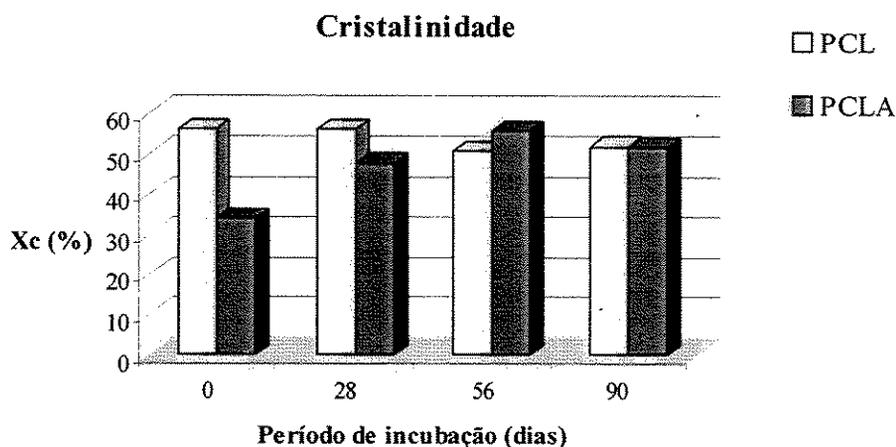


Figura 13 - Porcentagem de cristalinidade dos filmes de PCL e PCL/AA em relação ao período de incubação no solo agrícola, 28 °C.

4.1.7 – Número mais provável de microrganismos

O número mais provável de bactérias e fungos do solo foi obtido apenas para os períodos de 56 e 90 dias, não sendo observada nenhuma alteração significativa na comunidade microbiana, em relação aos solos incubados com os filmes de AA, PCL e PCL/AA, como mostra a Tabela 5.

A análise estatística realizada através do teste t revelou que, em relação ao número de bactérias, os solos incubados com os filmes AA, PCL e PCL/AA não apresentaram diferença significativa nem interação entre filme *versus* período de incubação ($P=0,754$ e $P=0,2789$, respectivamente). Para os fungos também não foi observada diferença entre filmes e interação filme *versus* período de incubação ($P=0,3633$ e $P=0,1187$, respectivamente). Não havendo nenhuma alteração aparente na comunidade microbiana, acredita-se que a biodegradação dos filmes não foi prejudicial ao solo estudado. Observa-se novamente que o alto desvio padrão encontrado nessa análise pode justificar a ausência de

diferenças significativas. A amplitude desses desvios pode corresponder à variação natural da comunidade microbiana.

Tabela 5 - Número mais provável de microrganismos do solo após a biodegradação da blenda de PCL/AA.

Filme incubado	Período de incubação (dias)	NMP fungos (10^4 organismos/g solo seco)	NMP bactérias (10^6 organismos/g solo seco)
AA	56	$2,11 \pm 1,53^a$	$4,58 \pm 4,00^a$
AA	90	$1,39 \pm 0,18^a$	$2,24 \pm 1,75^a$
PCL	56	$7,65 \pm 7,61^a$	$3,14 \pm 1,43^a$
PCL	90	$5,37 \pm 5,12^a$	$4,78 \pm 3,66^a$
PCL/AA	56	$1,22 \pm 0,35^a$	$7,91 \pm 4,75^a$
PCL/AA	90	$5,77 \pm 3,90^a$	$2,90 \pm 1,76^a$

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

4.1.8 – Fungos identificados

Durante o ensaio de biodegradação em solo, observou-se a presença de fungos aderidos na superfície dos filmes de PCL e PCL/AA. Esses fungos foram então isolados para identificação do gênero e classificados em ordem decrescente de quantidade encontrada:

Fusarium sp > *Aspergillus* sp > *Penicillium* sp, *Rhizopus* sp, *Trichoderma* sp.

Gattin et al. (2002) identificaram os fungos *Aspergillus fumigatus* e *Penicillium brevicompactum* durante incubação da blenda de Poli (ácido láctico) e amido, em composto orgânico, sendo que apenas o primeiro foi capaz de degradar o amido. Segundo Hakkarainen e Albertsson (2002), os fungos *Penicillium* sp, *Aspergillus* sp e *Rhizopus* sp produzem a enzima lipase e são capazes de degradar o PCL.

De acordo com Oda et al. (1997), o fungo *Fusarium moniliforme* produz a enzima cutinase, a qual também é capaz de hidrolisar o PCL.

4.1.9 – Análises químicas do solo

O solo, utilizado nos ensaios de biodegradação, foi analisado antes e após a biodegradação da blenda de PCL/AA para se detectar possíveis modificações nas suas características. De acordo com os resultados obtidos (Tabela 6), as características do solo se mantiveram praticamente constantes, embora os valores observados para alguns parâmetros tenham apresentado variações expressivas. Essas variações podem estar relacionadas à própria amostragem, a qual não foi analisada em triplicata, não permitindo garantir que a biodegradação da blenda tenha sido responsável por tais alterações.

Tabela 6 - Análises Químicas do solo agrícola antes e após a biodegradação da blenda de PCL/AA.

Características do solo	Solo antes da biodegradação da blenda	Solo após a biodegradação da blenda
pH	6,7	6,1
M.O. (g.dm ⁻³)	82,0	98,0
P (mg.dm ⁻³)	2.065,0	2.772,0
S (mg.dm ⁻³)	31,0	24,0
K (mmolc.dm ⁻³)	9,8	12,0
Ca (mmolc.dm ⁻³)	650,0	600,0
Mg (mmolc.dm ⁻³)	95,0	117,0
H+Al (mmolc.dm ⁻³)	20,0	22,0
SB (mmolc.dm ⁻³)	754,8	729,0

4.2 - Teste em meio líquido

4.2.1 – Caracterização Visual

Como se pode notar pela Figura 14a e 14b, os filmes de PCL/AA não sofreram biodegradação aparente durante a incubação em meio líquido. Os inóculos também não diferiram quanto à forma de biodegradação visível a olho nu.

Neste caso, o teste em meio líquido não apresentou a mesma eficiência do teste em solo (vide item 4.1.2) impossibilitando a observação da biodegradação em função da incorporação do amido na matriz de PCL. A baixa eficiência do teste em meio líquido pode estar relacionada ao fato dos inóculos não apresentarem as enzimas específicas para a biodegradação da blenda, ou pela contaminação detectada durante as análises de perda de massa e MEV (vide itens 4.2.2 e 4.2.3), a qual pode ter impedido o crescimento do inoculo.

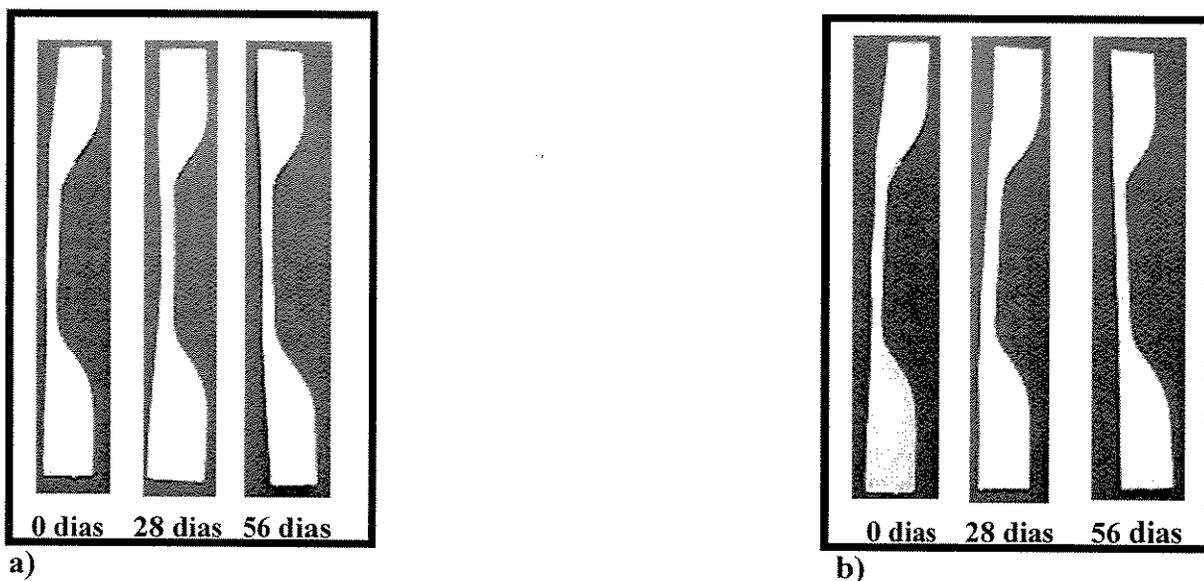


Figura 14 - Avaliação do aspecto visual do filme de PCL/AA durante incubação em meio mínimo mineral (28 °C, 175 rpm) . (a) Filme de PCL/AA durante o período de incubação com o inoculo 1; (b) Filme de PCL/AA durante o período de incubação com o inoculo 2.

4.2.2 – Perda de Massa

Os filmes submetidos à biodegradação em meio mínimo mineral apresentaram taxas de perda de massa relativamente baixas, quando comparadas às taxas do teste em solo; ainda assim, a redução na massa da blenda de PCL/AA foi significativamente maior

($P < 0,0001$) em relação ao PCL, resultado esperado devido a incorporação do amido. Não foi observada diferença significativa na perda de massa dos filmes quando comparados entre os diferentes inóculos ($P = 0,8740$).

Os filmes incubados em meio estéril (controles) revelaram perda de massa, sugerindo a contaminação deste meio por microrganismos externos. Para investigar a possível contaminação, o meio foi então plaqueado em meio de cultura ágar nutriente e mantido a 28 °C por 24 horas. Confirmou-se a contaminação tanto nos controles realizados com o PCL quanto nos de PCL/AA, sendo impossível afirmar a sua origem, já que diversos fatores podem ter causado o crescimento de outros microrganismos.

Essa contaminação pode ter sido responsável pelo baixo desempenho dos inóculos, uma vez que ela pode ter inibido o crescimento dos mesmos. Por outro lado, não se tinha conhecimento das espécies das bactérias utilizadas nos inóculos; sendo assim, estas poderiam não apresentar as enzimas específicas para o ataque dos filmes estudados. Os altos desvios padrão observados podem ter sido causados pela contaminação.

Tabela 7 - Porcentagem de perda de massa média dos filmes de PCL e PCL/AA em função do inóculo, tempo de incubação e tipo de polímero.

Inóculos	Filmes	Perda de massa média do polímero (%)	
		28 dias	56 dias
Meio Líquido sem inóculo	PCL	$0,69 \pm 0,24^a$	$0,44 \pm 0,25^a$
	PCL/AA	$6,25 \pm 1,85^b$	$23,31 \pm 19,27^b$
Meio Líquido, inóculo 1	PCL	$0,69 \pm 0,11^a$	$0,84 \pm 0,23^c$
	PCL/AA	$15,51 \pm 8,75^c$	$8,79 \pm 0,86^d$
Meio Líquido, inóculo 2	PCL	$0,91 \pm 0,05^a$	$1,02 \pm 0,04^c$
	PCL/AA	$16,08 \pm 3,80^c$	$12,14 \pm 2,18^{bd}$

Médias seguidas de letras sobrescritas diferentes, na mesma coluna, diferem entre si (Teste t, $P < 0,05$).

Franco *et al.*, 2004, avaliaram a biodegradação da blenda de PCL/Amido em meio líquido inoculado com bactérias isoladas de solo, porém não observaram perda de massa nos dois meses iniciais. Segundo o autor, a baixa eficiência do teste deve-se ao fato de que tanto o PCL quanto o amido são menos suscetíveis ao ataque microbiano em meio líquido inoculado com bactérias isoladas, do que quando incubados em solo, onde há uma grande diversidade microbiana.

Hakkarainen e Albertsson (2002), em estudos de biodegradação realizados com filme de PCL em meio líquido inoculado com bactérias isoladas de composto, obtiveram resultados superiores de perda de massa. Em um período de 42 dias de incubação a perda de massa do filme foi de 6%.

4.2.3 – Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

As análises de microscopia eletrônica de varredura, das blendas incubadas em meio líquido por 28 dias com o inóculo 1, apresentaram a formação de poros uniformemente distribuídos por toda a superfície, indicando o consumo seletivo dos grãos de amido e mantendo intacta a matriz polimérica (Figura 15b), no caso o PCL. O inóculo 2 (Figura 15c) também apresentou um ataque significativo à blenda, entretanto, pode-se notar que ambos são ataques superficiais. No controle negativo, Figura 15d, mantido em meio líquido sem inóculo, pode-se observar contaminação por microrganismos externos, confirmado pelos pequenos poros presentes na superfície do filme.

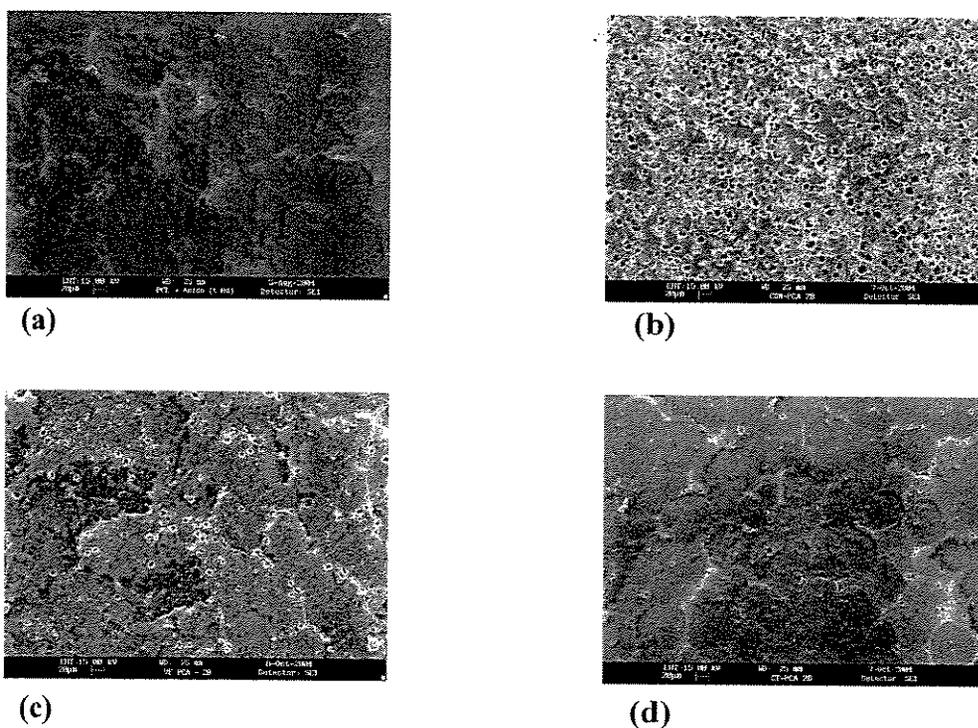


Figura 15 - Fotomicrografias da blenda PCL/AA em MEV, aumento de 500x. (a) Filme antes dos testes (t=0 dia); (b) Meio líquido com inóculo 1, t=28 dias; (c) Meio líquido com inóculo 2, t=28 dias; (d) Controle negativo em meio líquido, t=28 dias.

Após 56 dias de incubação em meio líquido, as blendas não foram atacadas como anteriormente em nenhum dos dois inóculos (Figuras 16a e 16b). A blenda incubada em meio estéril, Figura 16c, apresentou um ataque superior ao das blendas incubadas com os inóculos nos dois períodos, sugerindo novamente a contaminação do meio.

Essas análises confirmam os resultados da perda de massa e sugerem que as bactérias utilizadas nos dois consórcios podem não apresentar as enzimas responsáveis pela biodegradação da blenda.

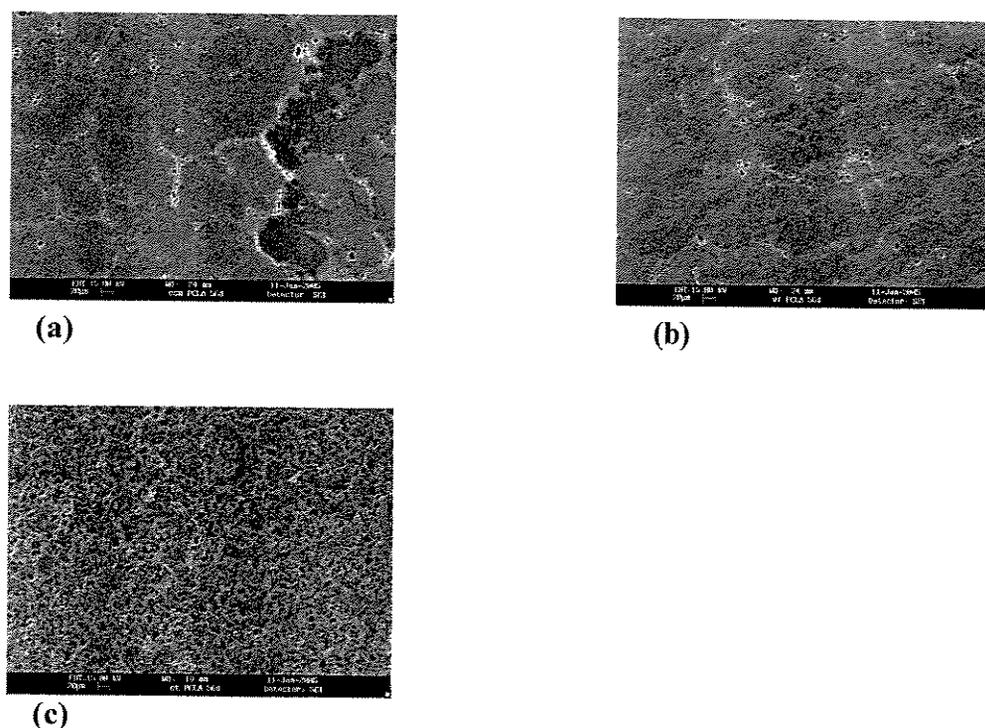


Figura 16 - Fotomicrografias da blenda PCL/AA em MEV, aumento de 500x. (a) Meio líquido com inóculo 1, t=56 dias; (b) Meio líquido com inóculo 2, t=56 dias; (c) Controle negativo em meio líquido, t=56 dias.

No caso dos filmes de PCL, incubados por 28 dias em meio líquido, estes foram atacados de forma diferente, ou seja, em formato de estrias, dando início a pequenas rachaduras, como mostra a Figura 17. Não houve ataque na superfície do filme de PCL em

meio líquido com inóculo 1 (Figura 17b), entretanto, no caso do inóculo 2 (Figura 17c), a micrografia revelou pequenas fissuras na superfície. Como esperado, o controle negativo não sofreu ataque aparente (Figura 17d), embora tenha apresentado perda de massa e o plaqueamento do meio tenha confirmado a contaminação.

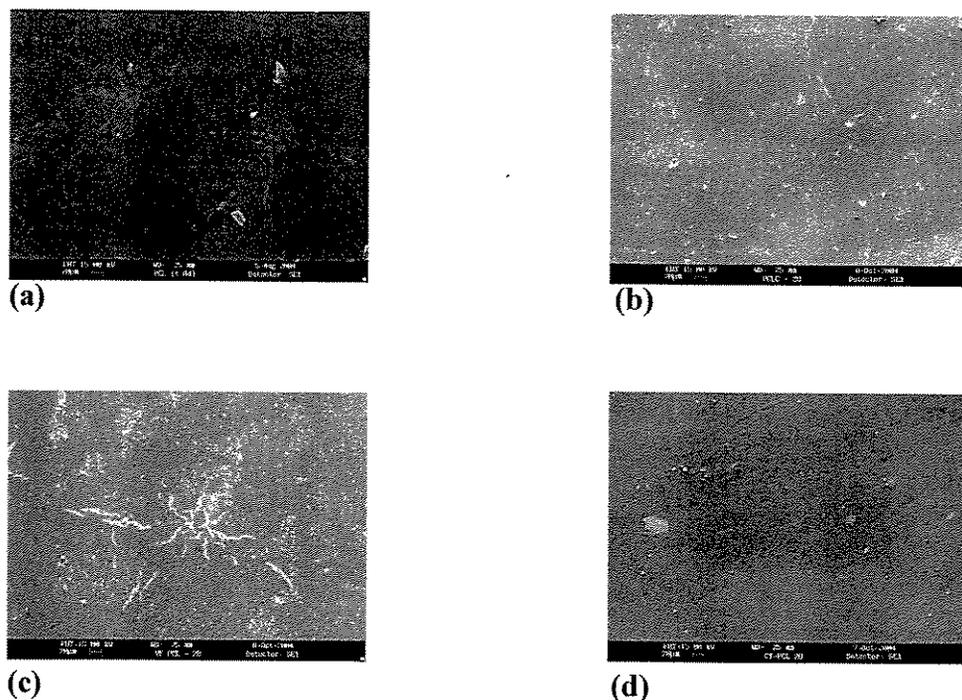


Figura 17 - Fotomicrografias do polímero PCL em MEV, aumento de 500x. (a) Filme antes dos testes (t=0 dias); (b) Teste em meio líquido com inóculo 1, t=28 dias; (c) Teste em meio líquido com inóculo 2, t=28 dias; (d) Controle negativo em meio líquido, t=28 dias.

Os filmes de PCL, incubados por 56 dias, também não apresentaram a superfície muito atacada, embora tenham sofrido um aumento nas fissuras em função do tempo (Figura 18a), quando incubados com o inóculo 1. O filme incubado com o inóculo 2, como mostra a Figura 18b, não revelou qualquer ataque semelhante ao encontrado com 28 dias. O filme incubado em meio estéril (Figura 18c) também não apresentou algum ataque aparente, ainda que tenha apresentado perda de massa.

Como os meios de cultura dos controles foram plaqueados após a remoção dos plásticos, e a contaminação foi confirmada, pode-se dizer que a contaminação favoreceu apenas a biodegradação da blenda através do consumo do amido.

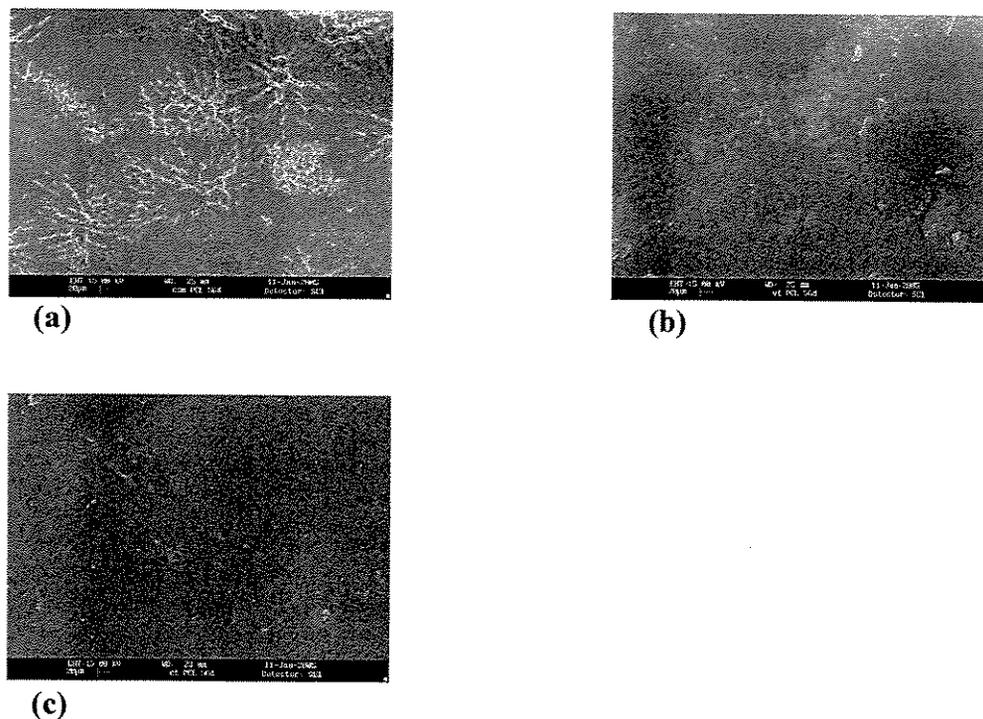


Figura 18 - Fotomicrografias do polímero PCL em MEV, aumento de 500x. (a) Meio líquido com inóculo 1, t=56 dias; (b) Meio líquido com inóculo 2, t=56 dias; (c) Controle negativo em meio líquido, t=56 dias.

4.2.4 - Análises Térmicas

A temperatura e a entalpia de fusão do filme de PCL puro (Tabela 8) não sofreram alterações com o tempo de biodegradação em meio líquido, por outro lado, o filme de PCL/AA apresentou um sensível aumento na temperatura e na entalpia de fusão em relação ao tempo de incubação. Esse acréscimo não pôde ser relacionado ao inóculo utilizado, pois a diferença entre eles é pequena. Por outro lado, a cristalinidade do filme de PCL (Figura 19) sofreu pequenas alterações durante o período de incubação, sendo que o tipo de inóculo e o tempo de incubação não foram determinantes para estas alterações. A blenda de

PCL/AA apresentou um pequeno acréscimo na cristalinidade, mas novamente o tipo de inóculo e o fator tempo de incubação não foram significantes. Entretanto, esse pequeno acréscimo de cristalinidade é sugestivo de uma cristalização do PCL devido a um reordenamento das cadeias, desencadeado pela degradação e movimentação das mesmas.

Tabela 8 - Propriedades térmicas dos filmes de PCL e PCL/AA em relação ao período de incubação em meio líquido e inóculo

Plástico	inóculo	Período de incubação (dias)	Tf (°C)	ΔH_f (j/g)
PCL	----	0	64,8	76,3
PCL	0	28	66,2	74,9
PCL	1	28	65,3	80,7
PCL	2	28	66,1	77,6
PCL	0	56	64,1	82,5
PCL	1	56	65,6	76,9
PCL	2	56	64,2	76,7
PCL/AA	----	0	58,1	46,1
PCL/AA	0	28	60,1	50,2
PCL/AA	1	28	63,0	54,2
PCL/AA	2	28	61,3	52,8
PCL/AA	0	56	62,3	51,7
PCL/AA	1	56	60,1	51,2
PCL/AA	2	56	60,7	48,3

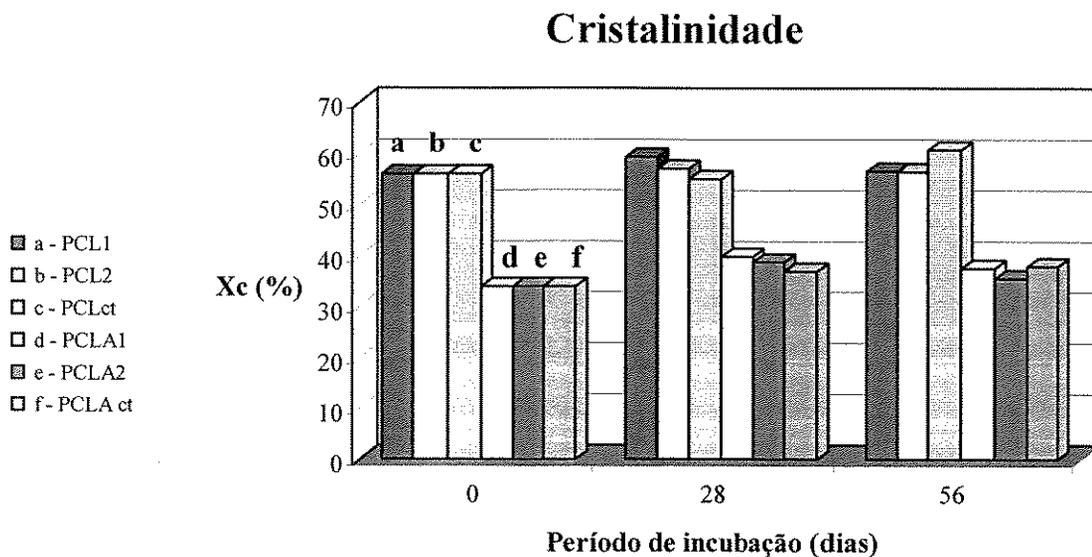


Figura 19 - Porcentagem de cristalinidade dos filmes de PCL e PCL/AA em relação ao período de incubação em meio líquido e inóculo.

CAPÍTULO 5 - CONCLUSÕES

- De acordo com os padrões para plásticos biodegradáveis, citados pelas normas ASTM, a blenda de Poli (ϵ -caprolactona)/Amido adipatado pesquisada pelo grupo de polímeros ambientalmente degradáveis do DTP/FEQ pode ser considerada biodegradável.
- Os ensaios de biodegradação em solo apresentaram-se mais eficientes, quando comparados aos ensaios em meio líquido, possivelmente devido à ação sinérgica da comunidade microbiana deste meio. Dessa forma, observou-se que o grau de biodegradação da blenda PCL/AA é dependente do meio em que o estudo está sendo conduzido assim como da diversidade dos microrganismos envolvidos no processo.
- Para ambos os testes, a blenda de PCL/Amido adipatado apresentou potencial biodegradável se comparada ao filme de PCL puro. Nesse caso, observou-se que a presença de amido foi importante na aceleração da taxa de biodegradação, o qual exerceu o papel de agente centralizador dos microrganismos, além de ser responsável pela redução do custo final do produto, devido à sua grande oferta no mercado.
- Foi observado um leve aumento na cristalinidade da blenda com o tempo de incubação, confirmando que o amido foi atacado primeiramente, deixando um volume livre maior para um rearranjo nas cadeias de PCL.

CAPÍTULO 6 – SUGESTÕES

Sabe-se que o desaparecimento dos filmes aqui estudados pode não ser suficiente para classificá-los como biodegradáveis já que os produtos de baixo peso molecular, os quais podem ser liberados durante a biodegradação, podem ser recalcitrantes e/ou tóxicos para o ambiente.

Neste capítulo são sugeridos alguns estudos com o objetivo de aprimorar o trabalho realizado:

- Avaliar a biodegradação da blenda em outros meios, para certificá-la como biodegradável em qualquer substrato;
- Realizar o monitoramento da massa molecular média durante o período de biodegradação, para avaliar a degradação das cadeias poliméricas através de cromatografia de permeação em gel (GPC);
- Estudo da toxicidade, após a biodegradação completa da blenda;
- Extração dos produtos de baixo peso molecular, para identificação e quantificação.

CAPÍTULO 7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMASS, W.; AMASS, A.; TIGUE, B. A review of biodegradable polymers: uses, current developments in the synthesis and characterization of biodegradable polyesters, blends of biodegradable polymers and recent advances in biodegradation studies. *POLYMER INTERNATIONAL*, v.47, p.89-144, 1998.

AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS – ASTM. Standard Specification for Compostable Plastics, D 6400 - 99^{e1}, 2002.

AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS – ASTM. Standard Test Method for Determining Aerobic Biodegradation in Soil of Plastic Materials or Residual Plastic Materials After Composting, D 5988-96, 1996.

AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS – ASTM. Standard Test Method for Determining Aerobic Biodegradation of Plastic Materials in the Marine Environment by a Defined Microbial Consortium, D 6691-01, 2001.

ANDERSON, J. P. E. Soil respiration. In: PAGE, A. L., MILLER, R. H., KEENEY, D. R. *Methods of soil analysis – Part 2 - Chemical and microbiological properties*, Wisconsin: Madison, 1982.

AVELLA, M.; ERRICO, M. E.; RIMEDIO, R.; SADOCCO, P. Preparation of biodegradable polyesters/high-amylose-starch composites by reactive blending and their characterization. *JOURNAL OF APPLIED POLYMER SCIENCE*, v. 83, p. 1432-1442, 2002.

AVEROUS, L.; MORO, L.; DOLE, P.; FRINGANT, C. Properties of thermoplastic blends: starch-polycaprolactone. *POLYMER*, v.41, p.4157-4167, 2000.

- BALTIERI R. C.; BARTOLI J.; MEI, L. H. I. Study of the influence of plasticizers on the thermal and mechanical properties of poly(3-hydroxybutyrate) compounds. *MACROMOLECULAR SYMPOSIA*, v. 197, n.1, p.33-44, 2003.
- BASTIOLI, C. Starch - polymer composites. In: SCOTT, G., GILEAD, D. *Degradable polymers, principles and applications*, Londres: Chapman & Hall, 1995.
- CHANDRA, R.; RUSTGY, R. Biodegradable Polymers. *PROG. POLYM. SCI.*, v.23, p.1273-1335, 1998.
- CHERINI, G. Projeto de Lei 119/2004, Rio Grande do Sul. Disponível em http://www.al.rs.gov.br/proposições/2004/projlei/pl_n119-04.htm. Acesso em 14/07/2004.
- CHIELLINI, E. State of art and future prospective of EDPs. In: Expert group meeting on environmentally degradable plastics (EDPs) & sustainable development. Trieste: 5-6, dez. 2002.
- FRANCO, C. R.; CYRAS, V. P.; BUSALMEN, J. P.; RUSECKAITE, R. A.; VÁZQUEZ, A. Degradation of polycaprolactone/starch blends and composites with sisal fibre. *POLYMER DEGRADATION AND STABILITY*, v.86, n.1, p.95-103, 2004.
- FREITAS, NEWTON DA FONSECA DE. Estudo das propriedades termomecânicas e morfológicas de blendas biodegradáveis de poli (ϵ -caprolactona) (PCL) com amido de milho modificado. Campinas: Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, 2004. 88p. Tese (mestrado)
- GATTIN, R.; COPINET, A.; BERTRAND, C.; COUTURIER, Y. Biodegradation study of a starch and poly (lactic acid) co-extruded material in liquid, composting and inert mineral media. *INTERNATIONAL BIODETERIORATION AND BIODEGRADATION*, v.50, p.25-31, 2002.

- GAN, Z.; LIANG, Q.; ZHANG, J.; JING, X. Enzymatic degradation of poly (ϵ -caprolactona) film in phosphate buffer solution containing lipases. POLYMER DEGRADATION AND STABILITY, v.56, p.209-213, 1996.
- GEDDE, U. F., Polymer physics. Londres: Chapman & Hall, 1995, 298 p.
- GRIMA, S.; BELLON-MAUREL, V.; FEUILLOLEY, P.; SILVESTRE, F. Aerobic biodegradation of polymers in solid-state conditions: a review of environmental and physicochemical parameter settings in laboratory simulations. JOURNAL OF POLYMERS AND THE ENVIRONMENT, v.8, n.4, p.183-195, 2002.
- HAKKARAINEN, M.; ALBERTSSON, A. C. Heterogeneous biodegradation of polycaprolactone – low molecular weight products and surface changes. MACROMOLECULAR CHEMISTRY AND PHYSICS, v.203, p.1357-1363, 2002.
- HUANG, S. J.; EDELMAN, P. G. An overview of biodegradable polymers and biodegradation of polymers. In: SCOTT, G., GILEAD, D. Degradable polymers, principles and applications, Londres: Chapman & Hall, 1995.
- IBAW. Biodegradable polymers/bioplastics. Disponível em <http://www.ibaw.org>, Acesso em 04/11/03.
- ISHIAKU, U. S.; PANG, K. W.; LEE, W. S.; ISHAK, Z. A. MOHD. Mechanical properties and enzymic degradation of thermoplastic and granular sago starch filled poly(ϵ -caprolactone). EUROPEAN POLYMER JOURNAL, v.38, p.393-401, 2002.
- JAHNEL, M. C.; CARDOSO, E. J. B. N.; DIAS, C. T. S. Determinação do número mais provável de microrganismos do solo pelo método de plaqueamento por gotas. REVISTA BRASILEIRA DE CIÊNCIA DO SOLO, v. 23, p. 553-559, 1999.

- JANE, J. Starch properties, modifications and applications. In: ALBERTSSON, A. C., HUANG, J. S. Degradable polymers, recycling, and plastics waste management, New York (USA): Marcel Dekker, 1995.
- JANSSON, A.; THUVANDER, F. Influence of thickness on the mechanical properties for starch films. CARBOHYDRATE POLYMERS, v.56, n.4, p. 499-503, 2004.
- LUCAS, E. F.; SOARES, B. G.; MONTEIRO, E. Caracterização de polímeros: Determinação de peso molecular e análise térmica. Rio de Janeiro: e-papers, 2001, 366 p. 366
- MALI, S.; GROSSMANN, M. V. E. Preparation of acetylated distarch adipates by extrusion. LEBENSMITTEL – WISSENSCHAFT UND - TECHNOLOGIE, v.34, n. 6, p.384-389, 2001.
- MANO, E. B.; MENDES, L. C. Introdução a polímeros. 2. ed. Rio de Janeiro: Edgard Blücher Ltda, 1999, 191 p.
- MERCK & CO. The Merck index: An encyclopedia of chemicals and drugs. 8 ed. Rathway, NJ: Merck & Co, 1968.
- MERGAERT, J.; RUFFIEUX, K.; BOURBAN, C.; STORMS, V.; WAGEMANS, W.; WINTERMANTEL, E.; SWINGS, J. In vitro biodegradation of polyester-based plastic materials by selected bacterial cultures. JOURNAL OF POLYMERS AND THE ENVIRONMENT, v.8, n.1, p.17-27, 2000.
- NOLAN – ITU Pty Ltd. Environment Australia: Biodegradable plastics developments and environmental impacts, 2002.
- ODA, Y.; OIDA, N.; URAKAMI, T.; TONOMURA, K. Polycaprolactone depolymerase produced by the bacterium *Alcaligenes faecalis*. FEMS MICROBIOLOGY LETTERS, v.152, p.339-343, 1997.

PLASTIVIDA. Disponível em: <http://www.plastivida.org.br>, acesso em 07/01/2004.

SCOTT, G. Introduction to the abiotic degradation of carbon chain polymers. In: SCOTT, G., GILEAD, D. Degradable polymers, principles and applications, Londres: Chapman & Hall, 1995.

SINGH, R. P.; PANDEY, J. K.; RUTOT, D.; DEGÉE, Ph.; DUBOIS, Ph. Biodegradation of poly(ϵ -caprolactone)/starch blends and composites in composting on the inherent biodegradability of the host polymer. CARBOHYDRATE RESEARCH, v.338, p.1759-1769, 2003.

SIQUEIRA, J. O.; MOREIRA, F. M. S.; GRISI, B. M.; HUNGRIA, M.; ARAUJO, R. S. Microrganismos e processos biológicos do solo – perspectiva ambiental, Brasília: Embrapa, 1994.

SOLVAY CAPROLACTONES. Disponível em <http://www.solvay.com/capa>, 1998.

TURI, E. A. Thermal characterization of polymeric materials, Florida: Academic Press, 1981, 972 p.

WU, C. S. Physical properties and biodegradability of maleated polycaprolactone/starch composite. POLYMER DEGRADATION AND STABILITY, v.80, p. 127-134, 2003.

YAVUZ, H.; BABAÇ, C. Preparation and biodegradation of starch/polycaprolactone films. JOURNAL OF POLYMERS AND THE ENVIRONMENT, v.11, n.3, p.107-113, 2003.

ANEXO I

Glossário (Mano e Mendes, 1999)

- **Blendas:** mistura de dois ou mais polímeros sintéticos ou naturais em que a massa pode se apresentar na forma de um sistema homogêneo ou heterogêneo.
- **Composto:** qualquer mistura, polimérica ou não.
- **Compósitos:** materiais heterogêneos, multifásicos, podendo ser poliméricos ou não, em que um dos componentes é descontínuo e dá a principal resistência ao esforço (componente estrutural ou reforço) e o outro componente é contínuo e representa o meio de transferência desse esforço (componente matricial ou matriz).
- **Calandragem:** Processo que permite a formação de lâminas plásticas.
- **Extrusão:** Processo em que a massa polimérica termomoldável é formada.

ANEXO II

Tabela 9 – Tabela de probabilidade de ocorrência (Tabela de McCrady) utilizada na determinação do número mais provável de microrganismos.

Nº caract- terísti- co	Nº de bac- térias						
000	0,0	203	1,2	403	1,3	513	8,5
001	0,2	210	0,7	401	1,7	520	5,0
002	0,4	211	0,9	402	2,0	521	7,0
010	0,2	212	1,2	403	2,5	522	2,5
011	0,4	220	0,9	410	1,7	523	12,0
012	0,6	221	1,2	411	2,0	524	15,0
020	0,4	222	1,4	412	2,5	525	17,5
021	0,6	230	1,2	420	2,0	530	8,0
030	0,6	231	1,4	421	2,5	531	11,0
100	0,2	240	1,4	422	3,0	532	14,0
101	0,4	300	0,8	430	2,5	533	17,5
102	0,6	301	1,1	431	3,0	534	20,0
103	0,8	302	1,4	432	4,0	535	25,0
110	0,4	310	1,1	440	3,5	540	13,0
111	0,6	311	1,4	441	4,0	541	17,0
112	0,8	312	1,7	450	4,0	542	25,0
120	0,6	313	2,0	451	5,0	543	30,0
121	0,8	320	1,4	500	3,5	544	35,0
122	1,0	321	1,7	501	4,0	545	45,0
130	0,8	322	2,0	502	4,0	550	25,0
131	1,0	330	1,7	503	5,0	551	35,0
140	1,1	331	2,0	504	7,5	552	60,0
200	0,5	340	2,0	510	3,5	553	30,0
201	0,7	341	2,5	511	4,5	554	140,0
202	0,9	350	2,5	512	5,0	555	180,0

Exemplos: Diluições

	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	10 ⁻⁸
5	5	5	5	5	2	1	0	0
5	5	5	5	3	1	1	0	0
3	2	2	0	0	0	0	0	0

	Números característicos	nº provável
Exemplo 1:	521	7,0
	532	14,0
	322	2,0

A diluição menos concentrada na qual todos os tubos ainda são positivos será a primeira cifra do número característico.

No exemplo 2, usam-se as duas últimas cifras para as diluições 10⁻⁶ e 10⁻⁷.

Quando nenhuma diluição apresenta todos os tubos positivos, usa-se como primeira cifra a da diluição mais concentrada.

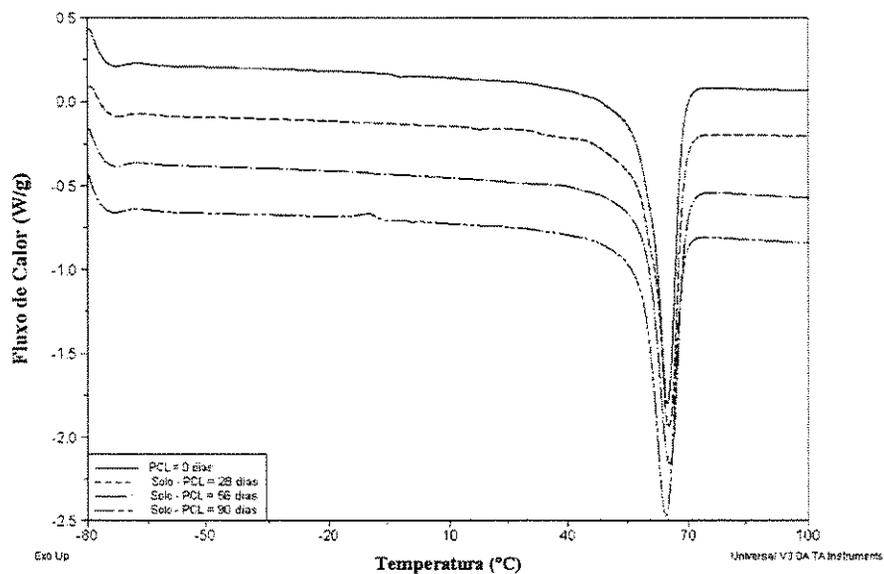
Expressam-se os resultados de número de organismos por grama de solo.

Portanto, devemos multiplicar pela recíproca da diluição mais concentra da que forneceu a primeira cifra do número característico:

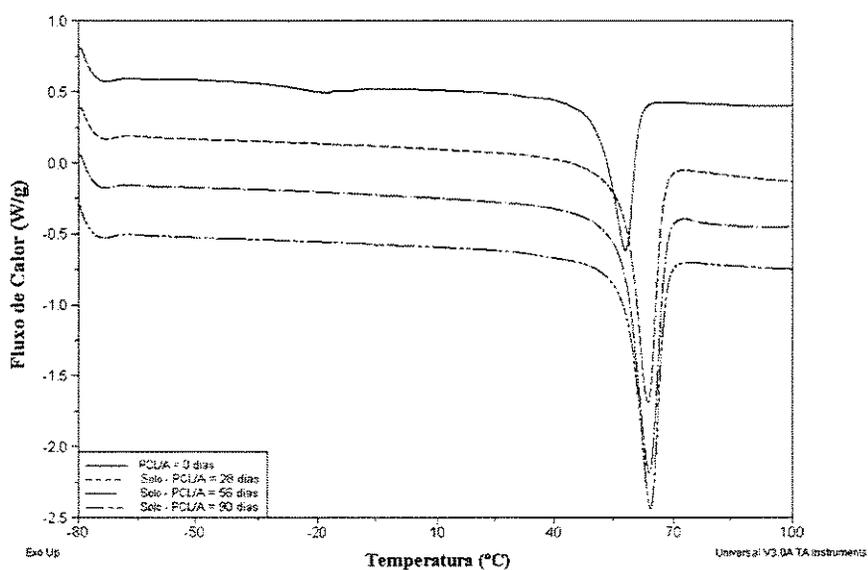
- Ex. 1 - 7,0 x 10⁵ = 700.000 organismos/ g solo
- 2 - 14,0 x 10⁴ = 140.000 organismos/ g solo
- 3 - 2,0 x 10 = 20 organismos/ g solo

ANEXO III

Curvas térmicas de DSC obtidas para os filmes de PCL e PCL/AA antes e após os ensaios de biodegradação.

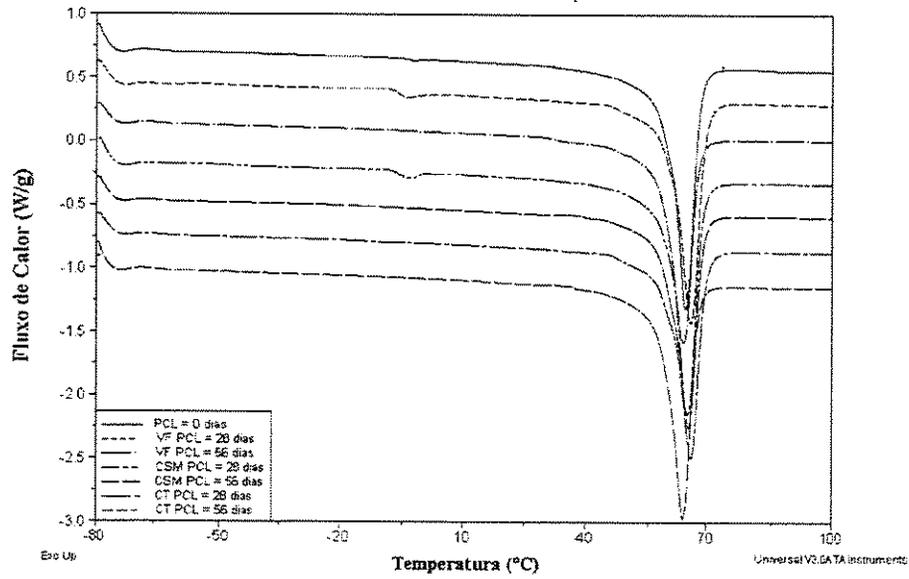


(a)

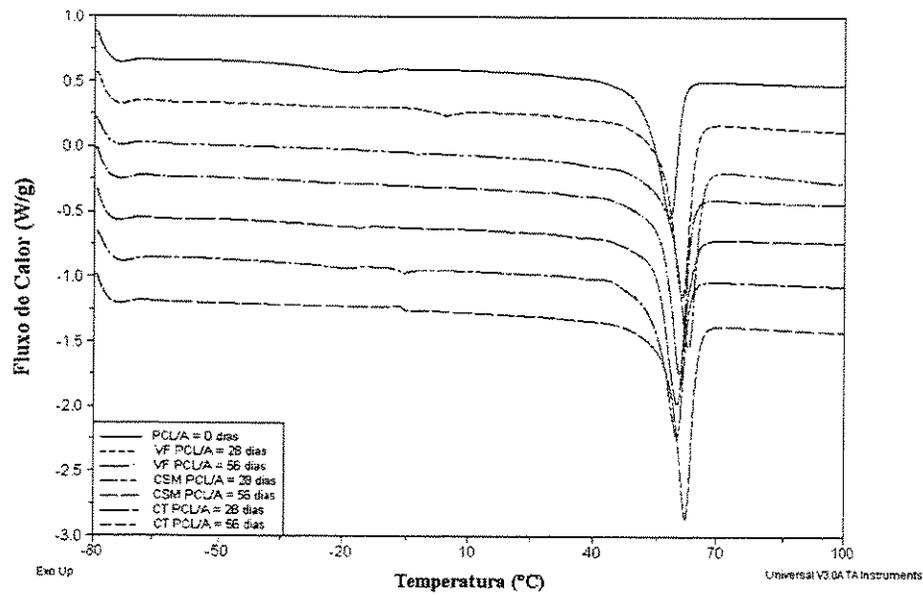


(b)

Figura 20 – Curvas térmicas referentes aos filmes incubados por 28, 56 e 90 dias em solo agrícola, 28 °C. (a) PCL; (b) PCL/AA.



(a)



(b)

Figura 21 - Curvas térmicas referentes aos filmes incubados por 28, 56 e 90 dias em meio líquido, 28 °C, 175 rpm. (a) PCL; (b) PCL/AA.