



Ministério da Educação
Fundação Universidade Federal da Grande Dourados
Faculdade de Ciências Exatas e Tecnologia
Mestrado em Ciência e Tecnologia Ambiental

Produção e caracterização de filmes obtidos a partir de ésteres graxos epoxidados, polihidroxicanoatos e suas combinações

Tairine Pimentel

Dourados-MS
Março, 2015

Produção e caracterização de filmes obtidos a partir de ésteres graxos epoxidados, polihidroxicanoatos e suas combinações

Tairine Pimentel

Orientador: Prof. Dr. Gustavo Graciano Fonseca

Co-Orientador: Prof. Dr. Lucas Pizzuti

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental da Universidade Federal da Grande Dourados, como requisito parcial para a obtenção de título de Mestre em Ciência e Tecnologia Ambiental, na área de Tecnologia Ambiental.

**Dourados-MS
Março, 2015**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP).

P644p	<p>Pimentel, Tairine. Produção e caracterização de filmes obtidos a partir de <i>ésteres graxos epoxidados, polihidroxicanoatos</i> e suas combinações. / Tairine Pimentel. – Dourados, MS : UFGD, 2015. 77f.</p> <p>Orientador: Prof. Dr. Gustavo Graciano Fonseca. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia Ambiental) – Universidade Federal da Grande Dourados.</p> <p>1. Filme. 2. Éster. 3. Epoxidação. 4. Amido. 5. Polihidroxicanoato I. Título.</p> <p>CDD – 633.85</p>
-------	---

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central – UFGD.

©Todos os direitos reservados. Permitido a publicação parcial desde que citada a fonte.



Termo de Aprovação

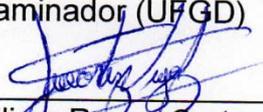
Após apresentação, arguição e apreciação pela banca examinadora, foi emitido o parecer APROVADO, para a dissertação intitulada: **“Produção e caracterização de filmes a partir de ésteres graxos epoxidados, polihidroxicanoatos e suas combinações”**, de autoria de **Tairine Pimentel**, apresentada ao Programa de Mestrado em Ciência e Tecnologia Ambiental da Universidade Federal da Grande Dourados.



Prof. Dr. Gustavo Graciano Fonseca
Presidente da banca examinadora



Prof.^a. Dr.^a. Farayde Matta Fakhouri
Membro Examinador (UFGD)



Prof. Dr. William Renzo Cortez Vega
Membro Examinador (UFGD)

Dourados/MS, 10 de Março de 2015.

Aos meus pais e irmã, Alvarino,

Joselda e Tamiris.

Dedico.

AGRADECIMENTOS

Agradeço,

A Deus pela oportunidade obtida e pela satisfação da finalização deste trabalho. Ao Prof. Dr.

Gustavo Graciano Fonseca, pela orientação, auxílio e aprendizagem.

Ao Prof. Dr. Lucas Pizzuti, pela co-orientação, paciência e toda a atenção dispensada a mim.

A Prof^a. Dr^a Farayde Matta Fakhouri, pelo apoio incondicional, amizade e aprendizagem.

Aos colegas do LANAQ e do LSCM, pela ajuda e compreensão durante os dois anos de mestrado, em especial a Camila, Valkírea e Janina pela amizade, pelos papos descontraídos e apoio prestado em relação às queridas “backs” (bactérias).

A Cinthia pela ajuda em muitas dúvidas e ensinamentos sobre o GC/MS.

As técnicas da FAEN, Lígia, Priscilla, Mari e Andressa pelo apoio nos laboratórios.

Aos meus pais, Alvarino e Joselda, irmã Tamiris, cunhado Marcelo e meu namorado Gleison, pelo incentivo e apoio incondicional.

A todos os colegas que fiz nessa instituição e cidade, pessoas que contribuíram para meu sucesso profissional.

A CAPES, pela bolsa concedida.

A todos que contribuíram direta e indiretamente para a realização deste trabalho.

LISTA DE ABREVIATURAS

ASTM.....	Sociedade Americana de Testes e Materiais
CG/EM	Cromatografia gasosa acoplada à espectrômetria de massas
CMS.....	Carne mecanicamente separada
CN.....	Caldo nutriente
η -CPBA	Ácido metacloroperbenzóico
DRX.....	Difratometria de raios-X
DSC	Calorimetria diferencial de varredura
EPMA.....	Éster epoxidado de macaúba
EPMI.....	Éster epoxidado de milho
EPPA	Éster epoxidado de pacu
EPPI.....	Éster epoxidado de pintado
EPSO	Éster epoxidado de soja
FEE.....	Filmes de ésteres epoxidados
FEEPHA	Filmes de ésteres epoxidados com polihidroxialcanoatos
GEL	Gelatina
ICB-USP.....	Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo
LFM.....	Laboratório de Fisiologia de Micro-organismos
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
MM.....	Meio mineral
m/z.....	Razão massa/carga
PGA	Poliglicolatos
PHA	Polihidroxialcanoato(s)
PHA/EPMA.....	Filme de PHA com ésteres epoxidados de macaúba
PHA/EPMI	Filme de PHA com ésteres epoxidados de milho
P(3HB)-co-(3HV).....	Poli(3-hidroxibutirato-co-3-hidroxivalerato)
PLA.....	Polilactato
PVA	Permeabilidade ao vapor de água
PVC	Policloreto de vinila
UR.....	Umidade relativa

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Formulação do meio mineral utilizado.....	29
Tabela 2: Composição da solução traço.....	29
Tabela 3: Rendimento da reação de transesterificação com diferentes fontes oleaginosas.....	38
Tabela 4: Espessura das amostras dos FEE e FEPPHA.....	40
Tabela 5: Diferença de cor das amostras de FEE e FEPPHA em relação ao “branco” (Standart).....	41
Tabela 6: Porcentagem de solubilidade em água dos FEE e FEPPHA.....	44
Tabela 7: Porcentagem de solubilidade em ácido (HCl 1N) dos FEE e FEPPHA	44
Tabela 8: Permeabilidade em vapor de água dos FEE e FEPPHA	46
Tabela 9: Valores de resistência à tração e alongação dos FEE e FEPPHA	47

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Fórmula química geral dos polihidroxicanoatos	13
Figura 2: Estrutura química dos acilgliceróis. Fonte: SOLOMONS e FRYHLE (2002)	16
Figura 3: Esquema de reação de transesterificação. Fonte: SCHUCHARDT et al.(1998)	17
Figura 4: Estrutura do epóxi ou anel oxirânico	20
Figura 5: Mecanismo de epoxidação de alcenos via peroxiácidos. Fonte:MOREIRA (2003)	20
Figura 6: Reação do ciclo-hexeno com ácido <i>meta</i> -cloroperbenzóico para formação do epóxi-ciclo-hexeno. Fonte: SILVA (2012)	21
Figura 7: Estrutura mínima de P(3HB) (superior) e estrutura mínima do P(3HB)-co-(3HV) (inferior). Fonte: COELHO et al. (2008).....	23
Figura 8: Sonda ultrassônica utilizada na epoxidação dos ésteres	28
Figura 9: Processo de produção dos bioplásticos	32
Figura 10: Diagrama de cor Hunterlab	34
Figura 11: Neutralização do <i>m</i> -CPBA com solução de NaHCO ₃ saturada	38
Figura 12: Análise de aspecto visual em fundo azul dos FEE.....	39
Figura 13: Análise de aspecto visual em fundo azul dos FEPPHA.....	40
Figura 14: Análise de cor dos filmes produzidos, através do colorímetro Konica Minolta CR-400	41
Figura 15: Variância de opacidade entre os FEE. (A análise foi realizada em triplicata e o resultado obtido através de média).....	42
Figura 16: Variância de opacidade entre os FEPPHA. (A análise foi realizada em triplicata e o resultado obtido através de média).....	43
Figura 17: Amostras dos filmes em solução de HCl 1N.....	45
Figura 18: Cápsulas de acrílico contendo as células de permeação para análise de permeação em vapor de água.....	46
Figura 19: DSC do filme considerado branco, PHA	48
Figura 20: DSC dos filmes PHA/EPMA e PHA/EPMI.....	48
Figura 21: DSC dos filmes FEPPHA, apresentando a transição endotérmica	49
Figura 22: Imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura de (a) superfície e (b) ruptura do filme PHA/EPMI.....	50
Figura 23: Imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura de (a) superfície e da (b) ruptura do filme PHA/EPMA	50

Figura 24: Imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura de (a) superfície e da (b) ruptura do filme PHA	50
Figura 25: Difração de raios-X das amostras de FEEPHA	51

RESUMO

A crescente preocupação em minimizar os efeitos do acúmulo de plásticos derivados do petróleo surge como estímulo para a procura de novas tecnologias e alternativas para a produção de plásticos biodegradáveis. O objetivo deste trabalho foi a produção e caracterização de filmes elaborados a partir de amido, gelatina e ésteres metílicos epoxidados de macaúba (*Acrocomia acuelata*), milho (*Zea Mays*), pacu (*Piaractus mesopotamicus*), pintado (*Pseudoplatystoma corruscans*) e soja (*Glycine max*) e também de filmes *multilayer* de polihidroxicanoatos (PHA) conjugados com dois dos epóxidos que apresentarem os melhores rendimentos na reação de epoxidação. Os dois tipos de filmes foram nomeados como FEE (Filmes de ésteres epoxidados) e FEEPHA (Filmes de ésteres epoxidados acrescidos de PHA). Ambos os filmes foram caracterizados quanto aos seus aspectos visuais, solubilidade em água e ácido, espessura, cor, opacidade, permeabilidade em vapor de água, resistência à tração e alongação. Nos FEEPHA houve uma caracterização adicional, incluindo as análises de DSC (Calorimetria diferencial de varredura), MEV (Microscopia eletrônica de varredura) e DRX (Difração de raios-X) a fim de avaliar as propriedades térmicas e estruturais dos filmes que continham PHA na formulação. A reação de epoxidação foi realizada com êxito, indicando através das análises de GC/EM, que houve a formação dos ésteres epoxidados derivados dos ácidos linolênico e oleico. A adição dos ésteres epoxidados aos filmes FEE não apresentou diferença significativa apenas na espessura e solubilidade em ácido, já na opacidade, permeabilidade em vapor de água, solubilidade em água, resistência à tração e alongação, esses valores se mostraram maiores comparadas à amostra do branco. Nas amostras de FEEPHA, a adição da solução filmogênica de ésteres epoxidados de macaúba e milho, também não apresentou diferença significativa em relação ao padrão, PHA, nas análises de espessura, opacidade e alongação. Porém houve diferença nos testes de solubilidade em água, permeabilidade em vapor de água, resistência à tração e solubilidade em ácido. Através dos resultados das técnicas de DSC, MEV e DRX, foi possível concluir que houve a incorporação polimérica entre o amido e o PHA.

Palavras-chave: Filme, éster, epoxidação, amido, polihidroxicanoato.

ABSTRACT

The growing concern to minimize the effects of plastic derived from oil accumulation appears as a stimulus to the search for new and alternative technologies for the production of biodegradable plastics. The objective of this work was the production and characterization of films prepared from starch, gelatin and epoxidized methyl esters macaúba (*Acrocomia acuelata*), corn (*Zea Mays*), pacu (*Piaractus mesopotamicus*), painted (*corruscans Pseudoplatystoma*) and soybean (*Glycine max*) and also multilayer films of polyhydroxyalkanoates (PHA) combined with two of epoxides that present the best yields in the epoxidation reaction. Both types of films were named as FEE (Film epoxidized esters) and FEPPHA (Movies esters epoxidized plus PHA). Both films were characterized as to their visual aspects, solubility in water and acid, thickness, color, opacity, water vapor permeability, tensile strength and elongation. In FEPPHA there was an additional characterization, including analysis of DSC (differential scanning calorimetry), SEM (scanning electron microscopy) and XRD (X-ray Diffraction) to assess the thermal and structural properties of the films containing PHA in formulation. The epoxidation reaction was performed successfully, by indicating the analysis GC / MS, there was the formation of epoxidized esters derived from oleic and linolenic acids. The addition of the epoxidized esters FEE films showed no significant difference only in thickness and acid solubility, as opacity, water vapor permeability, water solubility, tensile strength and elongation, these values were higher compared to the blank sample . Samples of FEPPHA, adding the filmogenic solution of epoxidized esters macaúba and corn also showed no significant difference from the standard, PHA, the thickness analysis, opacity and elongation. However, there was a difference in solubility tests in water, water vapor permeability, tensile strength and acid solubility. From the results of DSC techniques, SEM and XRD, it was concluded that there was polymer incorporating between starch and PHA.

Keywords: Film, ester, epoxidation, starch, polyhydroxyalkanoate.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
2. OBJETIVOS	15
2.1 Objetivo geral	15
2.2 Objetivos específicos	15
3. REVISÃO DA LITERATURA.....	16
3.1 Óleos vegetais e animais.....	16
3.1.2 Transesterificação	16
3.1.3 Soja - <i>Glycine max</i>	17
3.1.4 Milho - <i>Zea mays</i>	17
3.1.5 Macaúba - <i>Acrocomia aculeata</i>	18
3.1.6 Pintado - <i>Pseudoplatystoma corruscans</i>	18
3.1.7 Pacu - <i>Piaractus mesopotamicus</i>	19
3.2 Epoxidação	19
3.3 Polihidroxialcanoatos	21
3.4 <i>Burkholderia sacchari</i>	23
3.5 Filmes plásticos	24
4. MATERIAS E MÉTODOS.....	26
4.1 Produção dos ésteres metílicos epoxidados.....	26
4.1.1 Substratos	26
4.1.2 Extrações dos óleos	26
4.1.2.1 Óleos vegetais.....	26
4.1.2.2 Óleos de origem animal	26
4.1.3 Transesterificação	27
4.1.4 Epoxidação dos ésteres metílicos	27
4.1.5 Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG/EM).....	28
4.2 Produção de polihidroxialcanoatos (PHA).....	28
4.2.1 Microrganismo	28
4.2.2 Meio e condições de cultivo	28
4.2.2.1 Meio CN	29
4.2.2.2 Meio mineral (MM).....	29
4.2.3 Pré-Inóculo em incubador rotativo	30

4.2.4 Inóculo em incubador rotativo.....	30
4.2.5 Concentração de biomassa.....	30
4.2.6 Extração de PHA	30
4.3 Produção dos filmes à base de ésteres metílicos epoxidados.....	31
4.3.1 Elaboração da solução filmogênica de gelatina	31
4.3.2 Elaboração da solução filmogênica de amido de milho lipofílico	31
4.3.3 Elaboração dos filmes à base de amido e de gelatina e ésteres epoxidados (FEE) - Técnica de Casting	31
4.4 Produção dos filmes à base PHA e ésteres metílicos epoxidados (FEEPHA)	32
4.5 Caracterizações dos filmes	32
4.5.1 Propriedades físicas	32
4.5.1.1 Aspecto visual	32
4.5.1.2 Espessura	33
4.5.1.3 Opacidade	33
4.5.1.4 Cor	33
4.5.2 Propriedades físico-químicas.....	34
4.5.2.1 Solubilidade em água.....	34
4.5.2.2 Solubilidade em ácido	34
4.5.3 Propriedades de barreira	35
4.5.3.1 Permeabilidade ao vapor de água (PVA)	35
4.5.4 Propriedades mecânicas.....	35
4.5.4.1 Resistência à tração e alongação	35
4.5.5 Propriedades estruturais.....	36
4.5.5.1 Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	36
4.5.5.2 Difractometria de raios-X.....	36
4.5.6 Propriedades térmicas.....	36
4.5.6.1 Calorimetria diferencial de varredura (DSC)	36
4.5.7 Análise estatística	37
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	38
5.1 Obtenção dos ésteres metílicos.....	38
5.2 Caracterização dos epóxidos	38
5.3 Caracterização dos filmes.....	39
5.3.1 Aspecto visual	39

5.3.2 Espessura	40
5.3.3 Cor	41
5.3.4 Opacidade	42
5.3.5 Solubilidade em água.....	43
5.3.6 Solubilidade em ácido.....	44
5.3.7 Permeabilidade ao vapor de água (PVA)	45
5.3.8 Resistência à tração e alongação	46
5.3.9 Calorimetria diferencial de varredura (DSC)	47
5.3.10 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	49
5.3.11 Difractometria de raios-X (D-RX).....	51
6. CONCLUSÃO	53
7. REFERÊNCIAS	55
ANEXOS	66

1. INTRODUÇÃO

Os óleos vegetais fazem parte de uma grande família de compostos químicos conhecidos como gorduras ou lipídios. São constituídos predominantemente por triésteres do glicerol com ácidos graxos, geralmente chamados triacilgliceróis ou triglicerídeos, cujos ácidos graxos contêm geralmente cadeias de 4 a 24 átomos de carbono com diferentes graus de insaturação (FARIAS, 2010).

A modificação química dos óleos vegetais é uma rota importante para obter produtos industriais usando matéria-prima de origem renovável. Uma reação importante para a indústria oleoquímica é a epoxidação, que ocorre nas posições insaturadas presentes nas moléculas dos triglicerídeos dos óleos vegetais, sendo os produtos formados mais reativos. Os óleos vegetais epoxidados são considerados intermediários promissores para uma ampla variedade de aplicações, tais como espumas poliuretanas, por abertura de anéis oxirânicos e geração de polióis; detergentes sintéticos; revestimentos; e lubrificantes (FARIAS e MARTINELLI, 2012).

Óleos vegetais epoxidados são produzidos a partir da reação de perácidos orgânicos com triacilglicerídeos insaturados, tais como os presentes nos óleos de soja, de girassol e de linhaça, formando um grupamento epóxi, ou anel oxirânico, na estrutura do material graxo. Por se tratar de um produto derivado de uma mistura de substâncias de ocorrência natural, não é possível definir uma estrutura química precisa para os óleos vegetais epoxidados, cujas propriedades permitem sua aplicação direta como plastificantes secundários para o policloreto de vinila (PVC) (PEDROZO, 2009). Baseado nisso, a junção desses epóxidos com polímeros biodegradáveis na obtenção de um plástico, considerado “verde” ou que agrida menos o meio ambiente onde é descartado, é uma possibilidade para a diminuição do acúmulo de plásticos sintéticos.

O acúmulo de resíduos plásticos atualmente é grande e a sua degradação é lenta. Em um estudo recente foi mostrado que partículas de plástico estão presentes nos mares de todo o mundo (COZAR et al., 2014). A reciclagem de materiais plásticos ajuda a amenizar um pouco a situação, mas só em parte. Por consequência, a substituição de um plástico não degradável por um biopolímero totalmente degradável, obtido a partir de fontes de carbono renováveis, seria uma solução muito mais completa para o problema (ALMEIDA et al., 2004).

Como resposta a esta crescente preocupação com os problemas ambientais causados pela produção e acúmulo de materiais plásticos de origem petroquímica, bem como o esgotamento das fontes de combustíveis fósseis, muitos países estão realizando estudos de gerenciamento e diminuição do volume de lixo sólido, além da busca por alternativas para as embalagens plásticas tradicionais, e.g. a produção de materiais plásticos biodegradáveis, a partir de fontes renováveis de carbono (LEE, 1996).

A utilização de recursos renováveis na preparação de filmes plásticos para o uso em embalagens aumentou muito nos últimos anos, e a descoberta de procedimentos que permitem extrusar o amido pelo processo clássico desenvolvido para polímeros termoplásticos de origem petroquímica criou uma nova área de pesquisas resultando numa grande quantidade de aplicações comerciais (BASTIOLI et al., 1994).

Uma alternativa para a produção de plásticos sem a agressão ao meio ambiente é a fabricação dos polihidroxicanoatos (**Figura 1**), pois em razão de suas características termoplásticas pode ser aplicado em diversas espécies de produtos.

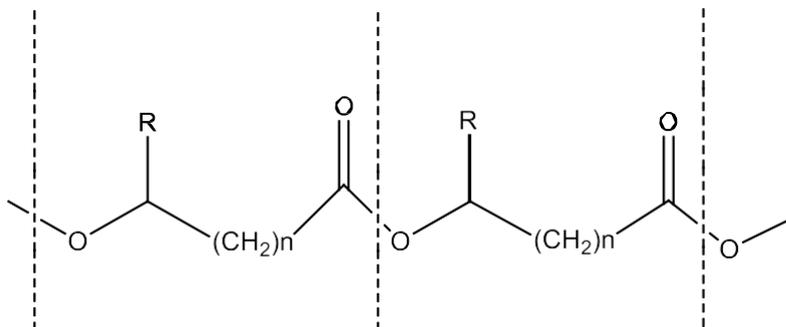


Figura 1: Fórmula química geral dos polihidroxicanoatos (PHA).

Atualmente, existem mais de 100 tipos diferentes de polihidroxicanoatos (PHA) cuja variação depende ou da estrutura da cadeia lateral ou do número de átomos de carbono entre as duas ligações éster (STEINBÜCHEL e VALENTIN, 2006). Visando o aumento de aplicações, vislumbra-se a conjugação de PHA com ésteres epoxidados na produção de biofilmes que contenham propriedades superiores a dos filmes feitos por essas matérias primas separadamente. Estes biofilmes são filmes finos preparados a partir de materiais biológicos, que agem como barreira a elementos externos e, conseqüentemente, podem proteger o produto embalado de danos físicos e biológicos e aumentar a sua vida útil (HENRIQUE et al., 2008).

Nesta década tem-se notado um significativo aumento de novas fórmulas e procedimentos para elaboração de filmes biodegradáveis, que se destacam cada vez mais no cenário mundial, principalmente por ser uma alternativa aos plásticos convencionais, conhecidamente de difícil controle quando descartados na natureza devido ao elevado tempo que levam para serem decompostos (RETT, 2010).

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O objetivo principal do trabalho foi a produção e a caracterização de filmes obtidos a partir de ésteres graxos epoxidados, polihidroxicanoatos (PHA) e suas combinações.

2.2 Objetivos específicos

- Extrair e transesterificar os óleos de soja, milho, macaúba, pintado e pacu, para a obtenção dos ésteres graxos.
- Epoxidar os ésteres metílicos através do ácido *m*-cloroperbenzóico.
- Produzir filmes plásticos através de amido, gelatina e ésteres epoxidados.
- Extrair PHA a partir de cultivos com a bactéria *Burkholderia sacchari*.
- Produzir filmes de epóxidos conjugados com PHA.
- Caracterizar as amostras de filmes obtidos a partir de análises visuais, espessura, cor, opacidade, solubilidade em água e ácido, permeabilidade em vapor de água, além de propriedades mecânicas, estruturais e térmicas.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Óleos vegetais e animais

Óleos e gorduras são substâncias insolúveis em água, formadas predominantemente de produtos da condensação entre glicerol e ácidos graxos, chamados triglicerídeos ou triacilgliceróis (MORETTO e FETT, 1998). Além dos triglicerídeos, outros acilglicerídeos são resultantes da condensação da glicerina com ácidos carboxílicos, denominados monoglicerídeos e os diglicerídeos, que podem ser vistos na **Figura 2** (SOLOMONS e FRYHLE, 2002).

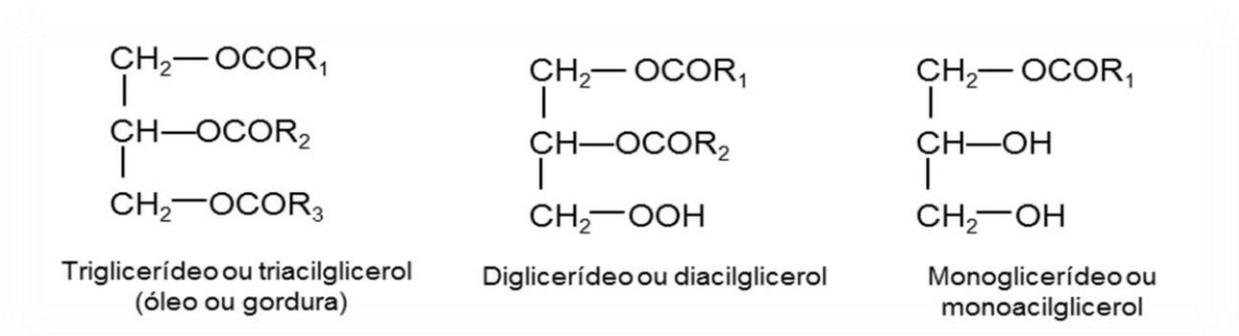


Figura 2: Estrutura química dos acilgliceróis. Fonte: SOLOMONS e FRYHLE (2002).

Dependendo do tamanho da cadeia carbônica, do número e da posição das duplas ligações e linearidade (estereoespecificidade, *cis* e *trans*), os lipídios tem diferentes propriedades físicas e químicas. Os ácidos graxos apresentam diferentes tamanhos de cadeia de 3 a 24 átomos de carbono. Os ácidos graxos podem ser saturados ou insaturados. Os ácidos graxos insaturados, por possuírem duplas ligações, são considerados quimicamente mais instáveis. Quando possuem apenas uma dupla ligação são denominados monoinsaturados; com duas ou mais duplas ligações, são chamados de polinsaturados (BELL et al., 1997).

3.1.2 Transesterificação

A transesterificação é um termo geral usado para descrever uma importante classe de reações orgânicas, onde um éster é transformado em outro, através da troca do resíduo alcoila. Quando o éster original reage com um álcool, o processo de transesterificação (**Figura 3**) é denominado alcoólise. Esta reação é reversível e prossegue essencialmente

misturando os reagentes. Contudo, a presença de um catalisador (ácido ou base) acelera consideravelmente esta conversão, como também contribui para aumentar o rendimento da mesma (MEHER et al., 2004; SCHUCHARDT et al., 1998). A transesterificação mostra-se como uma opção para melhorar o desempenho dos óleos vegetais como combustíveis, sendo um processo simples, cujo produto denominado de éster alquílico, tem características similares ao óleo diesel obtido do petróleo (FROEHNER et al., 2007).

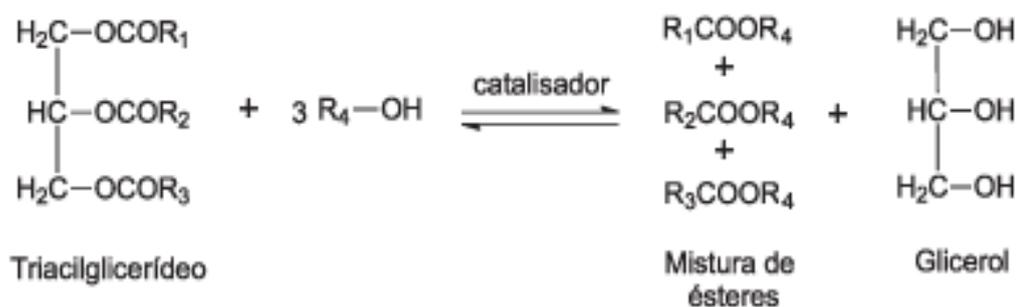


Figura 3: Esquema de reação de transesterificação. Fonte: SCHUCHARDT et al. (1998).

3.1.3 Soja - *Glycine max*

A soja (*Glycine max*) cultivada no Brasil, para a produção de grãos, é uma planta herbácea, da Classe Rosidaeae, Ordem Fabales, Família Fabaceae, Subfamília Papilionoideae, Tribo Phaseoleae, Gênero *Glycine*. As principais variedades comerciais apresentam caule hispido, pouco ramificado e raiz com eixo principal e muitas ramificações (EMBRAPA, 2014).

A soja é a cultura com maior área cultivada e produção no Brasil em decorrência do bom preço dessa commodity nas últimas safras e do desenvolvimento de tecnologias para a cultura. Estima-se que, na safra 2013/2014, a soja foi cultivada em 30.033,0 mil hectares, alcançando uma produção de 86.569,2 mil toneladas (CONAB, 2015).

3.1.4 Milho - *Zea mays*

O milho pertence ao Reino Plantae; Divisão Anthophta; Classe Monocotiledonae; Ordem Poales; Família Poaceae (Gramineae); Gênero *Zea*. O Gênero *Zea* é composto por um grupo de gramíneas, algumas perenes e outras anuais, nativas do México e outros países da América Central (DOEBLEY, 1990).

Cultivo dos mais tradicionais, o milho tem assumido importante papel socioeconômico no Brasil, colocando-se em posição de relevância no que se refere a valor da produção agropecuária, área plantada e volume produzido, em especial nas regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste. Entretanto, apesar da evolução gradativa ocorrida nas quantidades totais produzidas, a produção de grãos por unidade de área ainda não expressa todo o potencial genético dos materiais recomendados pela pesquisa (FANCELLI e DOURADO NETO, 2001).

3.1.5 Macaúba - *Acrocomia aculeata*

A macaúba (*Acrocomia aculeata*) é uma palmeira do Gênero *Acrocomia*, pertencente à Família *Arecaceae*, dentro da Ordem *Arecales*, da Classe *Liliopsida*, Divisão *Magnoliophyta*, do Reino *Plantae* (MOURA, 2007). O termo *Acrocomia* tem origem grega e descreve a forma como as folhas estão dispostas na planta, '*Akron*' (cima) e '*Kome*' (cabeleira), sugerindo o formato de coroa (NOVAES, 1952; HENDERSON et al., 1995).

A macaúba é uma das palmeiras mais promissoras no Brasil como fonte de óleo para as indústrias cosméticas, de alimentos e de combustíveis. Os frutos de macaúba fornecem dois tipos de óleo economicamente importantes: óleo de polpa e óleo de amêndoa (CICONINI, 2012).

Se apenas 1% do território brasileiro for plantado com macaúba, 8,5 milhões de hectares, poderemos produzir 34 bilhões de litros de óleo vegetal, para produção de biodiesel, bioquerosene e como matéria química na indústria química (MELO, 2012)

3.1.6 Pintado - *Pseudoplatystoma corruscans*

De acordo com Lundberg e Littman (2003) a classificação taxonômica do pintado é a seguinte: Classe *Osteichthyes*, Ordem *Siluriformes* e Família *Pimelodidae*. Sua distribuição inclui os maiores rios das bacias hidrográficas da região biogeográfica Neotropical: o rio Paraná, Amazonas, Orinoco, São Francisco, entre outros (BURGESS, 1989).

Mais recentemente, o surubim ou pintado como é conhecido na região sudeste, passou a merecer grande atenção dos piscicultores na região Centro-Oeste do Brasil, despertando o interesse em sua criação em sistema intensivo, impulsionado pelo domínio das técnicas de propagação artificial e condicionamento alimentar destas espécies,

principalmente, por empreendimentos privados (CAMPOS, 2003; 2005).

3.1.7 Pacu - *Piaractus mesopotamicus*

O pacu, membro da Família Characidae e da Subfamília Serrasalminae, conhecido pelo nome científico de *Colossoma mitrei* (Berg, 1895), teve redescoberta sua classificação mais antiga, voltando a ter o nome de *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887). Alimenta-se basicamente de folhas e de frutas de árvores, o que leva a crer que tenha habilidade especial na digestão e na absorção de alimentos grosseiros, ricos em carboidratos. É uma espécie onívora, mas apresenta hábito alimentar especificamente frugívoro e herbívoro, do tipo podador, e de caráter oportunista (DIAS-KOBERSTEIN et al., 2005).

O pacu, *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887) – espécie bastante cultivada nas regiões Sudeste e Centro Oeste do país, possui ampla distribuição geográfica na América do Sul, sendo encontrado desde a Bacia dos Rios Paraguai- Uruguai até a Bacia do Rio Prata. Na natureza, o pacu é um peixe rústico que utiliza alimentos bastante diversificados, variando as fontes em função da sazonalidade (ABIMORAD e CARNEIRO, 2004).

3.2 Epoxidação

A utilização de óleos e gorduras para a produção de produtos químicos e materiais que podem substituir os derivados de petróleo está se tornando de grande importância. Óleos vegetais, seus ácidos graxos insaturados e respectivos ésteres estão sendo convertidos a epóxidos, que são versáteis intermediários em síntese orgânica por participarem de inúmeras reações devido à alta reatividade do seu anel oxirânico (ORELLANA-COCA, 2005). Essa reatividade diferenciada torna os epóxidos substâncias de grande interesse sintético, pois estes podem reagir com uma grande variedade de nucleófilos formando uma série de produtos multifuncionalizados (SLAYDEN et al., 1993).

A epoxidação é aplicável a compostos que tenham ligações insaturadas em suas cadeias carbônicas, visando transformar essas ligações em grupos oxirânicos mediante processos adequados e controlados de oxidação (RITTNER, 2001). A estrutura do grupo epóxi pode ser observada na **Figura 4**, na qual, R e R' podem ser considerados como sendo cadeias carbônicas.

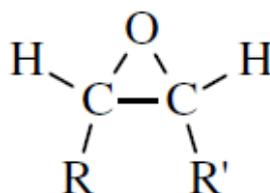


Figura 4: Estrutura do epóxi ou anel oxirânico.

Mudanças ocorridas no cenário mundial vêm alterando a visão geral no sentido de desenvolver processos em consonância com o conceito da chamada “química limpa”. Algumas ações podem ser adotadas a fim de diminuir ou eliminar estes problemas, tais como o uso de reagentes alternativos e o uso de catalisadores, o que leva a um aumento na eficiência dos processos, facilita a separação de produtos da reação e a reciclagem dos reagentes/catalisadores (FARIAS e MARTINELLI, 2012).

Ésteres graxos epoxidados são normalmente obtidos em grande escala principalmente por processos utilizando perácidos (RANGARAJAN et al., 1995). O oxidante perácido é obtido *in situ* quando o ácido carboxílico reage com peróxido de hidrogênio na presença de um catalisador ácido. O perácido reage nas insaturações para a formação do anel epóxido (GOUD et al., 2006). A vantagem da utilização do H₂O₂ como oxidante é que este produz água como subproduto. Normalmente emprega-se também o ácido fórmico e peróxido de hidrogênio. Esse sistema tem a vantagem de dispensar catalisadores para a formação de ácido percarboxílico, porém, tem a desvantagem da formação de subprodutos pela abertura do anel oxirano em meio ácido (tais como dióis, dímeros e ésteres) (GAN et al., 1992).

As reações de epoxidação via perácidos (**Figura 5**) estão intimamente ligadas à densidade eletrônica na ligação C=C e pelos grupos eletro-atrativos nos perácidos (SLAYDEN et al., 1993). A reação de epoxidação que utiliza perácidos como agente oxidante é conhecida como reação de Prilezhaev (CLAYDEN et al., 2001).

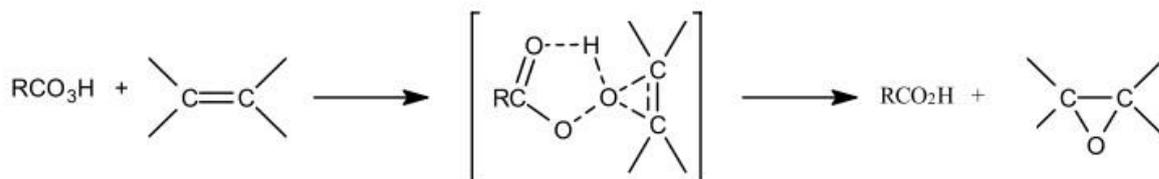


Figura 5: Mecanismo de epoxidação de alcenos via peróxi-ácidos. Fonte: MOREIRA (2003).

A epoxidação de olefinas com perácidos é usualmente realizada em solventes apróticos de baixa polaridade, como diclorometano, clorofórmio e benzeno. Estes promovem seletividade à reação, protegendo o anel oxirânico e evitando que ocorra hidroxilação (WALLACE et al., 1958).

O perácido mais comumente usado é o ácido *m*-cloroperbenzóico conhecido como *m*-CPBA, que reage com olefinas para formação de epóxidos (**Figura 6**).

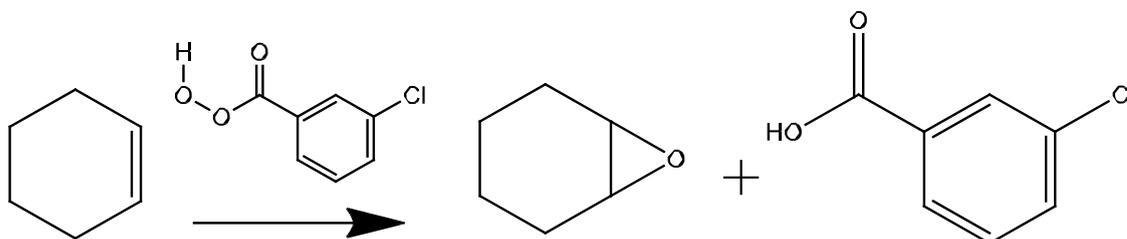


Figura 6: Reação do ciclo-hexeno com ácido *meta*-cloroperbenzóico para formação do epóxi- ciclo-hexeno (SILVA, 2012)

3.3 Polihidroxicanoatos

Polímeros biodegradáveis são definidos como polímeros que são degradados e catabolizados a dióxido de carbono e água, por microrganismos presentes no meio ambiente (OKADA, 2002). Os polímeros biodegradáveis podem ser divididos em polinucleotídeos, poliamidas, polissacarídeos, poliésteres, politioésteres, polifosfatos, poliisoprenóides e polifenóis (TOKIWA e UGWU, 2007).

Os biopolímeros, são um tipo especial de polímero que envolve organismos vivos no processo de síntese (ASTM D6866-06). Tem, portanto, parcial ou totalmente, origem bioquímica, podendo ser parcial ou totalmente produzidos a partir de materiais naturais, renováveis (biomassas) e pode ser biodegradável atendendo à norma ASTM D6400-04 ou não ser biodegradável (FAKHOURI, 2009).

Os polidroxialcanoatos (PHA) são poliésteres sintetizados por inúmeras bactérias, como um material de reserva energética, geralmente quando um nutriente essencial, tal como, nitrogênio, fósforo, enxofre ou oxigênio, é limitado, na presença de excesso de fonte de carbono. Os PHA são considerados fortes candidatos a material plástico biodegradável porque possuem propriedades similares a vários plásticos convencionais correntemente em

uso (do polipropileno a borrachas sintéticas) e são completamente degradados a dióxido de carbono e água, quando descartados no meio ambiente (FONSECA, 2003).

A produção industrial de PHA iniciou em 1982 pela Imperial Chemical Industries (ICI), que inicializou a venda deste polímero com o nome de Biopol. O Biopol foi utilizado desde 1990 na Alemanha para manufaturar frascos de xampu para a indústria de cosméticos Wella. Atualmente, a produção realizada pela ICI é comercializada pela Monsanto (BRAUNEGG et al. 1998).

Em 1990 a produção de PHA no Brasil começou a ser estudada. Um projeto de pesquisa reuniu o Instituto de Pesquisas Tecnológicas do Estado de São Paulo (IPT), a Universidade de São Paulo (USP) e a Copersucar, para iniciar os estudos de PHA no Brasil, visando a produção de plásticos biodegradáveis a partir da cana-de-açúcar por via biotecnológica. Como resultado, a Copersucar produziu o homopolímero P(3HB) e o copolímero P(3HB-co-3HV), utilizando a linhagem *Raustonia eutropha* DSMZ 545 (RODRIGUES, 2002).

Tão importante quanto à biodegradabilidade dos PHA, é o fato de que sua produção ocorre a partir de fontes de carbono renováveis. Alguns processos fermentativos, para a produção de PHA, utilizam produtos agrícolas, tais como, açúcares e ácidos graxos, como fontes de carbono e energia. Estes produtos são derivados do CO₂ e água e, após sua conversão em PHA, são novamente convertidos em CO₂ e água, fechando completamente o ciclo do carbono (FONSECA, 2013).

Estes polímeros são degradados eficientemente por micro-organismos de solo que são capazes de secretar polihidroxibutirato despolimerases, enzimas que hidrolisam as ligações éster do polímero tornando-os monômeros ou oligômeros solúveis em água (CHANPRATEEP, 2010).

Existem no mercado, diversos plásticos biodegradáveis tais como polihidroxialcanoatos (PHA), polilactato (PLA) e poliglicolatos (PGA) (PRADELLA, 2006). Os PHAs são termoplásticos e possuem propriedades físicas e químicas muito semelhantes as do polipropileno, o que os torna possíveis candidatos progressivamente mais aplicáveis na sua substituição (SERAFIM et al., 2003).

A diversidade de polímeros da família de PHA e de seu vasto potencial de aplicação, depende da variação do comprimento e da composição das cadeias. Sendo o polihidroxibutirato P(3HB) (**Figura 7**), o principal representante dessa família de PHA e, juntamente com o poli-3-hidroxibutirato-co-3-hidroxivalerato P(3HB-co-3HV), são os mais estudados (BRUNEL, 2008).

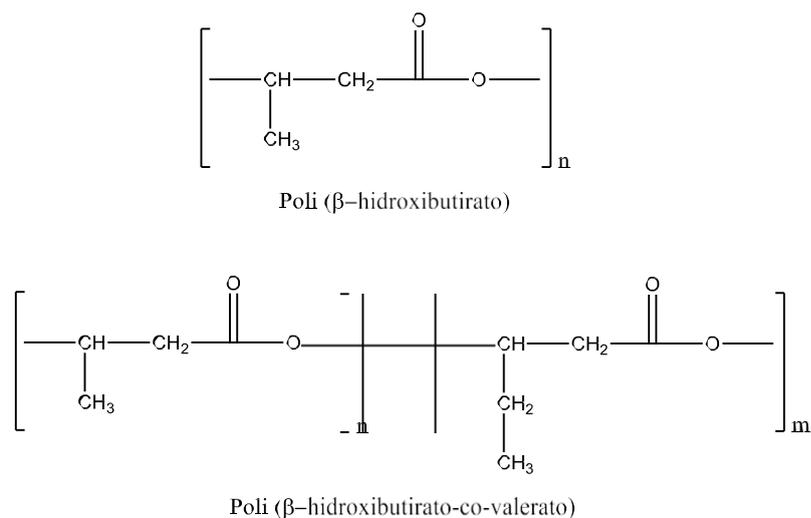


Figura 7: Estrutura mínima de P(3HB) (superior) e estrutura mínima do P(3HB)-co-(3HV) (inferior). Fonte: COELHO et al. (2008).

A importância biotecnológica destes materiais está no fato de poderem ser aplicados na produção de plásticos e elastômeros biodegradáveis sendo, além disso, biocompatíveis. Suas aplicações encontram-se em diversas áreas, como: agroindustrial (braçadeiras), biomédica (indicados para engenharia de tecido duro ou material de substituição de ossos) e indústria de embalagens de uma maneira geral (SANT’ANA, 2013)

3.4 *Burkholderia sacchari*

A bactéria *Burkholderia sacchari* LFM101 foi isolada de solo de canavial brasileiro (*Saccharum officinarum*), é uma bactéria gram-negativa, possui muitos flagelos polares, sua forma é de bastonete, medindo 0,5 a 0,8 μm de comprimento. Sua temperatura ideal de crescimento está entre o intervalo 28 a 30 °C e pode acumular mais de 68% de sua massa seca celular na forma de grânulos de poli-3-hidroxi-butilato P(3HB) a partir de sacarose (BRÄMER et al., 2001). *B. sacchari* atinge eficiência de conversão de glicose em P(3HB) de aproximadamente 80% da eficiência máxima teórica, entretanto, um pouco inferior da linhagem mais amplamente estudada para produção de P(3HB), denominada *Cupriavidus necator* (GOMEZ et al., 1996). Uma das vantagens da *B. sacchari* LFM101 sobre *C. necator* é sua capacidade de hidrolisar a sacarose, permitindo a produção de P(3HB) sem a necessidade de operação industrial adicional para promover a hidrólise prévia desse dissacarídeo e tornando o custo de produção do polímero mais atrativo (GOMEZ et al., 1996).

3.5 Filmes biodegradáveis

Os biofilmes ou filmes biodegradáveis são materiais finos e flexíveis produzidos a partir de biopolímeros, que podem atuar, quando utilizados como embalagem, como barreira a elementos externos e proteger o produto embalado de danos físicos e biológicos aumentando sua vida útil. Ainda, podem ser utilizados como material de suporte no encapsulamento ou imobilização de materiais que necessitem uma retardação no processo de liberação de princípios ativos ou nutrientes (HENRIQUE et al., 2008).

Diversos estudos têm sido realizados para melhorar as propriedades mecânicas e de barreira dos biofilmes produzidos a partir de fontes renováveis, pois esses materiais são uma alternativa promissora para reduzir os impactos ambientais causados pelo uso de polímeros sintéticos. Apesar do interesse nestes materiais ter crescido muito nos últimos tempos, o alto custo de sua produção ainda é uma grande desvantagem em relação aos polímeros utilizados atualmente (FRANCHETTI e MARCONATO, 2006).

Coberturas e biofilmes a base de lipídios produzidos com ceras, óleos ou ácidos graxos são efetivos como barreira à umidade, devido ao seu caráter hidrofóbico. Coberturas e biofilmes feitos de polissacarídeos (celulose, pectina, amido, alginatos, quitosana e gomas) apresentam boa barreira a gases (O_2 e CO_2), mas não a água, provavelmente relacionada à alta polaridade deste tipo de filme (DAVANÇO, 2007).

O desenvolvimento de novos materiais que sejam renováveis e biodegradáveis tem ressaltado os polissacarídeos, o que tem levado as indústrias a intensificar novos desenvolvimentos a partir de fontes naturais. Dentre esses, vários estudos têm demonstrado que o amido é uma matéria prima particularmente interessante devido à combinação atrativa do preço competitivo em relação aos materiais convencionais e a facilidade de obtenção, sendo um polímero totalmente biodegradável (FUNKE et al., 1998; FEIL, 1995; NAYAK, 1999; GROS e KALRA, 2002).

Inúmeros estudos têm sido realizados sobre caracterização das propriedades funcionais de filmes de amido, pois, conforme Mali, Grossmann e Yamashita, (2010), o amido é uma matéria-prima abundante em todo o mundo, apresenta muitas possibilidades de modificação química, física ou genética e origina filmes e revestimentos resistentes. Além disso, os biofilmes de amido apresentam potencial de aplicação nos setores alimentício, agrícola, farmacêutico e em diversos setores onde a biodegradabilidade é requerida (BATISTA et al., 2005; BASTIOLI, 2005).

Os filmes e coberturas podem ser simples, compostos ou ainda serem formados por camadas. Os filmes compostos de proteínas e lipídeos apresentam a vantagem de reunir os pontos positivos de cada um, já que filmes hidrofóbicos apresentam boa barreira ao vapor de água e filmes hidrofílicos apresentam boa barreira a gases, além de propiciar boas propriedades mecânicas (AMARANTE e BANKS, 2001). Os filmes compostos por duas ou mais camadas diversas são chamados de *multilayer*.

4. MATERIAS E MÉTODOS

4.1 Produção dos ésteres metílicos epoxidados

4.1.1 Substratos

Os substratos oleaginosos utilizados neste projeto foram três óleos vegetais como soja (*Glycine max L*), milho (*Zea mays*) e macaúba (*Acrocomina aculeata*) e dois óleos de origem animal, de pintado (*Pseudoplatystoma corruscans*) e pacu (*Piaractus mesopotamicus*).

4.1.2 Extrações dos óleos

4.1.2.1 Óleos vegetais

Os óleos de soja e milho utilizados foram os disponíveis comercialmente. O óleo de macaúba foi extraído a partir de sua polpa por Soxhlet, utilizando hexano como solvente de extração.

4.1.2.2 Óleos de origem animal

Os óleos de pacu e pintado foram obtidos através das CMS (carne mecanicamente separada) de cada espécie.

Seguindo a metodologia de Menegazzo et al. (2014) prosseguimos com a extração. Após o descongelamento, a CMS foi lavada em pH alcalino utilizando-se bicarbonato de sódio (NaHCO_3) a 0,25% e peneirada. Nesse processo utilizou-se a proporção 1:4 (sólido:líquido) de CMS e água para as lavagens. A solução foi manualmente homogeneizada durante 5 minutos a $6,5 \pm 1,5^\circ\text{C}$, passando por um período de 20 minutos de descanso. A seguir removeu-se manualmente o resíduo gorduroso sobrenadante e peneirou-se a solução obtendo-se uma pasta.

A gordura removida da CMS passou por um processamento hidrotérmico, através de cocção em banho-maria a 40°C durante 3h. Durante o processo de aquecimento da gordura, procedia-se com a retirada do óleo sobrenadante e posteriormente a centrifugação para a melhor separação do resíduo gorduroso. O óleo removido foi imediatamente filtrado em papel filtro com sulfato de magnésio anidro e a borra restante descartada. O óleo bruto obtido foi acondicionado em recipientes plásticos.

4.1.3 Transesterificação

A reação de transesterificação foi realizada seguindo a metodologia de Froehner et al., (2007) com algumas modificações. Em um béquer de 250mL e com agitação mecânica (200 rpm) foram adicionados 90g do óleo. O óleo foi aquecido à 50°C, então, foram adicionados 40mL de etanol e 1,8g de hidróxido de potássio (equivalente a 2% da massa do óleo). A mistura foi agitada por 2h para garantir a completa esterificação do óleo.

Foi possível observar o andamento da reação devido ao brusco escurecimento da mistura e, em seguida, retorno a uma coloração original, mais clara. A mistura reacional foi colocada em um funil de separação de 250mL. Após a decantação e separação, a fase contendo o éster, foi lavada com água destilada e posteriormente com solução de NaCl saturada.

4.1.4 Epoxidação dos ésteres metílicos

O processo de epoxidação dos óleos foi realizado seguindo a metodologia de Silva (2012) com algumas modificações. Preparou-se uma mistura de éster/ácido *m*-cloroperbenzóico (*m*-CPBA) (1:1,5) em 20mL de clorofórmio. Posteriormente essa mistura foi submetida a ultrassom através da sonda ultrassônica SONICS *Vibra Cell* 500 W (**Figura**

8) operando a 20KHz e banho de gelo por 10 minutos, após decorrido este período, retirou-se o banho de gelo e a reação prosseguiu por mais 1h a 30°C, ainda em ultrassom. Ao final, a reação foi lavada a quente com aproximadamente 1,5L de solução saturada de bicarbonato de sódio para neutralizar a acidez e extrair a fase orgânica (o acompanhamento da lavagem foi feito por monitoramento com fita de pH), que foi filtrada e seca com sulfato de magnésio anidro, posteriormente a fase orgânica foi rotaevaporada para eliminação de traços de solvente. As amostras foram nomeadas com os seguintes códigos, **EPMA** para a amostra de Macaúba, **EPMI** para a amostra de Milho, **EPPA** para a amostra de Pacu, **EPPI** para amostra de Pintado e **EPSO** para a amostra de Soja.



Figura 8: Sonda ultrassônica utilizada na epoxidação dos ésteres.

4.1.5 Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG/EM)

Para a realização da análise dos ésteres metílicos antes e depois da epoxidação, foi utilizado um cromatógrafo gasoso acoplado a espectrômetro de massas marca Varian, modelo GC-431/MS 210. Para a fragmentação dos compostos, os mesmos foram bombardeados com feixe de elétrons de 70eV. As amostras foram dissolvidas em metanol (grau espectroscópico) e injetadas a fluxo constante de 1mL/min com hélio como gás de arraste. Foi utilizada uma coluna capilar Varian Factor Four™ (30m×0,25mm). Para a análise cromatográfica foi utilizada uma rampa de aquecimento em um intervalo de 80-230°C, em uma taxa de 10°C/min até atingir a temperatura final, na qual foi mantida durante 15 min.

4.2 Produção de polihidroxialcanoatos (PHA)

4.2.1 Microrganismo

O microrganismo utilizado para a produção de PHA foi a *Burkholderia sacchari* LFM 101, que foi disponibilizada pelo Laboratório de Fisiologia de Microrganismos do ICB/USP. A mesma foi mantida em ampola liofilizada e também armazenada em glicerol 10% a -80°C.

4.2.2 Meio e condições de cultivo

Foram realizados cultivos com os seguintes meios de cultura: Meio caldo nutriente (CN), meio caldo nutriente acrescido de ágar e meio mineral (MM). Os meios de cultivo utilizados foram esterilizados em autoclave por 15 minutos a 121°C.

4.2.2.1 Meio CN

Este meio de cultura foi utilizado para obtenção de crescimento e manutenção celular. Sua composição corresponde a 3g.L⁻¹ de extrato de carne, 5g.L⁻¹ de peptona. Para obtenção do caldo nutriente acrescido de ágar, adicionou-se 20g.L⁻¹ de ágar-ágar (ROCHA et al., 2008).

4.2.2.2 Meio mineral (MM)

B. sacchari LFM 101 foi cultivada em meio MM, quimicamente definido (LEE e CHOI, 2001), nos experimentos que visavam o uso substratos de baixo custo, conforme representa as **Tabelas 1 e 2**.

Tabela 3. Formulação do meio mineral utilizado.

Componentes	Concentração
KH ₂ PO ₄	6,67g.L ⁻¹
(NH ₄) ₂ HPO ₄	4g.L ⁻¹
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,8g.L ⁻¹
Ácido cítrico	0,8g.L ⁻¹
Tiamina	0,02 g.L ⁻¹
Solução traço	0,5mL/L
Fonte de carbono	10g.L ⁻¹

Tabela 4. Composição da solução traço.

Componentes	Concentração
FeSO ₄ .7H ₂ O	10g.L ⁻¹
CaCl ₂	2g.L ⁻¹
ZnSO ₄ .7H ₂ O	2,2g.L ⁻¹
MnSO ₄ .4H ₂ O	0,5g.L ⁻¹
CuSO ₄ .5H ₂ O	1,0g.L ⁻¹
(NH ₄) ₆ Mo.7O ₂₄ .4H ₂ O	0,1g.L ⁻¹
Na ₂ B ₄ O ₇ .10H ₂ O	0,02g.L ⁻¹

Foi utilizado como fonte de carbono a glicose ($10\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$). O preparo da glicose constituiu na homogeneização e esterilização, sendo autoclavada separadamente do meio mineral e adicionada assepticamente ao meio juntamente com a vitamina.

4.2.3 Pré-Inóculo em incubador rotativo

B. sacchari LFM 101 foi cultivada inicialmente em meio nutriente CN acrescido de ágar por 48 h em estufa a 30°C . As culturas isoladas foram inoculadas em CN durante 24h a 30°C em agitação de 250rpm.

Posteriormente, para o preparo do pré-inóculo incidiu em recolher a partir de uma placa de petri uma pequena quantidade de colônia da cepa para um frasco Erlenmeyer de 500 mL, contendo 220mL de meio mineral e 30 mL de glicose. O cultivo foi realizado em incubador rotativo a 250rpm a 30°C .

4.2.4 Inóculo em incubador rotativo

Os inóculos principais foram realizados em duplicada em condições idênticas aos pré- inóculos, a partir de uma alíquota do mesmo, avaliando a densidade óptica.

4.2.5 Concentração de biomassa

A concentração da biomassa foi medida por gravimetria a partir do meio de cultivo, sendo o mesmo submetido à centrifugação a 1.100rpm por 40 min descartando o sobrenadante, o precipitado foi seco em estufa a 50°C .

4.2.6 Extração de PHA

PHA foram extraídos, com clorofórmio das células secas, usando-se um extrator Soxhlet. Após um período de refluxo de 12h, a solução de clorofórmio foi concentrada com um evaporador giratório e o polímero precipitado pela adição de etanol. O filtrado foi seco em estufa por 24h á 35°C e posteriormente em clorofórmio (proporção de 0,8g de PHA para 60mL de CHCl_3). O polímero foi seco, vertendo 15mL em placas de petri de 10cm de diâmetro.

4.3 Produção dos filmes à base de ésteres metílicos epoxidados

4.3.1 Elaboração da solução filmogênica de gelatina

A solução filmogênica de gelatina foi obtida hidratando-se 5g de gelatina tipo A (Leiner Davis Gelatin, Brasil) (GEL) em 100mL de água destilada por 1 h. Após este período, a solução foi aquecida a 70°C por 10 minutos (FAKHOURI, 2009).

4.3.2 Elaboração da solução filmogênica de amido de milho lipofílico

A solução filmogênica de amido foi elaborada dispersando-se 3g de amido de milho em 100mL de água destilada. O amido utilizado foi o amido de milho nativo modificado (Corn Products, Brasil); Após a total dispersão, acrescentou-se 15% da amostra de éster epoxidado em relação à massa da macromolécula, e as suspensões foram aquecidas a 85°C por 10 minutos, sob agitação até a completa solubilização do amido (FAKHOURI, 2009).

4.3.3 Elaboração dos filmes à base de amido e de gelatina e ésteres epoxidados (FEE) - Técnica de Casting

As soluções filmogênicas obtidas separadamente conforme os itens acima foram misturadas nas proporções de 4:1 (amido:gelatina) e adicionada 15% das amostras de ésteres metílicos. Foi realizado um estudo preliminar para ajustar a melhor concentração do éster epoxidado, a concentração de 15% foi a escolhida pois acima desse valor não era visualizada diferença significativa dos testes de caracterizações. Posteriormente foram aquecidas e agitadas durante 40 minutos, como pode ser vista na **Figura 9**. Alíquotas de 30 mL da solução formadora de filme foram distribuídas em placas de petri descartáveis (Prolab) de 15 cm de diâmetro. Os filmes secaram à temperatura ambiente (25°C), durante 24 h. Após a secagem, eles foram condicionados a 25°C e 50±2% UR durante 48 h antes do início das análises (FAKHOURI, 2009). Foi produzido um filme apenas de amido e gelatina, que é considerado o “branco”, a mesma recebeu o código de **Amido/Gel**, todas as outras amostras de filmes de amido, gelatina e ésteres epoxidados adotaram os códigos de seus respectivos epóxidos.

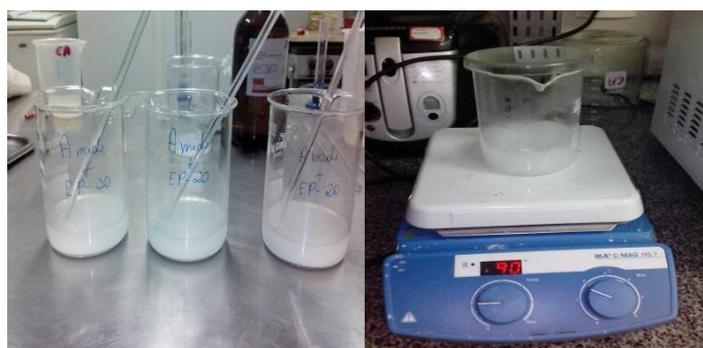


Figura 9: Processo de produção dos bioplásticos.

Considerando o maior rendimento da reação de epoxidação, disponibilidade na região (Cerrado) e custo, foram selecionadas as amostras EPMA e EPMI para a produção de filmes com a adição de PHA. Os mesmos foram caracterizados pelas mesmas técnicas que os FEE se submeteram, porém houve o aprofundamento dos estudos em relação às propriedades térmicas e estruturais.

4.4 Produção dos filmes à base PHA e ésteres metílicos epoxidados (FEEPHA)

Os filmes contendo PHA em sua formulação foram produzidos pela modificação do método descrito por Fakhouri, 2009. Foi separado um filme de PHA para utilizar como branco para as amostras derivadas do mesmo. O filme de PHA com éster epoxidado de macaúba e milho receberam os códigos **PHA/EPMA** e **PHA/EPMI** respectivamente, já o filme separado e considerado branco recebeu o código de **PHA**.

4.5 Caracterizações dos filmes

4.5.1 Propriedades físicas

4.5.1.1 Aspecto visual

Foram realizadas análises visuais e táteis, com intuito de se aproveitar somente os filmes homogêneos (coloração uniforme e ausência de bolhas e partículas insolúveis de gelatina) e flexíveis (facilidade de manuseio, ausência de rupturas ou zonas quebradiças).

4.5.1.2 Espessura

A espessura dos filmes foi determinada com a utilização de um micrômetro MITUTOYO Digimatic Co. Proof, representando a média aritmética dos valores de 5 medidas tomadas aleatoriamente em diferentes partes dos mesmos.

4.5.1.3 Opacidade

A opacidade dos filmes foi determinada utilizando-se um colorímetro Modelo CR-400 (KONICA MINOLTA, Croma Meter, Japan). As determinações foram realizadas em triplicata após a calibração do colorímetro com um fundo padrão branco e um fundo padrão negro. A opacidade foi determinada pela seguinte Equação (1), demonstrada por *Hunterlab* (1997):

$$Op = \left(\frac{Op_N}{Op_B} \right) \cdot 100 \quad (1)$$

Onde: Op = opacidade do filme (%);

Op_N = opacidade do filme sobreposto a um fundo negro;

Op_B = opacidade do filme sobreposto a um fundo branco.

4.5.1.4 Cor

A coloração dos filmes foi determinada utilizando-se um colorímetro Modelo CR-400 (KONICA MINOLTA, Croma Meter, Japan). As determinações foram realizadas em triplicata após a calibração do colorímetro com um fundo padrão branco. A coloração foi determinada pela seguinte Equação (2), demonstrada também por *Hunterlab* (1997), obedecendo o diagrama de cores (**Figura 10**).

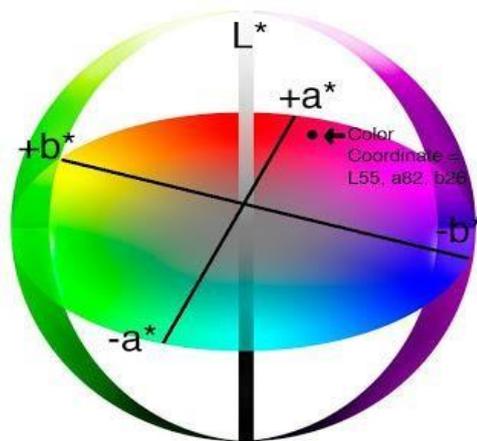


Figura 10: Diagrama de cor Hunterlab.

$$\Delta E = \sqrt{(\Delta L)^2 + (\Delta a)^2 + (\Delta b)^2} \quad (2)$$

4.5.2 Propriedades físico-químicas

4.5.2.1 Solubilidade em água

A solubilidade em água dos filmes foi determinada segundo o método proposto por Gontard et al. (1994). As amostras, em triplicata, foram preparadas recortando-se discos de 2 cm de diâmetro. A massa seca inicial das amostras foi obtida após secagem das mesmas, por um período de 24h à 105°C, em estufa de circulação e renovação de ar. Após a primeira pesagem, as amostras foram imersas em um recipiente contendo 50mL de água destilada e agitadas suavemente por 24h. Em seguida, as amostras solubilizadas foram retiradas da água e secas à temperatura de 105°C por mais 24h, para a obtenção da massa seca final.

4.5.2.2 Solubilidade em ácido

A solubilidade em ácido foi determinada preparando-se as amostras da mesma maneira que para o cálculo da solubilidade em água; porém, após a obtenção da massa seca, estas foram submersas num recipiente contendo solução 1N de ácido clorídrico por 24h. Após esse período, as amostras foram secas e pesadas para obtenção da massa final.

4.5.3 Propriedades de barreira

4.5.3.1 Permeabilidade ao vapor de água (PVA)

A permeabilidade ao vapor de água (PVA) foi determinada pelo método padrão E-96 modificado da ASTM (1998). Os filmes foram selados a fim de garantir que toda a permeação de umidade ocorresse somente através do mesmo, em seguida os mesmos foram inseridos em células de permeação contendo cloreto de cálcio e acondicionados em cápsulas de acrílico que mantiveram a temperatura de 25°C e 75% UR. O vapor de água transferido através do filme foi determinado pelo ganho de massa do cloreto de cálcio, medido a cada 1h (o resultado final é multiplicado por 24, para se obter o valor corresponde a dia). O efeito do espaço de ar, como descrito por McHugh e Krochta (1994) e Gennadios et al. (1994), entre a região abaixo do filme e a superfície do cloreto de cálcio nas células-teste, não foi considerado para o cálculo da taxa de transmissão de vapor de água. Os testes foram realizados em triplicata.

4.5.4 Propriedades mecânicas

4.5.4.1 Resistência à tração e alongação

Metodologia utilizada para os FEE: A resistência à tração e a porcentagem de alongação na ruptura foram determinadas utilizando um texturômetro TA-XT2 *Texture Analyser* (SMS, Surrey, UK), operado de acordo com o método padrão ASTM D 882-83, com separação inicial das garras e velocidade do teste de 50mm e 1mm/s, respectivamente. Os filmes foram recortados em retângulos de 100mm de comprimento e 25mm de largura e posteriormente tiveram suas espessuras medidas através de um micrômetro MITUTOYO Digimatic Co. Proof. A resistência à tração foi calculada dividindo-se a força máxima pela área seccional do filme (largura do filme x espessura). Dividindo-se os valores de extensão pela separação inicial das garras (50mm) e multiplicando-se por 100, foi obtida a porcentagem de alongação na ruptura. As amostras foram feitas em sexstuplicatas.

Metodologia utilizada para os FEEPHA: A tensão na ruptura (TR) e alongação na ruptura

(E) dos filmes foram determinadas utilizando um texturometro TA.XT2 (Stable Microsystems SMS) de acordo com o método ASTM D882 (1995). Filmes foram

previamente acondicionados por um período de 72h a $50\pm 2\%$ UR e temperatura de 25°C . Os filmes foram recortados na medida de 8,0cm x 2,54cm e posteriormente suas espessuras foram medidas utilizando um micrômetro MITUTOYO Digimatic Co. Proof. A distância inicial de separação e a velocidade de realização do teste foram fixadas em 50mm e 1mm/s respectivamente. A tensão na ruptura (RT) foi calculada dividindo-se a força máxima no rompimento do filme, pela área da seção transversal. A alongação na ruptura foi determinada dividindo-se a distância final de separação da “probe” pela distância inicial de separação (50mm) multiplicada por 100 (JANGCHUD e CHINNAN, 1999). As amostras foram feitas em sextuplicatas.

4.5.5 Propriedades estruturais

4.5.5.1 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A morfologia da superfície dos filmes foi observada utilizando-se um Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV), modelo Leo 440i, marca LEO operado a 10kV e 50mA. Antes dos testes as amostras foram cobertas com uma fina camada de ouro para a condução térmica.

4.5.5.2 Difractometria de raios-X

Os difratogramas foram obtidos utilizando-se um difratômetro de Raios-X, modelo X'Pert, marca Philips. As condições de análise foram: (i) voltagem e corrente: 40 kV e 40 mA, respectivamente; (ii) faixa de varredura: 2θ de 5 a 30° ; (iii) passo: $0,1^{\circ}$ e (iv) velocidade $1^{\circ}/\text{min}$, dotado de monocromador de feixe secundário de grafite. A variação dos tamanhos dos cristais foi determinada utilizando-se o PC APD Diffraction Software. As amostras foram armazenadas a 25°C temperatura ambiente e $50\pm 2\%$ de UR, e analisadas em triplicata.

4.5.6 Propriedades térmicas

4.5.6.1 Calorimetria diferencial de varredura (DSC)

As determinações das temperaturas de transição vítrea e das variações da entalpia de fusão dos filmes foram realizadas por análises de calorimetria diferencial de varredura, utilizando-se um calorímetro da TA Instruments (EUA), modelo TA 2010, com módulo

de resfriamento por nitrogênio líquido. As amostras foram preparadas e pré-condicionadas à temperatura de 25°C e com umidade relativa controlada de 50±2%. As medidas foram realizadas em atmosfera inerte de nitrogênio gasoso ultra-seco, de grau cromatográfico, a uma mesma vazão de alimentação e de arraste de 50cm³/min. Os ensaios iniciaram-se a uma temperatura de 30°C e, a partir desta, as amostras foram aquecidas a uma taxa de 10°C/min até atingir a temperatura final de 140°C. O material-referência para esta análise foi o ar atmosférico.

4.5.7 Análise estatística

O programa Statistica® 5.5 (Stasoft, USA) foi utilizado para calcular as análises de variância (ANOVA). O teste de Tukey foi usado para determinar diferenças entre as propriedades dos filmes no intervalo de 95% de confiança.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Obtenção dos ésteres metílicos

A **Tabela 3** indica os valores de rendimento das respectivas reações de transesterificação e epoxidação (**Figura 11**) das diferentes fontes oleaginosas. Foi necessário o aquecimento da solução saturada de NaHCO_3 , para a completa neutralização do *m*-CPBA.

Tabela 3: Rendimento da reação de transesterificação com diferentes fontes oleaginosas

Óleo utilizado	Rendimento da reação de transesterificação (%)	Rendimento da reação de epoxidação
Soja	88%	85%
Milho	77%	91,2%
Macaúba	68%	86,6%
Pacu	63%	79%
Pintado	57%	81,3%



Figura 11: Neutralização do *m*-CPBA com solução de NaHCO_3 saturada.

5.2 Caracterização dos epóxidos

Em anexo são apresentados os cromatogramas e espectros de massa de baixa resolução das amostras dos ésteres antes e depois da reação de epoxidação. Conclui-se que houve a modificação desses ésteres, pois houve a formação de picos em regiões onde inicialmente não eram visualizados, esses picos indicaram m/z de 312 e m/z 308 (no espectro de massas é apresentado um valor de $M+1$ intenso em m/z 313 e em alguns casos

m/z 309, possivelmente devido à captura de um próton do meio), referentes à epoxidação a partir do oleato de metila e linolenato de metila respectivamente. Nos espectros onde indicam dois picos em m/z 308, refere-se à possibilidade de epoxidação em insaturações diferentes do linolenato de metila.

O tempo de retenção onde esses compostos aparecem no cromatograma variou de 19,311 min a 22,716 min. Segundo FARIAS (2010) picos até 15 minutos correspondem aos ésteres graxos saturados e insaturados e picos entre 20-22 minutos correspondem a produtos epoxidados. Por isso, consideramos os produtos formados como ésteres epoxidados.

5.3 Caracterização dos filmes

5.3.1 Aspecto visual

As amostras foram analisadas visualmente a fim de selecionar apenas os filmes mais uniformes, a **Figura 12** é referente aos FEE e já a **Figura 13**, refere-se aos FEEPHA. Dentre os dois tipos de filmes produzidos, visualmente todos se apresentaram simétricos, sem rupturas ou formação de bolhas.

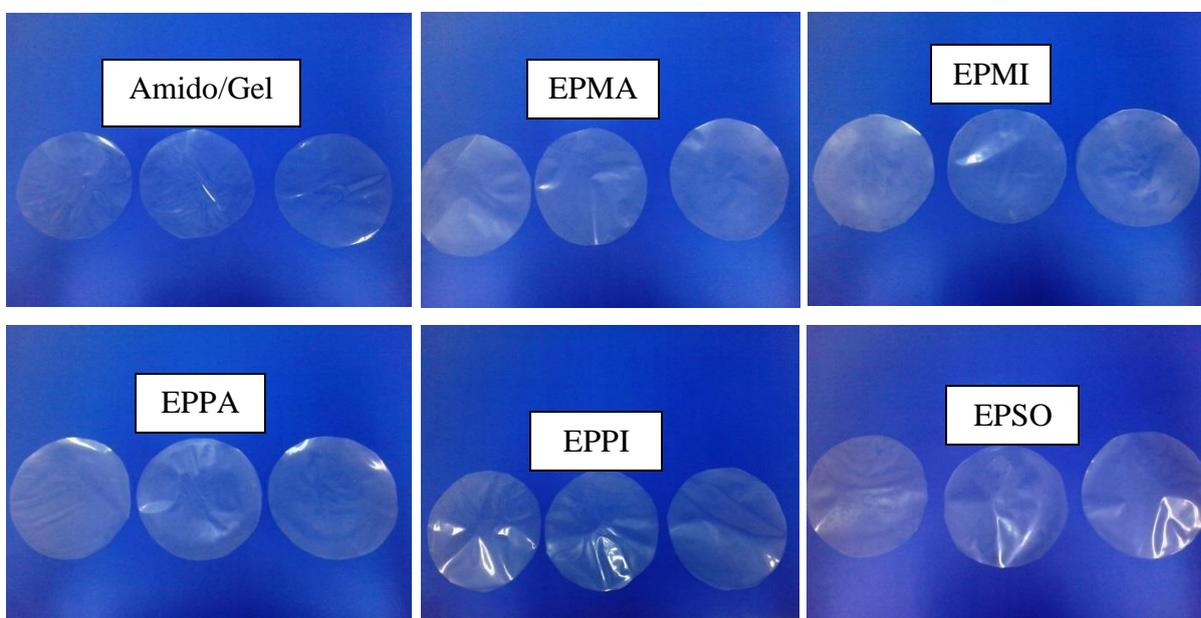


Figura 12: Análise de aspecto visual em fundo azul dos FEE.



Figura 13: Análise de aspecto visual em fundo azul dos FEEPHA.

5.3.2 Espessura

Os filmes foram submetidos à medida de espessura, medindo os mesmos em 5 locais aleatoriamente diferentes. A **Tabela 4** demonstra que as amostras de filmes não variaram significativamente entre elas, variando apenas 0,00682mm para os FEE e 0,0049 para os FEEPHA.

Tabela 4: Espessura das amostras dos FEE e FEEPHA.

Amostra	Espessura (mm)*
Amido/Gel	0,05166 ^a
EPMA	0,05847 ^a
EPMI	0,05882 ^a
EPPA	0,05200 ^a
EPPI	0,05633 ^a
EPSO	0,05640 ^a
PHA	0,0274 ^a
PHA/EPMA	0,0299 ^a
PHA/EPMI	0,0348 ^a

*A medida da espessura dos referentes filmes foram feitas em triplicata

Fakhouri (2009) estudou as propriedades físicas e mecânicas, dentre elas a espessura, de filmes preparados a partir de 3% de amido de milho lipofílico, gelatina e sorbitol, tendo este último a função de plastificante. Em seu trabalho Fakhouri apresenta uma espessura média de 0,0451 mm, ou seja, nos filmes produzidos com ésteres metálicos epoxidados como plastificante, a espessura apresentou um valor maior, como por exemplo, 0,05882 mm, no caso da amostra EPMI.

5.3.3 Cor

As cores dos filmes foram medidas por meio dos padrões *Hunterlab*: L*, variando de 0 (preto) a 100 (branco); a*, do verde (-) ao vermelho (+); e b*, do azul (-) ao amarelo (+) (GENNADIOS et al., 1996; KUNTE et al., 1997), determinados com um colorímetro Konica Minolta CR-400 (**Figura 14**) a luz do dia. Os filmes foram sobrepostos sobre uma superfície de uma placa branca padrão, e os padrões L*, a* e b* foram medidos indicados em tempo real no leitor do aparelho, como já visto o resultado foi determinado pela diferença de cor (ΔE^*) das amostras em relação ao “branco”, no caso a amostra Amido/Gel para os FEE e PHA para os FEEPHA (**Tabela 5**).



Figura 14: Análise de cor dos filmes produzidos, através do colorímetro Konica Minolta CR- 400.

Tabela 5: Diferença de cor das amostras de FEE e FEEPHA em relação ao “branco” (Standart).

Amostra	Diferença de cor segundo Hunterlab*
EPMA	0,5993 ^{ab}
EPMI	0,7852 ^a
EPPA	0,6483 ^{ab}
EPPI	0,4518 ^b
EPSO	0,5735 ^{ab}
PHA/EPMA	1,38 ^b
PHA/EPMI	1,93 ^a

*As medidas foram realizadas em quadruplicata e o resultado obtido através da média.

Em trabalho realizado por ROCHA (2014), a diferença de cor (ΔE) em filmes de amido de mandioca adicionados de extrato proteico de soja, variou de 8,14 a 17, valores muito superiores aos FEE e FEEPHA, que teve seu valor máximo de 0,7852 e 1,93

respectivamente. É importante ressaltar que durante o processo de gelatinização do amido ocorre mudança na coloração devido à perda da estrutura e cristalinidade dos grânulos de amido, tornando-se gel com certa opacidade (SILVA et al., 2007). A coloração dos filmes pode influenciar na aceitação tanto para fins comestíveis como não comestíveis, no caso, embalagens de uso geral.

5.3.4 Opacidade

Todas as amostras apresentaram valores de opacidade (**Figuras 15 e 16**) superiores à amostra do “branco”. Segundo Brito (2013), a adição de óleos ou derivados promove um aumento na difração dos raios luminosos que atravessam o filme, produzindo assim maior opacidade. Os resultados obtidos se aproximam dos apresentados por Fakhoury e colaboradores (2012), que indicaram opacidade de 14,5% para filmes a base de amido de mandioca modificado, gelatina e glicerol.

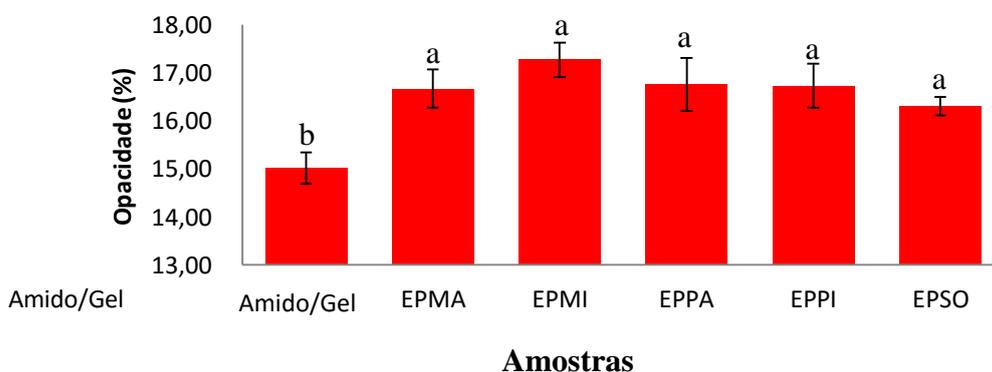


Figura 15: Variância de opacidade entre os FEE. (A análise foi realizada em triplicata e o resultado obtido através de média).

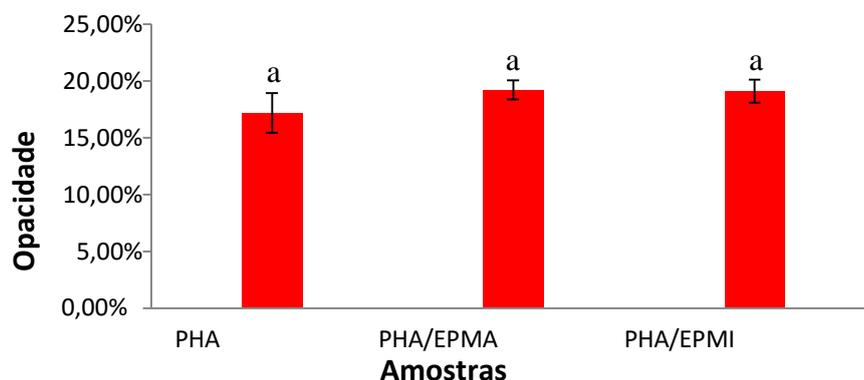


Figura 16: Variância de opacidade entre os FEEPHA. (A análise foi realizada em triplicata e o resultado obtido através de média).

Os filmes contendo PHA e ésteres epoxidados também apresentaram maior opacidade em relação ao branco (PHA), porém a diferença não foi significativa comparada aos FEE.

A cor e a opacidade do polímero é consequência da morfologia ou da estrutura química relacionada à massa molecular do material (CHEN, 1995). Filmes a base de gelatina são transparentes e homogêneos (FAKHOURI et al. 2003), enquanto que a adição de lipídios muda a aparência de filmes de hidrocolóides deixando-os opacos (KAMPER e FENNEMA, 1984). Os valores obtidos só poderam ser considerados bons ou ruins dependendo da aplicação a que será dada ao filme.

5.3.5 Solubilidade em água

Os valores de solubilidade em água obtidos são apresentados na **Tabela 6**, os filmes FEE variaram de 17,5% a 25,52%, sendo que todas as amostras que continham ésteres metílicos epoxidados demonstraram porcentagens superiores a da amostra de amido e gelatina pura, ou seja, as amostras de filmes com epóxidos diluem mais facilmente em água. A literatura reporta valores próximos aos apresentados, sendo 25,44%, utilizando glicerol como plastificante e 26,13% utilizando sorbitol, ambos compostos á base do amido de milho modificado e gelatina (FAKHOURI et al., 2013).

Tabela 6: Porcentagem de solubilidade em água dos FEE e FEEPHA.

Amostra	Solubilidade em água (%)*
Amido/Gel	17,50 ^b ±0,85
EPMA	25,07 ^a ±1,61
EPMI	23,00 ^a ±1,06
EPPA	25,52 ^a ±0,47
EPPI	24,68 ^a ±0,047
EPSO	25,19 ^a ±0,26
PHA	0,54 ^c ±0,08
PHA/EPMA	2,30 ^b ±0,01
PHA/EPMI	25,15 ^a ±1,73

* A análise foi feita em triplicata e o resultado obtido através da média.

As amostras os FEEPHA também se mostraram mais solúveis em água do que a amostra padrão. A amostra de PHA/EPMI foi a mais solúvel (25,15%) entre elas, provavelmente devido ao fato de que a camada que contém amido e gelatina é mais facilmente diluída em água, do que o polímero puro, sem cobertura.

A solubilidade em água é uma importante propriedade dos filmes comestíveis, tanto nas suas aplicações, como na proteção dos alimentos onde atividade de água é alta, ou ainda quando o filme entra em contato com a água durante o processamento do alimento embalado (GONTARD et al., 1992).

5.3.6 Solubilidade em ácido

O resultado da análise de solubilidade em ácido segue na **Tabela 7**. Todas as amostras de FEE foram 100% solúveis no ácido clorídrico 1N, pois após algumas horas do início do teste não foi mais possível visualizar os filmes (**Figura 17**).

Tabela 7: Porcentagem de solubilidade em ácido (HCl 1N) dos FEE e FEEPHA.

Amostra	Solubilidade em ácido (%)*
Amido/Gel	100 ^a ±0,00
EPMA	100 ^a ±0,00
EPMI	100 ^a ±0,00
EPPA	100 ^a ±0,00
EPPI	100 ^a ±0,00
EPSO	100 ^a ±0,00
PHA	15,94 ^a ±0,74
PHA/EPMA	8,10 ^b ±0,91
PHA/EPMI	2,5 ^c ±0,27

*A análise foi realizada em triplicata e o resultado obtido através da média

Foi reportado que filmes plastificados com sorbitol apresentaram total solubilidade em ácido (100%) (FAKHOURI, 2009). Esse fato é importante em casos em que a embalagem é consumida com o produto final, indicando sua total solubilização no pH ácido do organismo humano durante a digestão.

No caso dos FEEPHA, a amostra do branco foi mais solúvel em ácido do que as amostras de PHA/EPMA e PHA/EPMI, ou seja, elas serviram como barreira a interação do ácido com o polímero.



Figura 17: Amostras dos filmes em solução de HCl 1N

5.3.7 Permeabilidade ao vapor de água (PVA)

Os resultados de permeabilidade em água (**Tabela 8**) indicam que ambas as formulações de filmes apresentaram valores acima das amostras padrões. A permeabilidade a vapor de água é proporcional à espessura, característica que confere com os filmes produzidos, pois todos se apresentaram mais espessos que as amostras dos respectivos padrões. Pode se visualizar a célula de permeação e as cápsulas de acrílico através da **Figura 18**.

Tabela 8: Permeabilidade em vapor de água dos FEE e FEEPHA.

Amostra	Permeabilidade em vapor de água (gmm/m ² d.kPa)*
Amido/Gel	20,18 ^b ±0,92
EPMA	25,04 ^a ±1,22
EPMI	20,79 ^b ±0,53
EPPA	22,76 ^{ab} ±0,74
EPPI	23,36 ^{ab} ±0,28
EPSO	22,67 ^{ab} ±1,06
PHA	0,70 ^b ±0,07
PHA/EPMA	1,02 ^b ±0,01
PHA/EPMI	1,34 ^a ±0,01

*A análise foi realizada em triplicata e o resultado obtido através da média.



Figura 18: Cápsulas de acrílico contendo as células de permeação para análise de permeação em vapor de água.

Yang e Paulson (2000) notaram que a adição de ácidos graxos diminui a PVA e explicam que esta redução é decorrente da incorporação de material lipídico à matriz que produz uma diminuição do espaço livre para a passagem de água, mas que apesar de ser considerada uma substância hidrofóbica, o grupo funcional carboxila é altamente polar e pode facilitar a transferência de umidade através do filme, diferença observada por eles em seu experimento no qual os filmes formados com cera de abelha foram menos permeáveis do que os filmes contendo ácido esteárico e palmítico, porém ambas com redução de PVA.

5.3.8 Resistência à tração e alongação

Os valores de alongação e resistência à tração dos FEE e FEPPHA estão apresentados na **Tabela 9**. A adição de ésteres epoxidados provocou um aumento na resistência à tração em relação a amostra sem a adição dos mesmos. Maiores valores de resistência foram observados para as amostras contendo éster epoxidado de pintado, de pacu e soja. O aumento foi de aproximadamente 69% quando ésteres epoxidado de milho ou de macaúba foram adicionados aos filmes compostos de amido e gelatina quando essa propriedade foi analisada. Quando éster epoxidado de pintado foi adicionado, a resistência praticamente dobrou.

O mesmo acréscimo da tração foi observado nos filmes PHA/EPMA e PHA/EPMI, os mesmos apresentaram maior tração do que a amostra controle, porém os resultados alongação não apresentaram muita diferença entre as três amostras. Comparando os FEE com os FEPPHA, nota-se que todos os filmes FEE, são mais resistentes dos que possuem a mesma formulação, porém acrescidos do polímero PHA.

Tabela 9: Valores de resistência a tração e alongação dos FEE e FEEPHA.

Amostra	Resistência a tração (MPa)	Elongação (%)
Amido/Gel	36,14 ^e ±4,17	2,70 ^a ±0,11
EPMA	52,84 ^{cd} ±5,00	3,03 ^a ±1,17
EPMI	52,94 ^{cd} ±3,78	3,20 ^a ±0,48
EPPA	62,62 ^{ab} ±4,17	3,20 ^a ±0,52
EPPI	71,89 ^a ±1,36	3,47 ^a ±0,58
EPSO	65,75 ^{abc} ±4,65	3,39 ^a ±0,76
PHA	9,98 ^b ±1,98	1,51 ^a ±0,17
PHA/EPMA	38,60 ^a ±4,98	1,54 ^a ±0,34
PHA/EPMI	39,41 ^a ±3,95	1,01 ^a ±0,20

*A análise foi realizada em sextuplicata e resultado obtido pela média.

Resistência a tração e alongação são as propriedades mecânicas a serem avaliadas em um filme, a primeira tem a função de expressar a força máxima que o filme suporta durante o teste de tração, já a outra refere-se a capacidade do mesmo em esticar. Segundo Gontard et al. (1994), em filmes busca-se uma alta resistência à tração, porém o valor da alongação dependerá da aplicação do filme, pois para manter a sua integridade e propriedades de barreira, o filme em questão deve permitir a tensão normal apresentada durante a sua aplicação, transporte e manuseio.

5.3.9 Calorimetria diferencial de varredura (DSC)

Através da análise de DSC (**Figura 19 e 20**), foi possível visualizar que a transição vítrea dos filmes de FEEPHA foi bastante semelhante, aproximadamente 120°C para PHA/EPMA e PHA/EPMI. Porém, comparando esse valor com a amostra do “branco”, PHA, nota-se que houve um ligeiro deslocamento desse valor, sendo que na amostra PHA, a transição foi de aproximadamente 115°C. Conclui-se então que a adição da solução filmogênica de ésteres metílicos ao polímero PHA, fez com que houvesse a miscibilidade polimérica entre o amido e o PHA, formando assim filmes homogêneos.

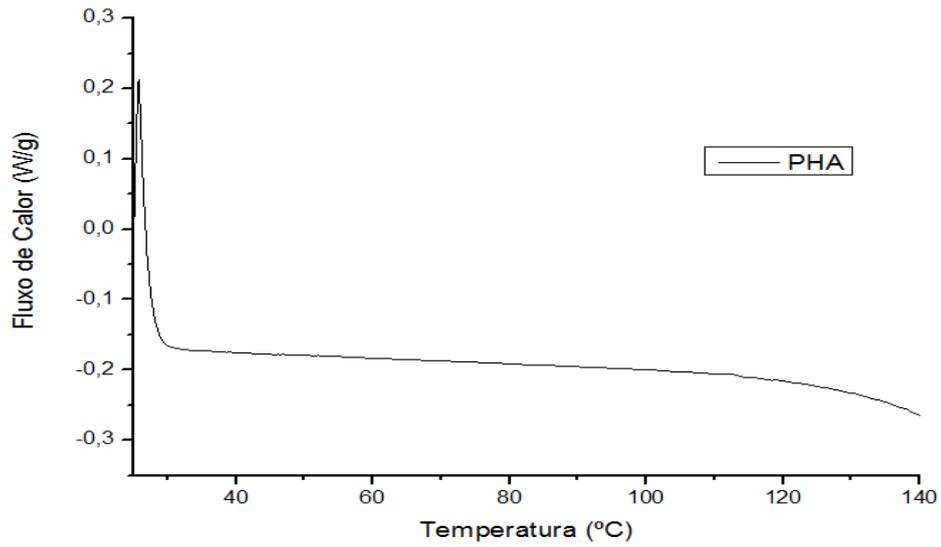


Figura 19: DSC do filme considerado branco, PHA.

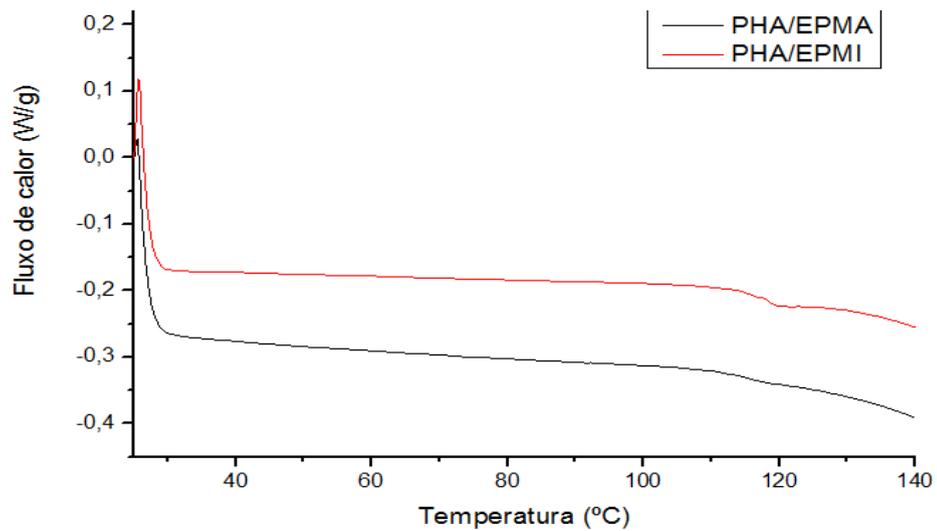


Figura 20: DSC dos filmes PHA/EPMA e PHA/EPMI.

Em trabalho realizado por Fakhouri (2009) é apresentada análise de DSC do amido de milho modificado, o qual indica que a temperatura de transição vítrea para o mesmo é de aproximadamente 60°C, o que reforça o pressuposto que houve sim a incorporação total do amido ao PHA, pois na **Figura 19** não é possível observar um decaimento do fluxo de calor nessa região.

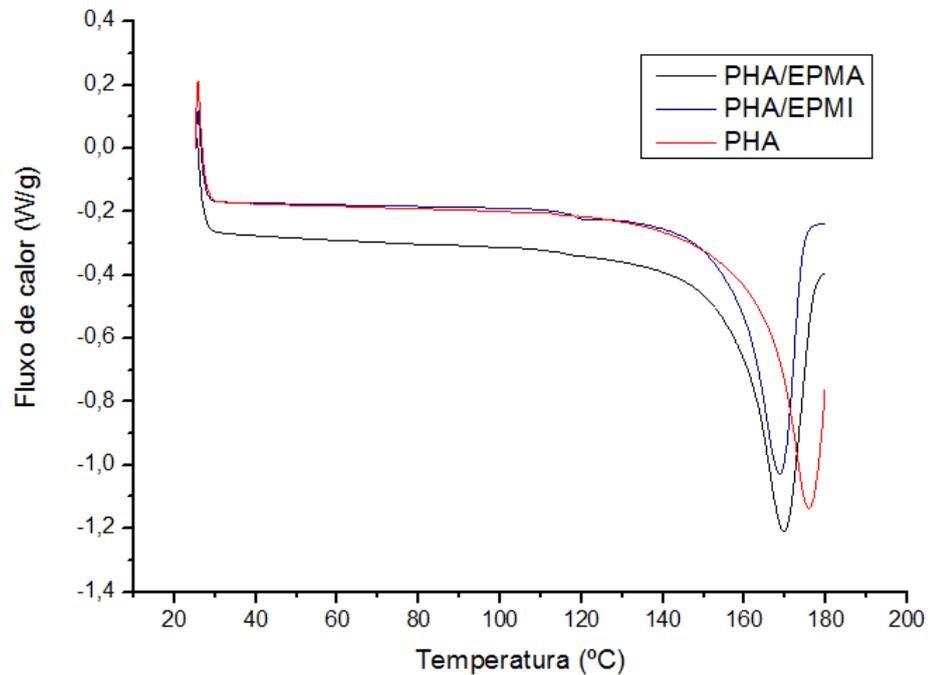


Figura 21: DSC dos filmes PHA/EPMA e PHA/EPMI, apresentando a transição endotérmica.

Na **Figura 21** observa-se uma banda referente a transição endotérmica em aproximadamente 170°C para as amostras PHA/EPMA e PHA/EPMI e em 178°C para a amostra padrão PHA, esses dados conferem com os apresentados por Braunegg e colaboradores (1978) e Gomez e colaboradores (1997), que indicaram uma faixa de 170°C a 183° respectivamente para polihidroxialcanoatos produzidos a partir de glicose. Em trabalho anterior realizado por Figueiredo (2014), a transição endotérmica foi de 177,9°C para polihidroxialcanoatos obtidos através da glicerina bruta residual do biodiesel, utilizando a linhagem *Cupriavidus necator*. A mistura amido/gelatina/éster epoxidado provavelmente pode alterar o volume livre, reduzindo a temperatura de fusão.

5.3.10 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Nas **Figuras 22, 23 e 24** são apresentadas as microscopias de varredura dos compostos PHA, PHA/EPMA e PHA/EPMI.

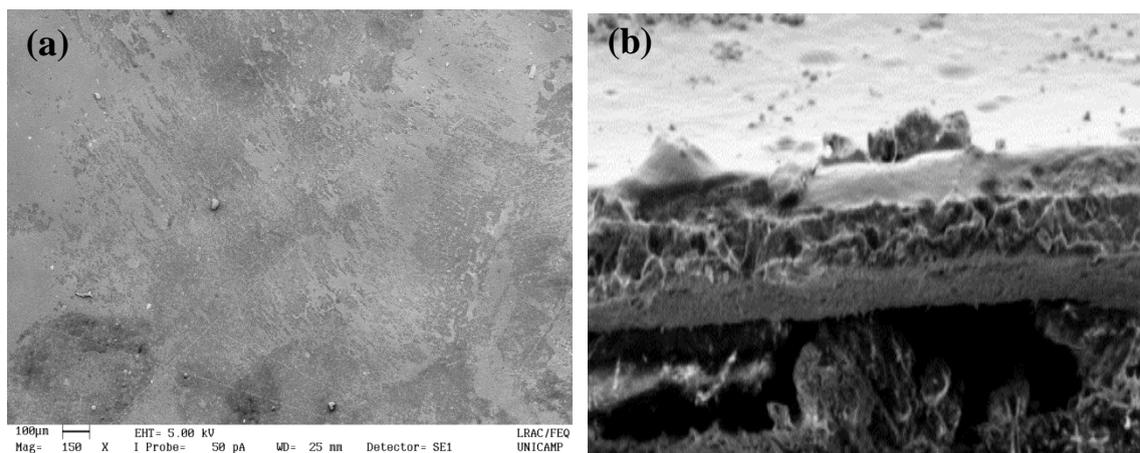


Figura 22: Imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura de (a) superfície e (b) ruptura do filme PHA/EPMI.

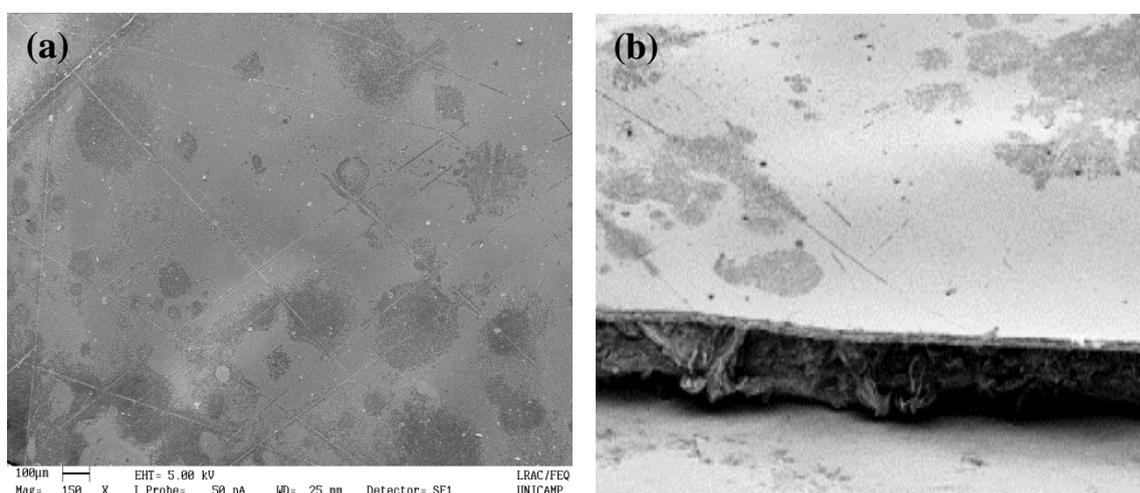


Figura 23: Imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura de (a) superfície e da (b) ruptura do filme PHA/EPMA.

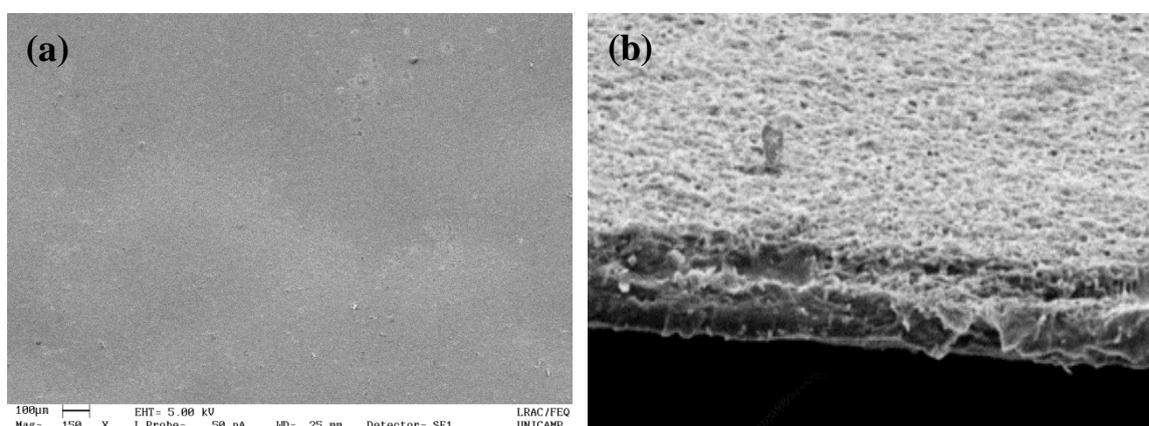


Figura 24: Imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura de (a) superfície e da (b) ruptura do filme PHA.

Diversos estudos envolvendo a avaliação de filmes comestíveis e/ou biodegradáveis tem utilizado o microscópio eletrônico de varredura como ferramenta, buscando correlacionar as propriedades dos mesmos com a estrutura morfológica (SOUZA, 2001; MAUER et al., 2000). Em função da grande profundidade de foco e da alta resolução, análises utilizando o microscópio eletrônico de varredura podem permitir a observação da estrutura de filmes e dos efeitos dos tratamentos na estruturação da matriz filmogênica (CARVALHO, 2002).

Os resultados obtidos através dessa análise indicam que as superfícies dos filmes são homogêneas, sem formação de bolhas e fissuras. Através dela também se verifica a formação de *multilayers* nos filmes PHA/EPMI e PHA/EPMA. A homogeneidade dos filmes pode ser confirmada observando as análises de DRX e DSC.

5.3.11 Difratomia de raios-X (D-RX)

A **Figura 25** abaixo apresenta o resultado da análise de Difratomia de Raios- X, onde pode-se visualizar as regiões cristalinas. Tais regiões cristalinas são claramente observadas nos picos definidos na região de 2θ entre $12,5^\circ$ e $32,5^\circ$ aproximadamente.

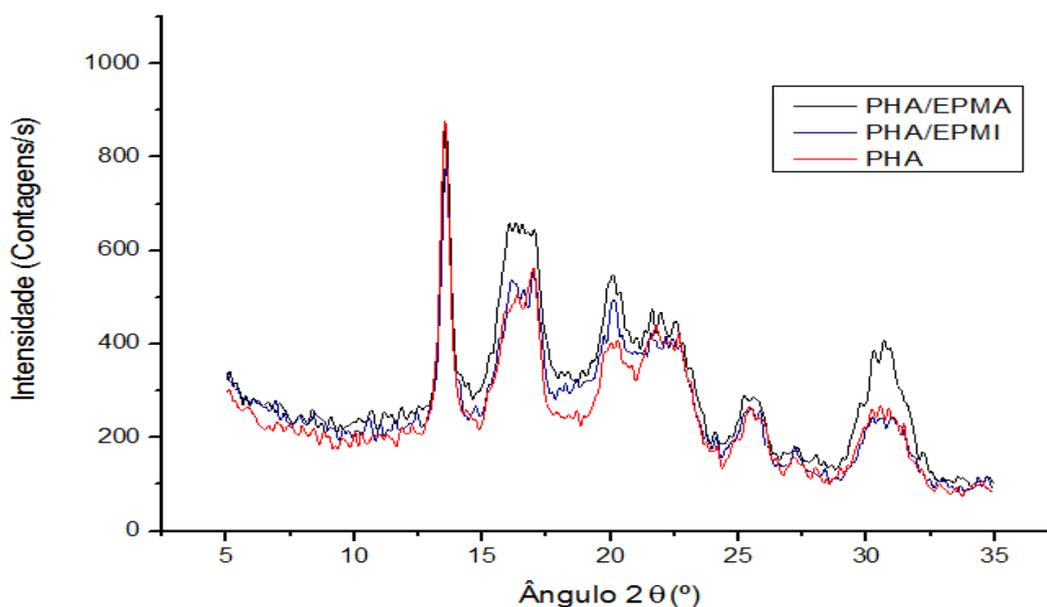


Figura 25: Difratação de Raios-X das amostras de FEPPHA.

Através da análise de DRX foi possível concluir que não houve mudança na formação das regiões cristalinas observadas, mas sim na intensidade entre as amostras, sendo que os filmes PHA/EPMA e PHA/EPMI se mostraram mais cristalinos que o filme considerado

“branco”, PHA. Isso pode ser devido ao fato de que o amido e os ésteres epoxidados tenham se aderido à superfície do PHA, formando um material mais coeso. A faixa onde se encontram os picos de cristalinidade confere com a da literatura, pois Campos e colaboradores (2013) relataram a mesma faixa de cristalinidade para amostras de PHA (12,5° a 32,5°).

6. CONCLUSÃO

Os ésteres metílicos foram epoxidados com o ácido *m*-cloroperbenzóico com uma taxa de conversão acima de 70% em todos os casos, valores considerados satisfatórios. Através dos espectros de massa de baixa resolução, foi possível concluir que as amostras de milho, pacu e pintado, apresentaram epoxidação nos ésteres derivados do ácido oléico e do ácido linolênico, a amostra de macaúba indicou a presença apenas do éster epoxidado derivado do ácido oleico e por fim, a amostra de soja que apresentou apenas o éster epoxidado obtido através do ácido linolênico.

Todas as amostras de ambas formulações se apresentaram uniformes, com ausência de bolhas e fissuras. Filmes a base de gelatina e amido plastificados com ésteres epoxidados se mostraram mais resistentes do que a amostra padrão, sem plastificante, destacando a amostra EPPI, que apresentou resistência a tração de 71,89 Mpa e 3,47% de alongação. A adição deste plastificante aumentou a solubilidade em água. Na análise de solubilidade em ácido, ambas as amostras apresentaram 100% de solubilidade, o que dependendo da aplicação é considerado ideal. A permeabilidade em vapor de água não apresentou diferença significativa, exceto na amostra EPMA que indicou valor de PVA de 25,04 gmm/m²d.kPa.

Os FEPPHA (Filmes de ésteres epoxidados acrescidos de PHA) não apresentaram diferença significativa nas análises de espessura e opacidade. Nas análises de solubilidade em água, permeabilidade em vapor de água e resistência a tração houve um aumento significativo em relação ao padrão, no caso a amostra de PHA puro. A solubilidade em ácido diminuiu consideravelmente com a adição dos ésteres epoxidados tanto de macaúba, quanto de milho, todas comparadas ao padrão PHA. A alongação não diferiu significativamente com a adição desses compostos ao PHA. Através do DSC foi possível concluir que houve a incorporação do amido a matriz polimérica do PHA, pois em trabalhos anteriores relatados na literatura mostra que a transição vítrea do amido é em torno de 60°C, porém esse valor não é indicado na análise, mas sim em aproximadamente 120°, faixa próxima a do padrão, PHA, que é apresentada em 115°C. Nas micrografias da superfície e ruptura vê-se que houve a produção do *multilayer* éster epoxidado/PHA/éster epoxidado e que a superfície é plana, homogênea, com ausência de fissuras. No DRX, não houve modificação na região onde aparecem os picos cristalinos entre os FEPPHA e o padrão, mas sim na intensidade desses picos, sendo que os FEPPHA

apresentaram valores excedentes à amostra de PHA puro, reforçando assim a ideia da possibilidade de miscibilidade dos dois materiais poliméricos, amido e PHA.

7. REFERÊNCIAS

ABIMORAD, E. G.; CARNEIRO, D. J. Métodos de coleta de fezes e determinação dos coeficientes de digestibilidade da fração protéica e da energia de alimentos para o pacu, *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887). *Revista Brasileira de Zootecnia*. Vol. 33, nº 5, p. 1101-1109, 2004.

ALMEIDA, A., RUIZ, J. A., LÓPEZ, N. I., PETTINARI, M. J. Bioplásticos: uma alternativa ecológica. *Química Viva*. Vol. 3, nº. 3, p. 122-133, 2004.

AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS (ASTM). Method D 882-83: Standard test methods for tensile properties of thin plastic sheeting, in: *Annual Book of ASTM Standards*. West Conshohocken, PA, 1980.

AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS (ASTM). Method D 6400-04 “Standard Specification for Compostable Plastics”, in *Annual Book of ASTM Standards*, Conshohocken, PA, 2004.

AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS (ASTM). Method D 6866-06 “Standard Test Methods for Determining the Biobased Content of Natural Range Materials”, in: *Annual Book of ASTM Standards*, West Conshohocken, PA, 2006.

BASTIOLI, C. *Handbook of Biodegradable Polymers*. 1ª ed. Shawbury: Rapra Technology Limited, 2005.

BASTIOLI, C.; BELLOTTI, V.; CAMIA, M.; DEL GUIDICE, L.; RALLIS, A., In: Y. DOI AND K. FUKUDA. *Biodegradable Plastics and Polymers*. Elsevier, p 200, 1994.

BATISTA, J. A.; TANADA-PALMU, P. S.; GROSSO, C. R. F. Efeito da adição de ácidos graxos em filmes a base de pectina. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*. Vol. 25, p. 781-788, 2005.

BELL, S. J.; BRADLEY, D.; FORSE, R. A.; BISTRIAN, B. R. The new dietary fats in health and disease. *Journal of the American Dietetic Association*. Vol. 97, p.280-286, 1997.

BRÄMER, C. O.; VANDAMME, P.; SILVA, L. F.; GOMEZ, J. G. C.; STEINBÜCHEL, A. *Burkholderia sacchari* sp. nov: a polyhydroxyalkanoate-accumulating bacterium isolated from soil of a sugar-cane plantation in Brazil. *International Journal of Microbial Ecology*. Vol. 51, p. 1709-1713, 2001.

BRAUNEGG, G.; LEFEBVRE, G.; GENSER, K. F. Polyhydroxyalkanoates, biopolyesters from renewable resources: physiological and engineering aspects. *Journal of Biotechnology*, Vol. 65, p. 127-161, 1998.

BRAUNEGG, G.; SONNLEITNER, B.; G.; LAFFERTY, R. M. A rapid gas chromatography method for the determination of poly β -hidroxibutirato acid in microbial biomass. *European Journal Applied Microbiology and Biotechnology*, Vol. 6, p. 29-37, 1978.

BRITO, R. M. *Elaboração e caracterização de filmes a base de amido, gelatina, glicerol e óleo essencial*. (2013). 36f. Trabalho de conclusão de curso (Curso Superior em Tecnologia de Alimentos). Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Londrina, 2013.

BRUNEL, D. G. Influência da incorporação de aditivos nas propriedades do poli (hidroxibutirato-co-hidroxivalerato) – PHBV. (2008). 153f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Engenharia de Materiais). Universidade Federal de São Carlos. São Carlos, 2008.

BURGESS, W.E. *An atlas of freshwater and marine catfishes: a preliminary survey of the Siluriformes*. Neptune City: TFH Publications, p.784, 1989.

CAMPOS, J. L. O cultivo do pintado, *Pseudoplatystoma coruscans* (Spix e Agassiz, 1829). In: BALDISSEROTTO, B e GOMES, L. C. *Espécies nativas para a piscicultura no Brasil*. Editora UFSM, Santa Maria, RS, p. 327-344, 2005.

CAMPOS, J. L. The culture of pintado, *Pseudoplatystoma spp* (Pimelodidae). In: *The world aquaculture society*, 2003, Salvador, Bahia, p.150. 2003

CAMPOS M. I.; FIGUEIREDO, T. V.B.; SOUSA, L. S.; DRUZIAN, J. I. The influence of crude glycerin and nitrogen concentrations on the production of PHA by *Cupriavidus necator*

using a response surface methodology and its characterizations. *Industrial crops and Products*. Vol. 52, p. 338-346, 2014.

CHANPRATEEP, S. Current trends in biodegradable polyhydroxyalkanoates. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. Vol. 110, n. 6, p. 621-632, 2010.

CHEN, H. Functional properties and applications of edible films made of milk proteins. *Journal of Dairy Science*. Vol. 78, n. 11, p. 2563-2583, 1995.

CICONINI, G. *Caracterização de frutos e óleo de polpa de macaúba dos biomas Cerrado e Pantanal do estado de Mato Grosso do Sul, Brasil*. (2012). 127f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia). Universidade Católica Dom Bosco. Campo Grande, 2012.

CLAYDEN, J.; GEEVES, N.; WARREN, S.; *Organic Chemistry*, 1ª Ed. Oxford University Press, 2001.

COELHO, N. S.; ALMEIDA, Y. M. B.; VINHAS, G. M. A. Biodegradabilidade da Blenda de Poli(β -Hidroxi butirato-co-Valerato)/Amido Anfótero na Presença de Microrganismos. *Polímeros: Ciência e Tecnologia*. Vol. 18, nº 3, p. 270-276, 2008.

CONAB. Companhia nacional de abastecimento. Acompanhamento de safra brasileira: grãos, sétimo levantamento, p.78. Brasília, 2015.

CÓZAR, A.; ECHEVARRÍA, F.; GONZÁLEZ-GORDILLO, J. I.; IRIGOIEN, X.; ÚBEDA B.; HERNÁNDEZ-LEÓN, S.; PALMA, A. T.; NAVARRO, S.; GARCÍA-DE-LOMAS, J.; RUIZ, A.; FERNÁNDEZ-DE-PUELLES, M. L.; DUARTE C. M. Plastic debris in the open ocean. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. Vol. 111, p. 10239-10244, 2015.

DAVANÇO, T.; TANADA-PALMU, P.; GROSSO, C. Filmes compostos de gelatina, triacetina, ácido esteárico ou capríco: efeito do pH e da adição de surfactantes sobre a funcionalidade dos filmes. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*. Vol. 27, p.408-416, 2007.

DIAS-KOBERSTEIN, T. C. R., CARNEIRO, D. J., URBINATI, E. C. Tempo de trânsito gastrointestinal e esvaziamento gástrico do pacu (*Piaractus mesopotamicus*) em diferentes temperaturas de cultivo em diferentes temperaturas de cultivo em diferentes temperaturas de cultivo. *Acta Scientiarum Animal Science*. Vol. 27, nº 3, p. 413-417, 2005.

DOEBLEY, J. F., Molecular evidence for gene flow among *Zea* species. *Bioscience*. Vol. 40, p. 443-448. 1990.

EMBRAPA. Características da Soja. AGEITEC – Agência Embrapa de informação tecnológica. Disponível em: <
http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/soja/arvore/CONTAG01_24_271020069131.html> Acesso em: 13 de setembro de 2014.

FAKHOURI F. M. *Coberturas comestíveis aplicadas na preservação de goiabas in natura (Psidium guajava L.)*. (2003). 126f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos). UNICAMP. Campinas. 2003.

FAKHOURI, F. M. *Bioplásticos flexíveis e biodegradáveis à base de amido e gelatina*. (2009). 249f. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos). UNICAMP. Campinas. 2009

FAKHOURY, F. M., MARTELLI, S. M., BERTAN, L. C., YAMASHITA, F., INNOCENTINI MEI, L. H., COLLARES QUEIROZ, F. P. Edible films made from blends of manioc starch and gelatin - Influence of different types of plasticizer and different levels of macromolecules on their properties. *LWT - Food Science and Technology*. Vol. 49, p. 149-154, 2012.

FANCELLI, A. L.; DOURADO NETO, D. *Milho: tecnologia e produtividade*. Piracicaba: ESALQ/USP/LPV, p. 259, 2001.

FARIAS, M. *Síntese, caracterização de catalisadores e estudo de suas atividades catalíticas na epoxidação de óleos vegetais*. (2010). 124f. Tese (Doutorado em Química), Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 2010.

FARIAS, M.; MARTINELLI, M. Epoxidação do óleo de soja com o sistema catalítico [MoO₂(acac)₂]/TBHP em [BMIM][PF₆]. *Química Nova*, Vol. 35, nº. 08, p. 1538-1541, 2012.

FEIL, H. Biodegradable plastics from vegetable raw materials. *Agro-Food-Industry Hi-Tech*. p. 25-32, 1995.

FIGUEIREDO, T.; CAMPOS M. I.; SOUSA, L. S.; SILVA, J. R.; DRUZIAN, J. I Produção e caracterização de polihidroxicanoatos obtidos por fermentação da glicerina bruta residual do biodiesel. *Química Nova*. Vol. 37, p. 1111-1117, 2014.

FONSECA, G. G. *Produção de polihidroxicanoatos por Escherichia coli recombinante*. (2003). 154f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos). Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, 2003.

FRANCHETTI, S. M. M.; MARCONATO, J. C. Polímeros biodegradáveis – uma solução parcial para diminuir a quantidade de resíduos plásticos. *Química Nova*. Vol. 29, n. 4, p. 811-816, 2006.

FROEHNER, S.; LEITHOLD, J.; LIMA JÚNIOR, L. F. Transesterificação de óleos vegetais: caracterização por cromatografia em camada delgada e densidade. *Química Nova*. Vol. 30, nº. 8, p. 2016-2019, 2007.

FUNKE, U.; BERGTHALLER, W.; LIDHAUE, M. G. Processing and characterization of biodegradable products based starch. *Polymer Degradation and Stability*. Vol. 59, p. 293-296, 1998.

GAN, L.H.; GOH, S.H.; OOI, K.S. Kinetic studies of epoxidation and oxirane cleavage of palm olein methyl esters. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. Vol. 69, p. 347-351, 1992.

GENNADIOS, A.; McHUGH, T. H.; WELLER, C. L.; KROCHTA, J. M. Edible coatings and films based on proteins, in: J. M. KROCHTA, E. A. BALDWIN, M. NISPEROS-CARRIEDO, 101 (eds). *Edible coatings and films to improve food quality (Technomic Publishing Co)*, Inc. Lancaster, USA, 1994.

GENNADIOS, A.; WELLER, C.L.; HANNA, M.A.; FRONING, G.W. Mechanical and barrier properties of egg albumen films. *Journal of Food Science*. Vol. 61, n.3, p.585-589, 1996.

GOMEZ, J. G. C.; RRODRIGUES, M. F. A.; ALLI, R. C. P.; TORRES, B. B.; BUENO NETTO, C.L.; OLIVEIRA, M. S.; SILVA, L. F. Evaluation of soil gram-negative bacteria yielding polyhydroxyalkanoic acids from carbohydrates and propionic acid. *Applied Microbiology and Biotechnology*. Vol. 45, p. 785-79, 1996.

GOMEZ, J. G. C.; BUENO NETTO, C. L. Produção de plásticos biodegradáveis por bactérias. *Revista Brasileira de Engenharia Química*. Vol. 17, p. 24-29, 1997.

GONTARD, N., DUCHEZ, C., CUQ, J. L., GUILBERT, S. Edible composite films of wheat gluten and lipids: water vapor permeability and other physical properties. *International Journal of Food Science and Technology*. Vol. 29, p. 39-50, 1994.

GONTARD, N., GUILBERT, S., CUQ, J. L. Edible wheat gluten films: influence of the main process variables on film properties using response surface methodology. *Journal of Food Science*, Vol. 57, p. 190-199, 1992.

GOUD, V.V.; PATWARDHAN, A.V.; PRADHAN, N.C. Studies on the epoxidation of mahua oil (*Madhumica indica*) by hydrogen peroxide. *Bioresource Technology*. Vol. 97, p-1365-1371, 2006.

GROSS, R.A.; KALRA, B. Biodegradable polymers for the environment. *Science*. Vol. 297, p. 803 – 807, 2002.

HENDERSON, A.; GALEANO, G.; BERNAL, R. *Field Guide to the Palms of the Americas*. New Jersey: Princeton University, p.166-167, 1995.

HENRIQUE, C. M., CEREDA, M. P., SARMENTO, S. B. S., Características físicas de filmes biodegradáveis produzidos a partir de amidos modificados de mandioca. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*. Vol. 28, p. 231-240, 2008.

HUNTERLAB. *The color management company*. Universal software, version 3.2. Reston, 1997.

JANGCHUD, A.; CHINNAN, M. S. Peanut protein film as affected by drying temperature na pH of film forming solution. *Journal of Food Science*. Vol. 64, p. 153-157, 1999.

KAMPER, S. L., FENNEMA, O. Water vapor permeability of an edible, fatty acid bilayer film. *Journal of Food Science*. Vol. 49, p. 1482-1485, 1984.

KUNTE, L.A.; GENNADIOS, A.; CUPPETT, S.L.; HANNA, M.A.; WELLER, C.L. Cast films from soy protein isolates and fractions. *Cereal Chemistry*, Vol.74, n.2, p.115-118, 1997.

LEE, S. Y. Plastic bacteria?: Progress and prospects for polyhydroxyalkanoate production in bacteria. *Trends in Biotechnology*. Vol. 14, p. 431-438, 1996.

LEE, S.Y.; CHOI, J.L. Production of microbial polyester by fermentation of recombinant microorganisms. *Advances in Biochemical Engineering and Biotechnology*. Vol. 71, p.183-207, 2001.

LUNDBERG, J. G., LITTMAN, M. W. Family *Pimelodidae* (Long- whiskered catfishes). In: REIS, R., KULLANDER, S. O.; FERRARIS, C. J. Jr. *Check List of the Freshwater Fishes of South and Central America*. EdIPUC-RS, p. 432-455. 2003.

MALI, S.; GROSSMANN, M. V. E.; YAMASHITA, F. Filmes de amido: produção, propriedades e potencial de utilização. *Semina: Ciências Agrárias*. Vol. 31, n. 1, p. 137-156, 2010.

MAUER, L. J.; SMITH, D. E.; LABUZA, T. P. Water vapor permeability, mechanical , and structural properties of edible β -casein films. *International Dairy Journal*. Vol. 10, p. 353-358, 2000.

McHUGH T. H.; KROCHTA, J. M. Permeability properties of edible films, in: J. M. KROCHTA, E. A. BALDWIN, M. NISPEROS-CARRIEDO, (eds). *Edible coatings and films to improve food quality (Technomic Publishing Co)*, Inc. Lancaster, USA, 1994.

MEHER, L.C., VIDYA SAGAR, D., NAIK, S.N. Technical aspects of biodiesel production by transesterification – a review. *Renewable & Sustainable Energy Reviews*, p. 1-21, 2004.

MELO, P. C. *Produção e caracterização de biodieseis obtidos a partir da oleaginosa Macaúba (Acrocomia aculeata)*. (2012). 93f. Dissertação (Mestrado em Química). Uberlândia. Universidade Federal de Uberlândia. 2012.

MENEGAZZO, M. L., PETENUCCI, M. E., FONSECA, G. G. Production and characterization of crude and refined oils obtained from the co-products of Nile tilapia and hybrid sorubim processing. *Food Chemistry*. Vol. 157, p. 100-104.

MOREIRA, M. A. *Utilização de lipases em reações de epoxidação químio-enzimática*. (2003). 56f. Dissertação (Mestrado em Ciências). Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, 2003.

MORETTO, E.; FETT, R. *Tecnologia de óleos vegetais e gorduras vegetais na indústria de alimentos*. São Paulo: Varela, 1998.

MOURA, E. F. *Embriogênese somática em macaúba: indução, regeneração e caracterização anatômica*. (2007). 66f. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento). Universidade Federal de Viçosa. Viçosa, 2007.

NAYAK, P. L. Biodegradable Polymers: opportunities and challenges. *Reviews in Macromolecular Chemistry and Physic*. Vol.3, p. 481-505, 1999.

NOVAES, R. F. *Contribuição para o estudo do coco macaúba*. (1952). Tese (Doutorado em Ciências Agrárias). Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”. Universidade de São Paulo. Piracicaba, 1952

OKADA, M. Chemical syntheses of biodegradable polymers. *Progress in Polymer Science*. Vol. 27, p. 87-133, 2002.

ORELLANA-COCA, C.; ADLERCREUTZ, D.; ANDERSSON, M. M.; MATTIASSON, B.; HATTI-KAUL, R. Analysis of fatty acid epoxidation by high performance liquid chromatography coupled with evaporative light scattering detection and mass spectrometry. *Chemistry and Physics of Lipids*. Vol. 135, p. 189-199, 2005.

PEDROZO, T. H.; *Ésteres etílicos epoxidados do óleo de milho como plastificante alternativo para o PVC*. (2009). 82f. Dissertação (Mestrado em Química). Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2009

PRADELLA, J. G. C. Biopolímeros e Intermediários Químicos. São Paulo: Centro de Gestão e Estudos Estratégicos. Relatório Técnico nº 84, p. 205-396, 2006.

RANGARAJAN, B.; HAVEY, A.; GRULKEY, E.A.; CULNAN, P.D. Kinetic parameters of a two-phase model for *in situ* epoxidation of soybean oil. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. Vol. 72, p. 1161-1169, 1995.

RETT, H. T. *Produção por extrusão e termoprensagem de laminados biodegradáveis a partir de farinha de mandioca, sorbitol e poli (butileno adipato co-tereftalato)*. (2010). 74f. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos). Universidade Estadual de Londrina. Londrina, 2010.

RITTNER, H. *Tecnologia das Matérias Graxas*. Vol. 3, Livraria Triângulo Editora Ltda, São Paulo, 2001.

ROCHA, G. O.; FARIAS, M. G.; CARVALHO, C. W. P.; ASCHERI, J. L. R.; GALDEANO, M. C.; Filmes compostos biodegradáveis a base de amido de mandioca e proteína de soja. *Polímeros*, Vol. 24, n. 5, p. 587-595, 2014.

ROCHA, R.C.S; SILVA, L.F; TACIRO, M.K; PRADELLA, J.G.C. Production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) P(3HB-co-3HV) with a broad range of 3HV content at high yields by *Burkholderia sacchari* IPT 189. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. Vol. 24, p. 427-431, 2008.

RODRIGUES, M. F. A. Uso de biopolímeros bacterianos para liberação controlada de princípios ativos com atividade farmacêutica. **Proposta de projeto** (FAPESP), p. 20, 2002.

SANT'ANA, D. V. P. Análise de fluxos metabólicos aplicada à biossíntese do polímero biodegradável Poli-3-hidroxi-butirato P(3HB) por *Burkholderia Sacchari*. (2013). 114f. Dissertação (Mestrado em Ciências). Universidade de São Paulo. São Paulo, 2013.

SCHUCHARDT, U., SERCHELI, R., VARGAS, R.M. Transesterification of vegetable oils: a review. *Journal of the Brazilian Chemical Society*. Vol. 9, nº 3, p. 199–210. 1998.

SERAFIM, L. S.; LEMOS, P. C.; REIS, M. A. M. Produção de bioplásticos por culturas microbianas mistas - *Boletim de Biotecnologia*. 2003. Disponível em: <<http://www1.esb.ucp.pt/twt/olimpiadasbio07/MyFiles/MyAutoSiteFiles/FontesInformacao253906202/samorais/ProducaoBioplasticosCulturasMicrobianasMistas.pdf>> Acesso em: 25 de outubro de 2014.

SILVA, J. M. R. *Epoxidação Químico-Enzimática do Citronelol e β -Cariofileno*. (2012). 85f. Dissertação (Mestrado em Química). Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis. 2012.

SILVA, W. A.; PEREIRA, J.; CARVALHO, C. W. P.; FERRUA, F. Q. Determinação da cor, imagem superficial topográfica e ângulo de contato de biofilmes de diferentes fontes de amido. *Ciência e Agrotecnologia*. Vol. 31, p. 154-163, 2007.

SLAYDEN, S. W.; LIEBMAN, J. F.; SAWAKI, Y; The Chemistry of Hydroxyl, Ether and peroxide groups. In: PATAI, S., CHICHESTER: J. WILEY; *The chemistry of functional groups* (ed). 103-133, 587-656, 1993.

SOLOMONS, T. W.G.; FRYHLE, C. B. *Química Orgânica*. 7ª ed. Rio de Janeiro: LTC – Livro Técnicos e Científicos, v. 1, p. 405 – 421, 2002.

SOUZA, S. M. A. *Elaboração e caracterização de filmes comestíveis biodegradáveis a base de proteínas miofibrilares*. (2001). 207f. Tese (Doutorado em Engenharia de alimentos) Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2001.

STEINBÜCHEL, A., VALENTIN, H. E., Diversity of bacterial polyhydroxyalkanoic acids. *Microbiology Letters*. Vol 128, n° 3, p. 219-228, 2006.

TOKIWA, Y; UGWU, C.U. Biotechnological production of (R)-3-hydroxybutyric acid monomer. *Journal of Biotechnology*. Vol. 132, n°3, p.264-272, 2007.

WALLACE, J.G., PETERSON, W.R., CHADWICK, A.F., BARLOW, D. O. Hydroxylation of methyl oleate. A new, direct method. *Journal of the American Oil Chemists Society*. Vol. 35, n° 8, p. 205, 1958.

YANG, L.; PAULSON, A.T. Effects of lipids on mechanical and moisture barrier properties of edible gellan film. *Food Research International*, v. 33, n. 7, p. 571- 578, 2000.

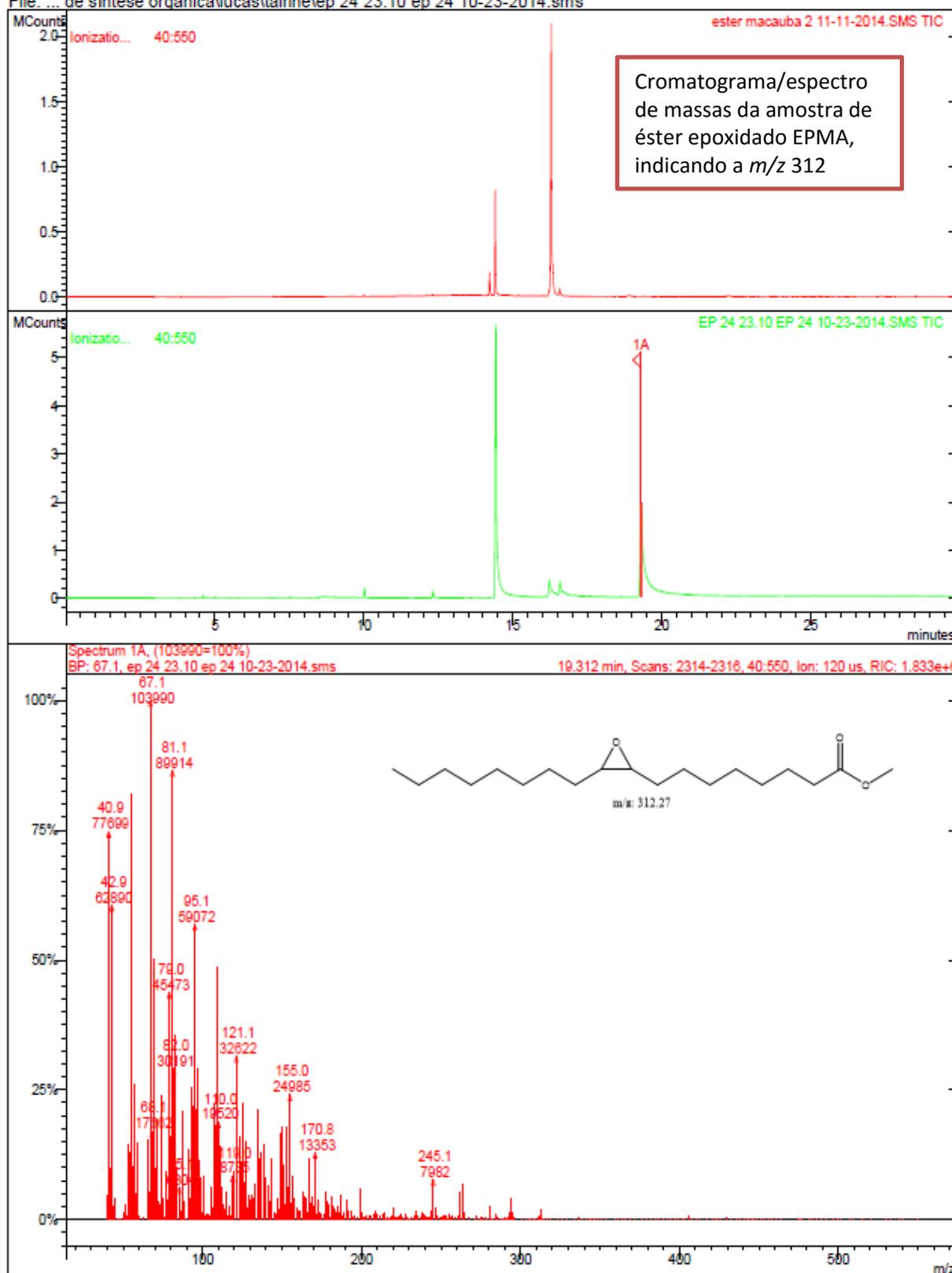
8. ANEXOS

Print Date: 11 Nov 2014 15:56:07

MS Data Review All Plots - 11/11/2014 3:56 PM

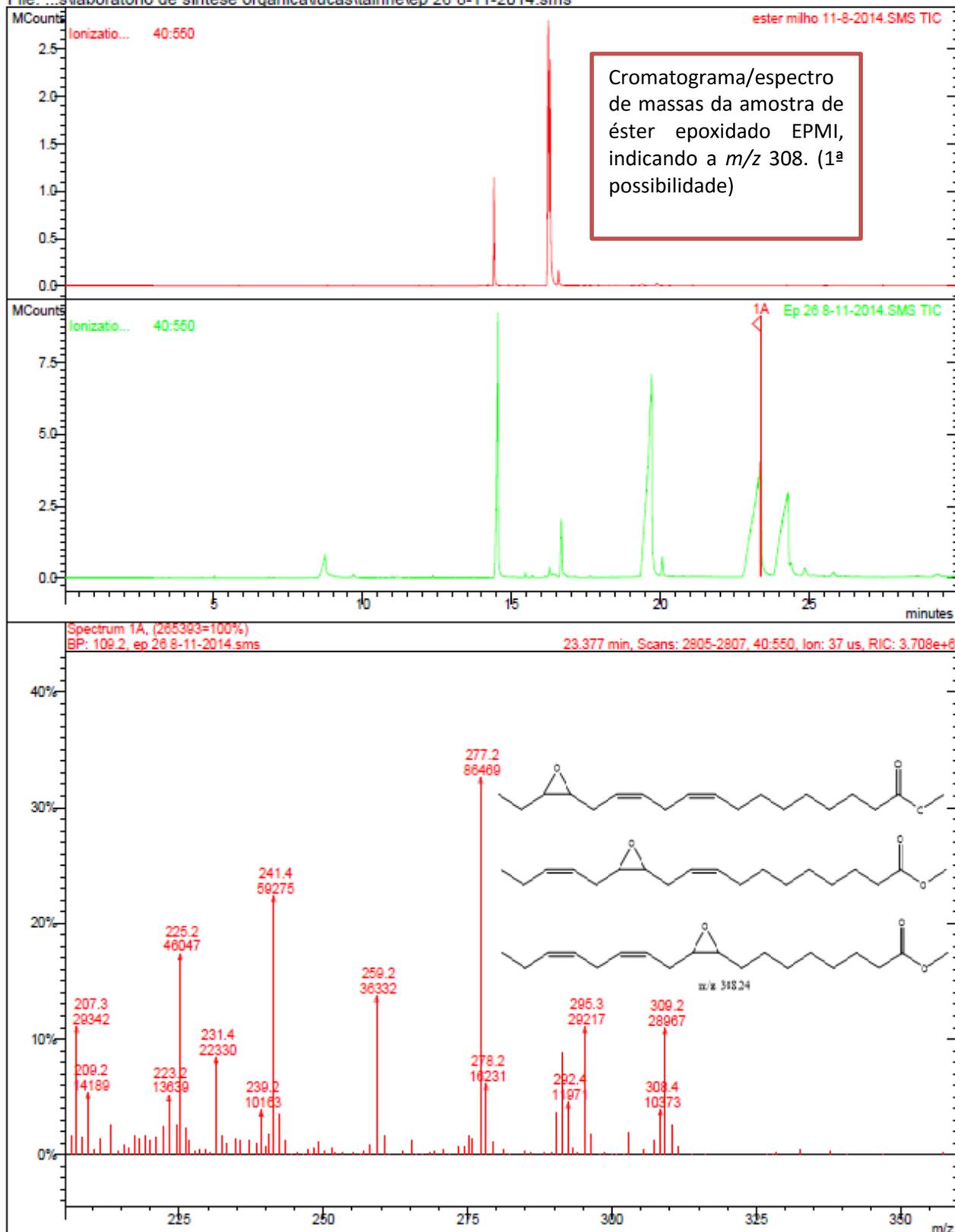
File: ...io de síntese orgânica\lucas\tairine\éster macauba 2 11-11-2014.sms

File: ... de síntese orgânica\lucas\tairine\ep 24 23.10 ep 24 10-23-2014.sms



MS Data Review All Plots - 11/11/2014 4:03 PM

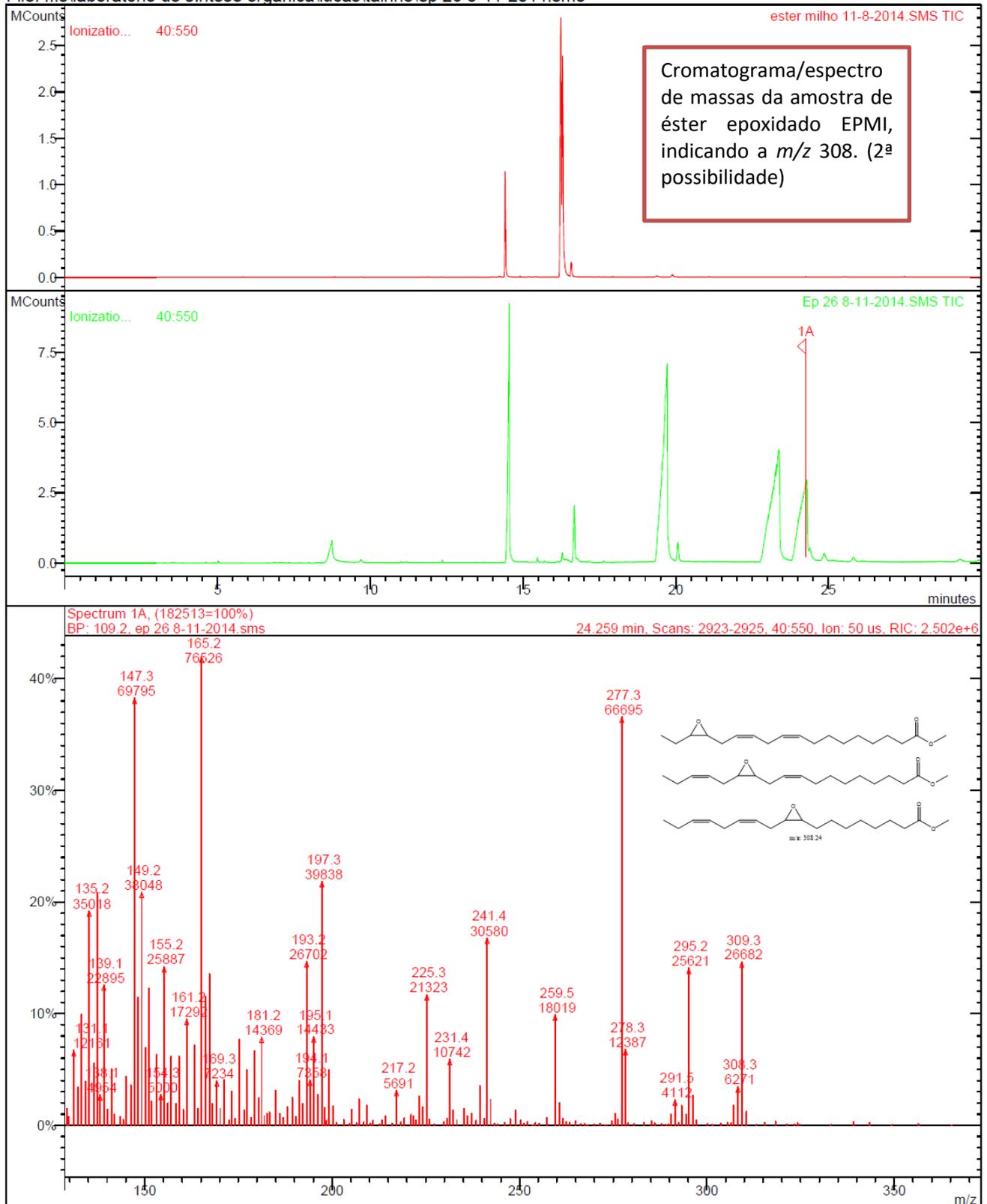
File: ...ratório de síntese orgânica\lucas\tairine\ester milho 11-8-2014.sms
File: ...s\laboratório de síntese orgânica\lucas\tairine\ep 26 8-11-2014.sms



Cromatograma/espectro de massas da amostra de éster epoxidado EPMI, indicando a m/z 308. (1ª possibilidade)

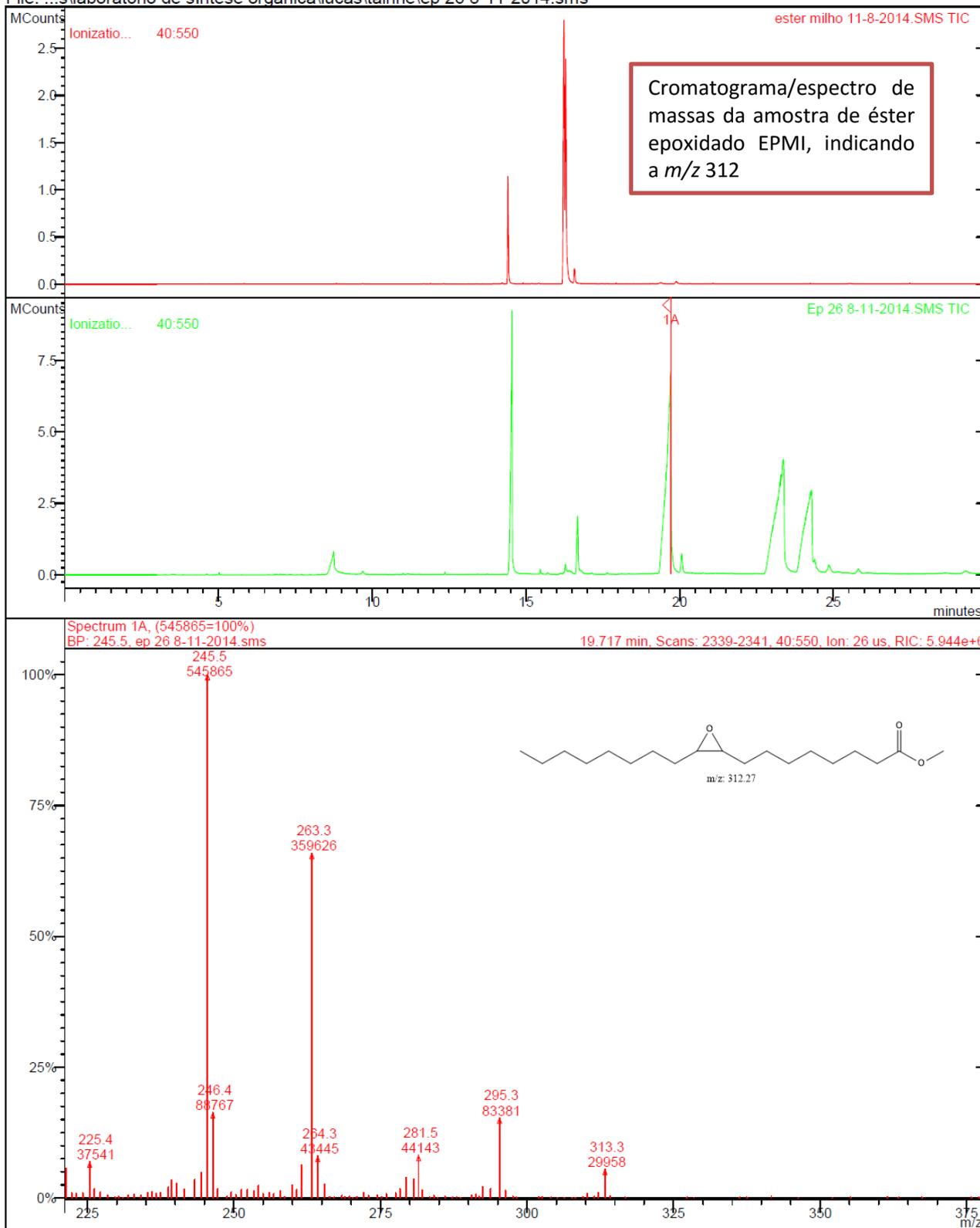
MS Data Review All Plots - 11/11/2014 4:05 PM

File: ...ratório de síntese orgânica\lucas\tairine\éster milho 11-8-2014.sms
File: ...s\laboratório de síntese orgânica\lucas\tairine\ep 26 8-11-2014.sms



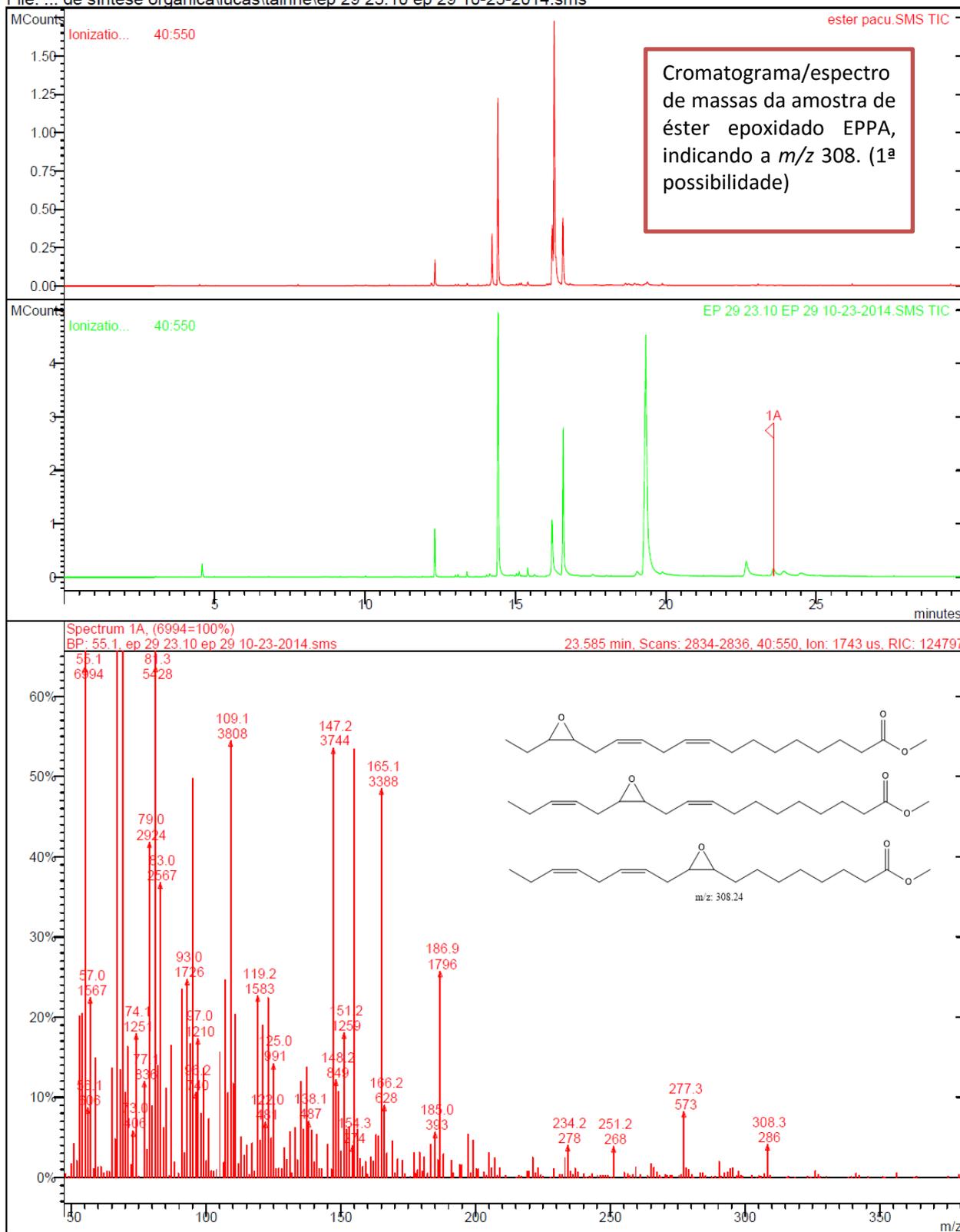
MS Data Review All Plots - 11/11/2014 4:01 PM

File: ...ratório de síntese orgânica\lucas\tairine\ester milho 11-8-2014.sms
File: ...s\laboratório de síntese orgânica\lucas\tairine\ep 26 8-11-2014.sms



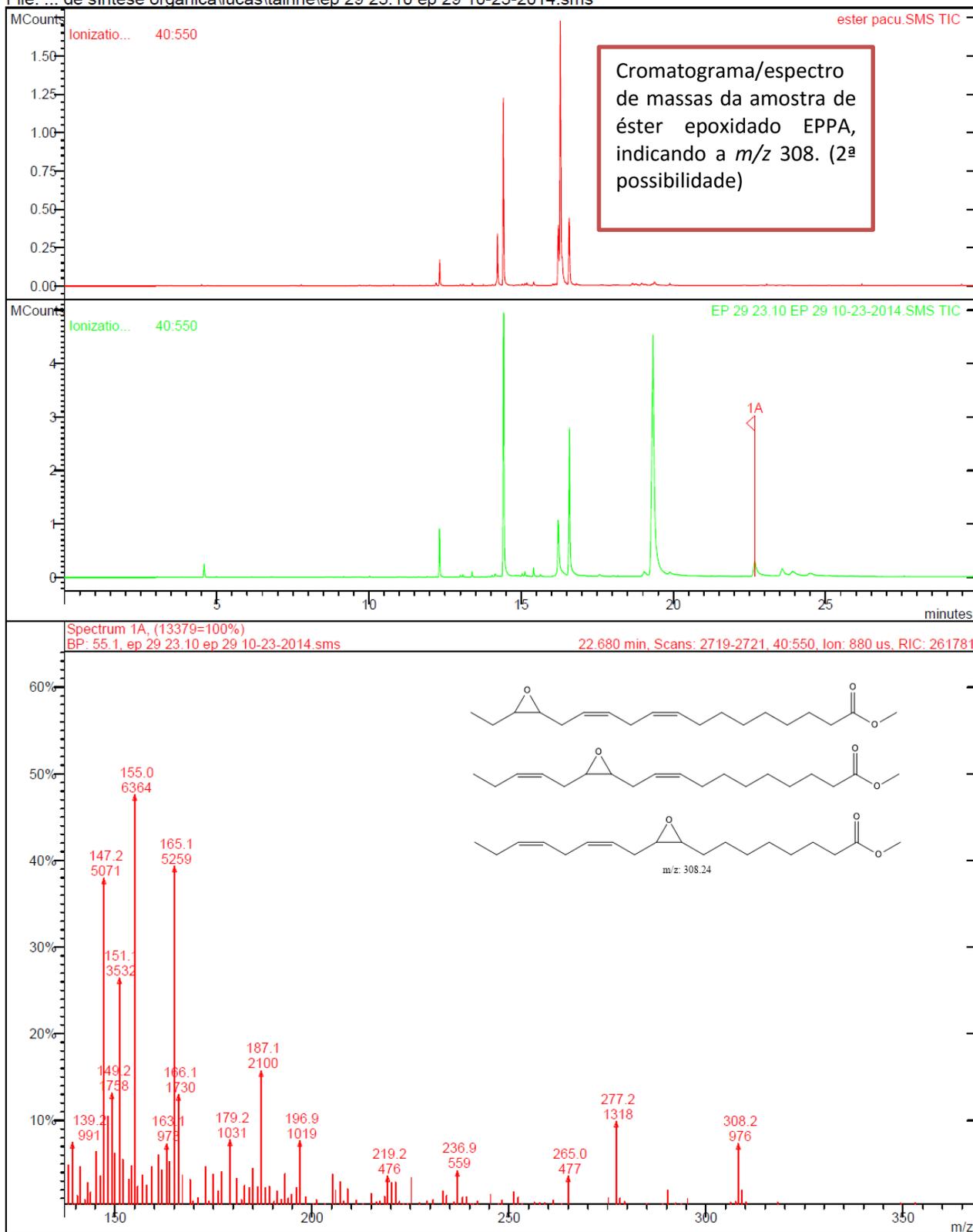
MS Data Review All Plots - 11/11/2014 4:13 PM

File: ...gramas\laboratório de síntese orgânica\lucas\tairine\éster pacu.sms
File: ... de síntese orgânica\lucas\tairine\ep 29 23.10 ep 29 10-23-2014.sms



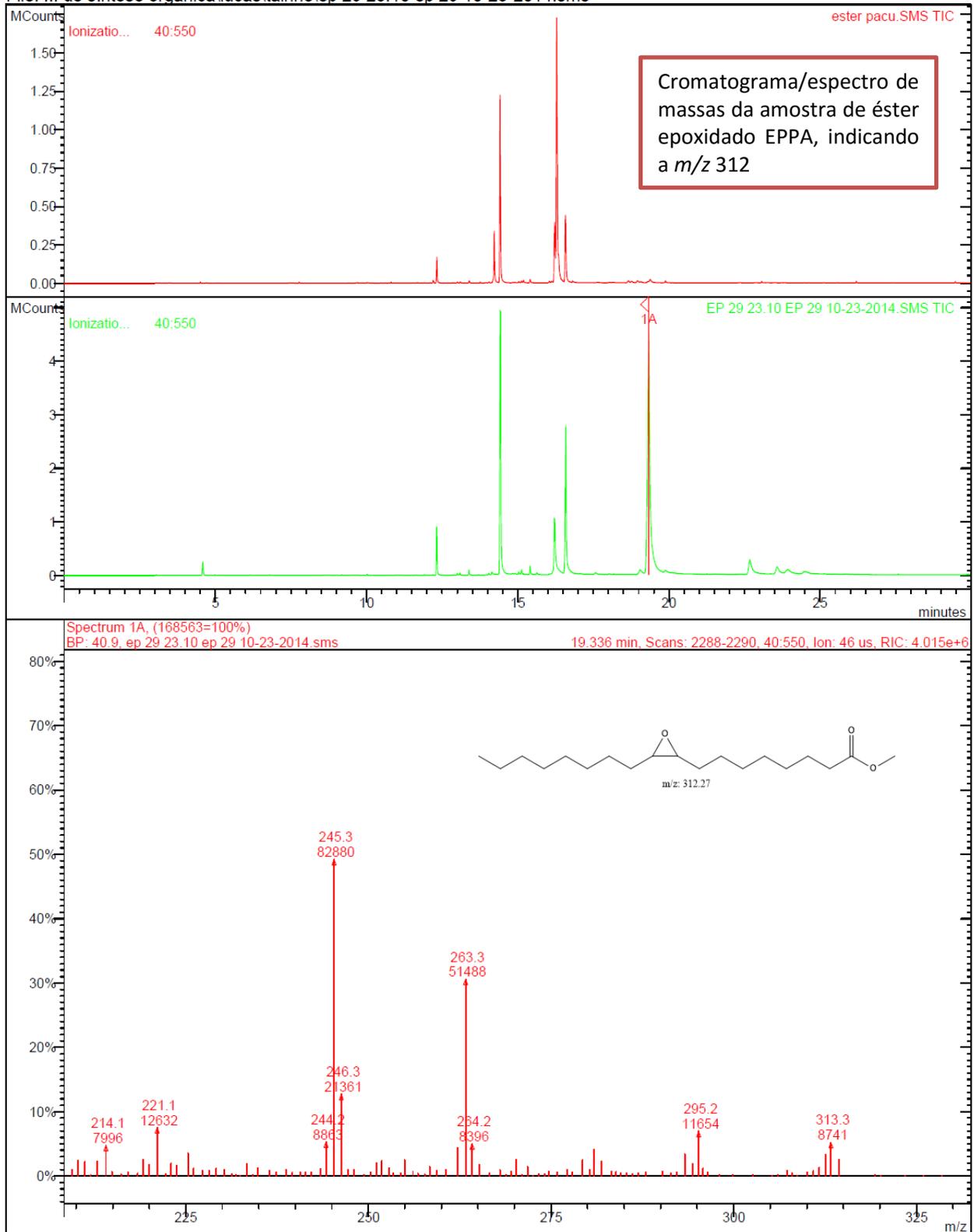
MS Data Review All Plots - 11/11/2014 4:10 PM

File: ...gramas\laboratório de síntese orgânica\lucas\tairine\éster pacu.sms
File: ... de síntese orgânica\lucas\tairine\ep 29 23.10 ep 29 10-23-2014.sms



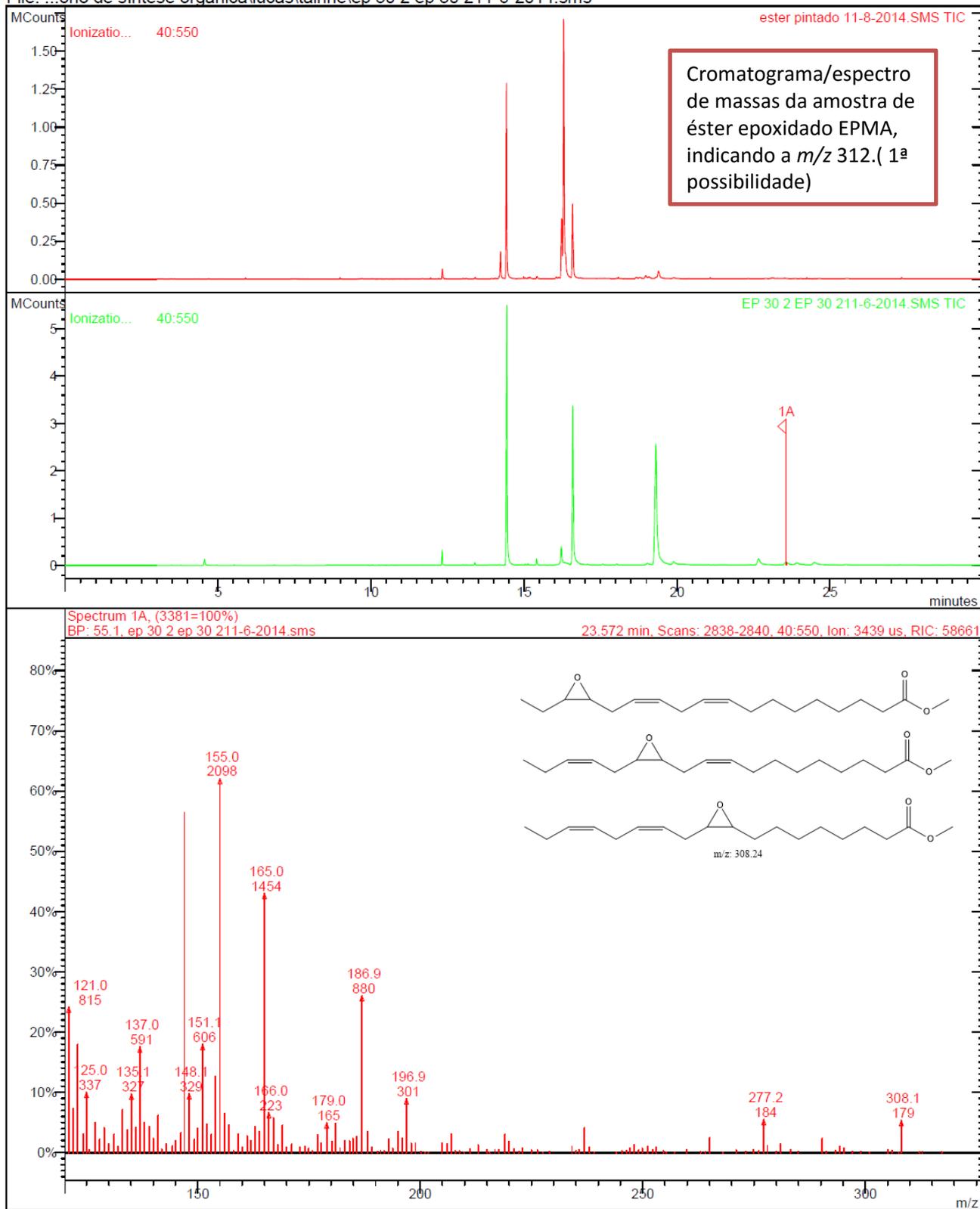
MS Data Review All Plots - 11/11/2014 4:09 PM

File: ...gramas\laboratório de síntese orgânica\lucas\tairine\éster pacu.sms
File: ... de síntese orgânica\lucas\tairine\ep 29 23.10 ep 29 10-23-2014.sms



MS Data Review All Plots - 11/11/2014 4:20 PM

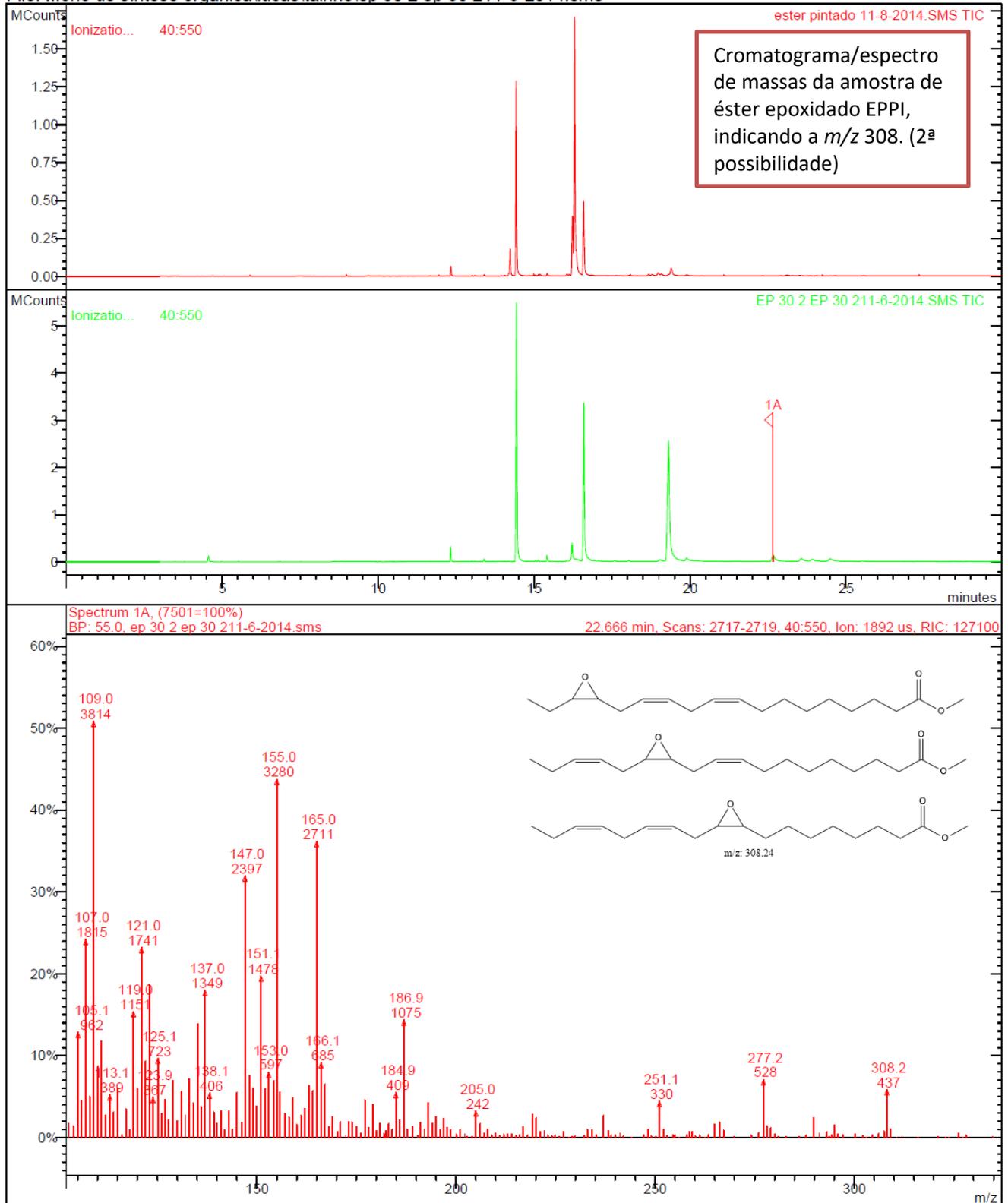
File: ...tório de síntese orgânica\lucas\tairine\éster pintado 11-8-2014.sms
File: ...tório de síntese orgânica\lucas\tairine\ep 30 2 ep 30 211-6-2014.sms



MS Data Review All Plots - 11/11/2014 4:19 PM

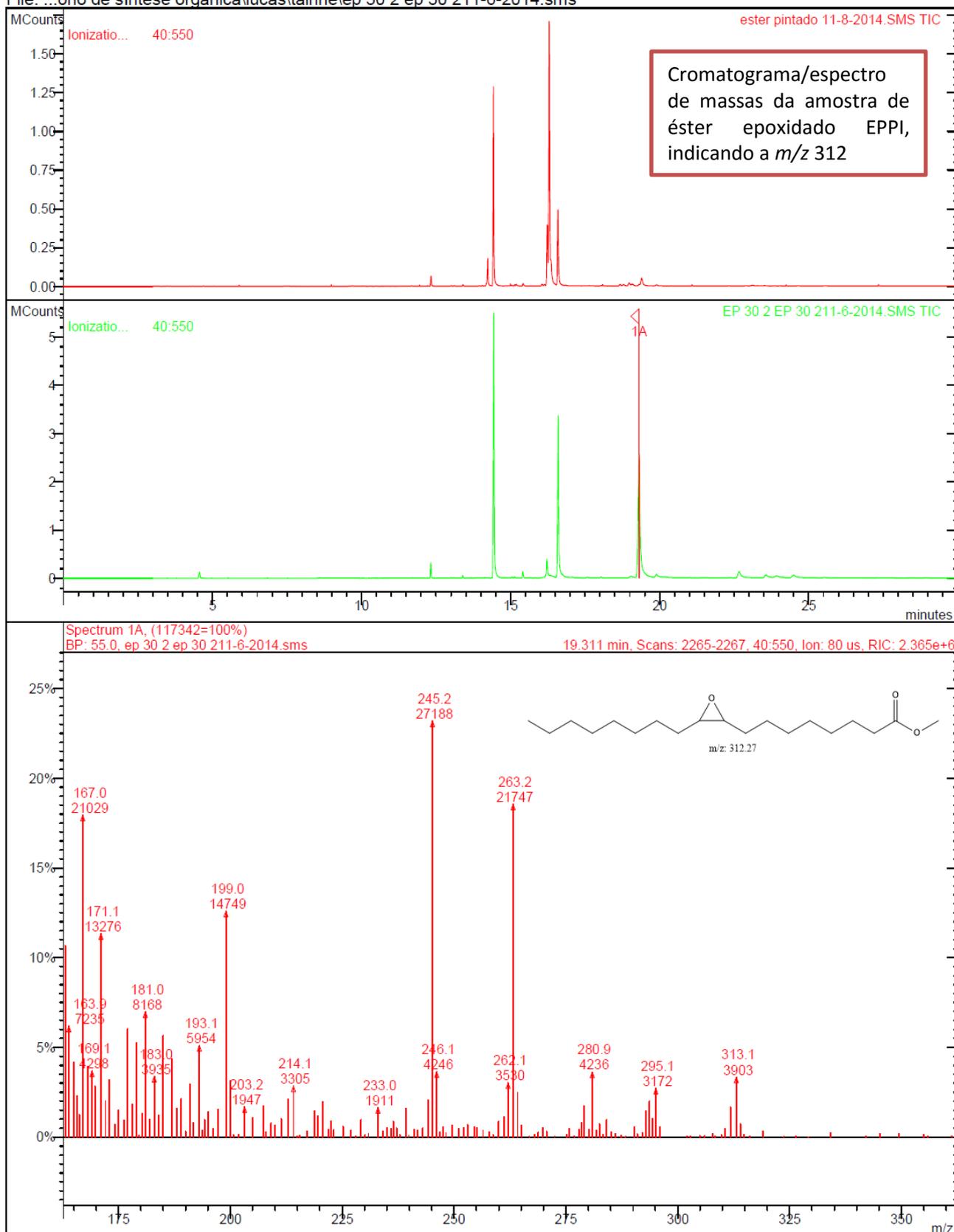
File: ...tório de síntese orgânica\lucas\airine\éster pintado 11-8-2014.sms

File: ...tório de síntese orgânica\lucas\airine\ep 30 2 ep 30 211-6-2014.sms



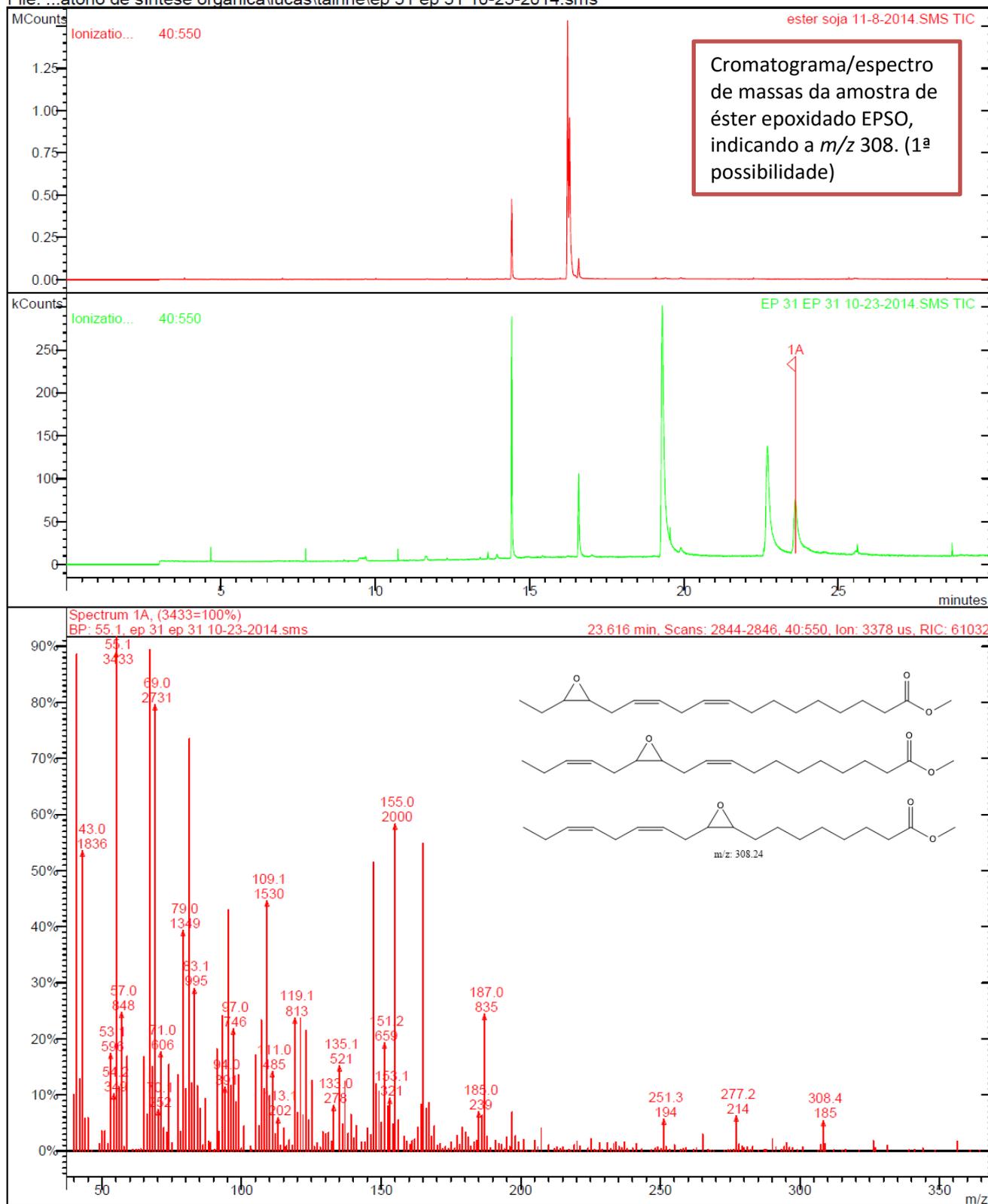
MS Data Review All Plots - 11/11/2014 4:18 PM

File: ...tório de síntese orgânica\lucas\tairine\éster pintado 11-8-2014.sms
File: ...ório de síntese orgânica\lucas\tairine\ep 30 2 ep 30 211-6-2014.sms



MS Data Review All Plots - 11/11/2014 3:52 PM

File: ...oratório de síntese orgânica\lucas\tairine\éster soja 11-8-2014.sms
File: ...oratório de síntese orgânica\lucas\tairine\ep 31 ep 31 10-23-2014.sms



MS Data Review All Plots - 11/11/2014 3:51 PM

File: ...oratório de síntese orgânica\lucas\tairine\éster soja 11-8-2014.sms
File: ...atório de síntese orgânica\lucas\tairine\ep 31 ep 31 10-23-2014.sms

