

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ENGENHARIA DE SÃO CARLOS
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA DE MATERIAIS

FELIPE PIRES DE CAMPOS GUSMAN

AVALIAÇÃO DO EFEITO BACTERICIDA DO ÓLEO DE COPAÍBA EM
FILMES DE POLI (BUTILENO SUCCINATO-CO-ADIPATO)

São Carlos

2016

FELIPE PIRES DE CAMPOS GUSMAN

AVALIAÇÃO DO EFEITO BACTERICIDA DO ÓLEO DE COPAÍBA EM
FILMES DE POLI (BUTILENO SUCCINATO-CO-ADIPATO)

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao Curso de Engenharia de Materiais e Manufatura, da Escola de Engenharia de São Carlos da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para obtenção do título de Engenheiro de Materiais e Manufatura.

Área de Concentração: Materiais poliméricos

Orientador: Profa. Dra. Márcia Cristina Branciforti

São Carlos
2016

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

P982a Pires de Campos Gusman, Felipe
Avaliação do efeito bactericida do óleo de Copaíba em filmes de poli (butileno succinato-co-adipato) / Felipe Pires de Campos Gusman; orientadora Márcia Cristina Branciforti. São Carlos, 2016.

Monografia (Graduação em Engenharia De Materiais e Manufatura) -- Escola de Engenharia de São Carlos da Universidade de São Paulo, 2016.

1. Óleo de Copaíba. 2. PBSA. 3. Efeito Bactericida.
I. Título.

AGRADECIMENTOS

A minha família, em especial aos meus pais, Fabiana e Evandro, por todos os esforços depositados em mim.

A Prof.^a Márcia Cristina Branciforti, pela confiança e apoio durante a realização do estudo.

Ao técnico Aldimar e a Central de Análises Químicas Instrumentais pelo apoio na análise de espectroscopia.

A Rafaela e a Prof.^a Ilana do Laboratório de Epidemiologia e Microbiologia Molecular pelas análises de susceptibilidade antimicrobiana.

Aos amigos Alexandre, Ana Flávia, Ana Victória, Caio, Carolina, Douglas, Fábio, João Matheus, José Eduardo, José Francisco, Raíssa e Vitor pelo companheirismo construído durante a graduação.

RESUMO

O estudo tem por interesse averiguar a incorporação e a propriedade bactericida do óleo de Copaíba quando adicionado ao filme de poli (butileno succinato-co-adipato) (PBSA) pelo método de *casting*. Esse óleo, natural, é muito difundido na cultura popular brasileira como bactericida, tendo sua eficácia comprovada cientificamente e possuindo registro na ANVISA como medicamento. Além do Brasil, esse óleo é conhecido pela suas propriedades como medicamento em vários países da América do sul e África. O PBSA é um poliéster semicristalino com propriedades semelhantes às poliolefinas, diferenciando-se por ser suscetível a biodegradação por possuir ligações éster hidrolisáveis e baixa cristalinidade. O principal interesse dessa pesquisa se insere no ramo de embalagens, uma vez que produzi-las com tal propriedade bactericida é uma forma de garantir um alimento mais fresco, livre de contaminações e com maior tempo de prateleira. Tendo isso em vista, filmes de PBSA com diferentes teores de óleo de Copaíba foram preparados e analisados quanto as suas propriedades de degradação em solo compostado e susceptibilidade antimicrobiana. A quantificação de óleo incorporado no filme polimérico objetivou avaliar a eficiência do método de *casting*. Os resultados evidenciaram que a quantidade real de óleo contido nos filmes de PBSA é significativamente inferior ao valor nominal. O óleo utilizado no trabalho não apresentou atividade bactericida, provavelmente devido à sua procedência, e conseqüentemente não reduziu a degradação das amostras quando enterradas.

ABSTRACT

The aim of this study was to investigate the incorporation and bactericidal properties of Copaiba oil when added to the poly (butylene succinate-co-adipate) (PBSA) film by the casting method. This natural oil is very widespread in Brazilian popular culture as a bactericide, having its effectiveness scientifically proved and having registered with ANVISA as a medicine. Besides Brazil, this oil is known for its medicinal properties in several countries of South America and Africa. PBSA is a semicrystalline polyester with properties similar to polyolefin, differing for being susceptible to biodegradation due to their hydrolyzable ester linkages and low crystallinity. The main interest of this research is inserted in the field of packaging, since producing them with such a bactericidal property is a way to guarantee a fresher food, free of contaminations and with a longer shelf life. PBSA films with different levels of Copaiba oil were prepared and analyzed for their degradation properties in composted soil and antimicrobial susceptibility. The quantification of oil incorporated in the polymer film aimed to evaluate the efficiency of the casting method. The results showed that the real oil content in PBSA films is significantly lower than the nominal value. The oil used in this work showed no bactericidal activity, probably due to its origin, and consequently did not reduce the degradation of the samples when soil grounded.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Estrutura química do PBSA.....	14
Figura 2 – Imagem (a) da amostra cortada e (b) do filme 40-60.....	18
Figura 3 – Sistema usado para o ensaio de biodegradação em solo compostado.....	19
Figura 4 – Esquemática do processo de separação entre óleo de Copaíba e PBSA.....	20
Figura 5 – Espectro de absorção UV das amostras padrão destinadas à curva de calibração.....	22
Figura 6 – Curva de calibração obtida para o óleo de copaíba.....	23
Figura 7 – Porcentagem de perda de massa versus tempo de degradação.....	25
Figura 8 – Fotografias das amostras de PBSA com óleo Copaíba antes e após o ensaio de degradação em solo compostado.....	26
Figura 9 – Comparação entre amostras com composição 0-100 e 20-80 e com 30 e 61 dias de degradação em solo.....	28
Figura 10 – Culturas de bactérias com as amostras de PBSA e óleo de copaíba em diferentes concentrações. (a) e (b) com bactéria <i>Staphylococcus aureus</i> e controle Cefotaxima 30 µg. (c) com bactéria <i>Enterococcus faecalis</i> e controle Imipenem 10 µg.....	29
Figura 11 – Halo de inibição da amostra de poli (ácido lático) com óleo de Copaíba observado no trabalho de Morelli e co-autores [1].....	30

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Composições das amostras e quantidades dos componentes.....	17
Tabela 2 – Amostras padrões de concentrações conhecidas de óleo de Copaíba.....	20
Tabela 3 – Massas das amostras e solventes utilizadas no teste de espectroscopia UV.....	21
Tabela 4 – Absorbância, concentração e percentagem de óleo das amostras estudadas.....	24
Tabela 5 – Perda média de massa das amostras em relação ao tempo de degradação.....	29

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

PBSA	–	Poli (butileno succinato-co-adipato)
ASTM	–	<i>American Society for Testing and Materials</i>
UV	–	Espectroscopia no ultravioleta
UFC	–	Unidade de Formação de Colônias
BHI	–	<i>Brain Heart Infusion</i>
CLSI	–	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute.</i>

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
2. OBJETIVOS	13
3. REFERENCIAL TEÓRICO	13
3.1 Óleo de Copaíba	13
3.2 Poli (butilenosuccinato-co-adipato) (PBSA).....	14
3.3 Biodegradabilidade	14
3.3.1 Avaliação da degradação por enterramento no solo	14
3.4 Avaliação da quantidade de óleo incorporada por espectroscopia UV	15
3.5 Teste de susceptibilidade antimicrobiana por disco difusão	15
4. METODOLOGIA	16
4.1 Materiais	16
4.2 Preparação das amostras	16
4.3 Avaliação da degradação por enterramento em solo compostado	17
4.4 Avaliação da quantidade de óleo incorporada por espectroscopia UV	19
4.5 Teste de susceptibilidade antimicrobiana por disco difusão	21
5. RESULTADOS	22
5.1 Avaliação da quantidade de óleo incorporada por espectroscopia UV	22
5.2 Avaliação da degradação por enterramento no solo	24
5.3 Teste de susceptibilidade antimicrobiana por disco difusão	28
6. CONCLUSÕES	30
7. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	31
8. REFERÊNCIAS	31

1. INTRODUÇÃO

A busca por alimentos mais frescos e de boa qualidade tem cada vez mais destaque no dia-a-dia das pessoas. A procura de alimentos saudáveis e menos processados e aditivados quimicamente cresceu. Com isso, a preocupação em se usar menos conservantes sem comprometer a qualidade do produto tem extrema importância. Microrganismos, como fungos e bactérias, são capazes de comprometer um alimento, podendo causar perdas à indústria e até intoxicação alimentar aos consumidores [1].

Adicionar conservantes ao alimento pode ser um problema, pois além de poderem fazer mal ao organismo, podem alterar o sabor e a textura, tornando-o menos saudável [2]. Uma alternativa capaz de contornar essa situação tão presente no cotidiano das pessoas pode ser a adição de algum composto na embalagem do alimento que seja capaz de impedir ou retardar a proliferação desses microrganismos. Recentemente pesquisadores conseguiram adicionar nanopartículas de prata na embalagem de leite e conseguiram dobrar o tempo de validade do mesmo [3]. Pensando da mesma forma, seria interessante ser capaz de adicionar algum composto que seja capaz de agir de maneira semelhante a essas partículas.

Uma possibilidade interessante está justamente num composto chamado óleo de Copaíba. Natural da Amazônia, presente em toda a América do Sul e oeste da África, esse óleo é bem difundido na cultura local por diversas propriedades cientificamente comprovadas, como o poder antiinflamatório, justamente por impedir a proliferação de bactérias [1]. Estudar a viabilidade de adicionar esse óleo aos plásticos atualmente usados como embalagem torna-se interessante, bem como averiguar o quanto ele pode ajudar a combater a proliferação de microrganismos, diminuindo a quantidade de conservantes no alimento ou aumentando o tempo de validade do produto.

Dessa maneira, o trabalho considerou um polímero biodegradável capaz de ser utilizado como embalagem. Escolheu-se o poli (butilenosuccinato-co-adipato), PBSA, que recentemente vem ganhando espaço no mercado por ser um produto ambientalmente mais amigável pelo fato de se degradar de maneira relativamente rápida sob condições de compostagem. As tradicionais poliolefinas, além de serem derivados do petróleo, são difíceis de decompor, poluindo o meio ambiente de maneira grave [3]. Além disso, o PBSA apresenta propriedades mecânicas muito semelhantes aos polímeros tradicionais, possui baixo custo de produção e é de fácil processamento, denotando plena capacidade de substituição [4]. Diferencia-se mesmo apenas pela susceptibilidade ao ataque bacteriano, propriedade de principal interesse do estudo.

Neste trabalho foi avaliada a influência do óleo de Copaíba na degradação do polímero. Para isso, realizou-se o ensaio de degradação em solo compostado, de acordo com a norma ASTM G160-03, em filmes de PBSA com diferentes quantidades de óleo. Analisando a perda de massa sofrida pelos corpos de prova, pode-se ter uma idéia da influência de quão efetiva é a adição de óleo. Pelo fato do óleo possuir efeito bactericida já comprovado, esperou-se que sua adição implicasse na maior conservação da amostra no solo.

Outra análise realizada foi a de susceptibilidade antimicrobiana dos filmes produzidos pelo método de *casting*. Corpos de prova foram submetidos a culturas de bactérias conhecidas para avaliar o quão a combinação de polímero e óleo é capaz de inibir o crescimento das mesmas. A quantidade real de óleo incorporado nos filmes de PBSA nas diferentes composições estudadas foi determinada por análise de espectroscopia no ultravioleta.

2. OBJETIVOS

Os objetivos do trabalho foram: avaliar a influência do óleo de Copaíba na degradação do PBSA em solo compostado; quantificar a porcentagem de óleo efetivamente incorporado ao filme; e determinar a ação do óleo como agente bactericida.

3. REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 Óleo de Copaíba

Constituído basicamente de sesquiterpenos ($C_{15}H_{24}$) e diterpenos ($C_{20}H_{32}$), esse tipo de óleo é extraído diretamente do tronco de árvores do gênero *Copaífera*, possuindo diversas espécies na América Latina e África [5]. Possui coloração entre amarelo e marrom, atualmente é muito utilizado na indústria de cosméticos e na medicina popular, onde esse óleo é empregado como antiinflamatório e antibiótico, sendo ingerido ou aplicado na pele [6]. Sua atividade bactericida foi cientificamente comprovada, demonstrando inibição total ou parcial de crescimento de alguns tipos de bactérias [5]. O Brasil possui apenas um registro do óleo como fármaco na ANVISA, número 116950004, que é vendido como antiinflamatório em cápsulas. Visando utilizar essa propriedade bactericida, o óleo de Copaíba foi incorporado em diferentes teores em filmes de PBSA neste trabalho.

3.2 Poli (butilenosuccinato-co-adipato) (PBSA)

O poli (butileno succinato-co-adipato) é um poliéster, com ligações hidrolisáveis que combinado com sua baixa cristalinidade, favorece a ação de microorganismos, promovendo sua degradação. Ele é um copolímero resultante da reação de condensação de glicóis como o 1,4-butanodiol e o etileno glicol na presença dos ácidos dicarboxílicos, succínico e adípico [7]. Possui propriedades semelhantes às poliolefinas, resultantes da combinação de seus precursores poli (butileno succinato), o PBS, e o poli (butileno adipato), o PBA [8]. Por possuir temperatura de fusão próxima aos 90 °C, o PBSA apresenta boa processabilidade, além de boa resistência química e mecânica, tornando-o aplicável na indústria de filmes plásticos [9]. Por essas razões, o PBSA foi considerado neste trabalho.

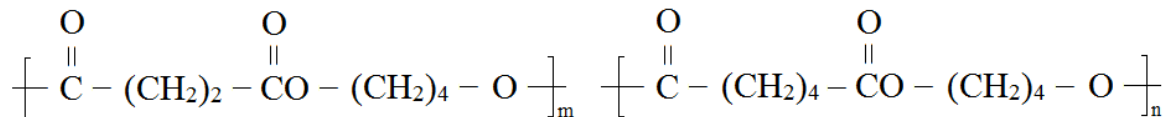


Figura 1 – Estrutura química do PBSA.

3.3 Biodegradabilidade

A biodegradação, resumidamente, é a degradação de materiais por mecanismos biológicos. Tais atividades são, na maioria das vezes, realizadas por fungos, bactérias e algas. Materiais biodegradáveis são materiais capazes de se decompor completamente no meio ambiente, resultando em inorgânicos e biomassa, não produzindo poluição [5]. Polímeros biodegradáveis possuem essa habilidade se tiverem algumas características favoráveis ao processo, sendo elas ligadas à: estrutura química, mobilidade, taticidade, cristalinidade, massa molecular, miscibilidade e capacidade de sofrer oxidação e hidrólise e hidratação. Em particular, a biodegradação do PBSA envolve um complexo processo biológico, que começa com a adesão de microorganismos à superfície, seguida de ataque de enzimas aos grupos hidrolisáveis, convertendo o polímero a água, gás carbônico e biomassa [10]. Mais informações a respeito de biodegradação em polímeros pode ser obtida no artigo de Emadian e co-autores: Biodegradation of bioplastics in natural environments [11].

3.3.1 Avaliação da degradação por enterramento no solo

O método de avaliação da degradação por enterramento no solo consiste em enterrar amostras e deixá-las junto ao solo por tempo e condições descritas na norma ASTM G160-03. A norma determina o preparo do solo, tamanho e posicionamento da amostra, condições de temperatura, umidade, pH e tempo de ensaio. O objetivo principal do ensaio é avaliar a perda de massa causada pela degradação do material por microorganismos presentes no solocompostado. Essa perda de massa pode ser descrita pela Equação 1:

$$\text{Perda de massa (\%)} = \frac{(M_I - M_F)}{M_I} \times 100\% \quad (1)$$

onde: M_I = Massa inicial do material; e M_F = Massa final do material

3.4 Avaliação da quantidade de óleo incorporada por espectroscopia UV

A espectroscopia no ultravioleta baseia-se no princípio da lei de Beer-Lambert, que expressa uma relação entre a concentração de uma determinada substância e a absorvância de radiação que a mesma apresenta. Basicamente, uma fonte de radiação monocromática na região do ultravioleta incide sobre a amostra, contida em uma cubeta, com uma concentração conhecida do composto a ser analisado. Um detector de radiação mede o quanto dessa luz foi capaz de atravessar a amostra e, a partir desse resultado, pode-se construir curvas com concentrações conhecidas para estimar concentrações desconhecidas dessa substância. É uma técnica bastante utilizada pelo fato de ser extremamente sensível e de fácil manuseio [4].

Essa técnica foi utilizada no experimento para determinar a quantidade de óleo presente na mistura com o polímero. Por mais que se misture uma massa conhecida de óleo, a espectrofotometria UV permite determinar o quanto realmente de óleo está presente naquela composição, pois durante o processo de produção dos filmes existem algumas perdas possíveis, como o óleo que fica aderido as paredes dos recipientes utilizados durante a preparação.

3.5 Teste de susceptibilidade antimicrobiana por disco difusão

O teste de susceptibilidade aos microorganismos por disco de difusão é um método de avaliação da atividade microbiana muito utilizado atualmente. O princípio desse método baseia-se em difundir através do ágar um produto antimicrobiano, para verificar a inibição do

crescimento de algum microorganismo inoculado naquele meio [12]. Essa inibição, caso aconteça, pode ser quantificada medindo-se a largura ao redor do corpo de prova onde não houve crescimento microbiano, recebendo o nome de halo de inibição.

Quanto maior o halo de inibição, maior é o poder bactericida do material analisado. Dependendo da aplicação do produto, destinam-se determinados grupos de bactérias que são comuns ao meio de atuação que o produto se destina.

4. METODOLOGIA

4.1 Materiais

O óleo de Copaíba foi fornecido pela Amazon Leve. O polímero PBSA usado foi o Bionolle[®] 3000 MD fabricado pela Slowa Denko K.K. do Japão, possui massa molar média de 60.000 g/mol, temperatura de fusão de 94°C, temperatura de transição vítrea de -45°C, e grau de cristalinidade entre 20-35%. Os reagentes químicos, heptano, clorofórmio e diclorometano, todos P.A. foram adquiridos da empresa Synth.

4.2 Preparação das amostras

As amostras dos filmes de PBSA com óleo de Copaíba foram preparadas por *casting*, que consiste na dissolução do material em solvente e posterior evaporação do mesmo para a obtenção do filme. Neste trabalho foi utilizado diclorometano como solvente. Com base na referência de Morelli e co-autores [1], que utilizaram o óleo da marca Naturais da Amazônia, decidiu-se que seria interessante trabalhar com faixa de concentração de óleo entre 0% e 60% em peso, em intervalos de 10%. Descartou-se a concentração de 10%, pois, dados do trabalho de Morelli, evidenciaram que a amostra com essa concentração inicial não demonstrou atividade bactericida por conter pouco óleo.

Para preparar os filmes, calculou-se a proporção de massa entre PBSA e óleo, utilizando diclorometano na proporção 4:1 em relação ao PBSA e para um volume fixo de 30ml. A mistura foi agitada por cerca de uma hora no agitador magnético e posteriormente foi vertida em uma placa de petri, onde ficou secando em temperatura ambiente por dez dias. Durante esse período, as amostras ficaram cobertas para que a evaporação fosse a mais lenta possível, minimizando o aparecimento de trincas. As amostras foram nomeadas neste trabalho

de acordo com sua composição, como por exemplo, a composição com 30% em peso de óleo e 70% em PBSA é denominada por “30-70”, e assim por diante. A Tabela 1 apresenta as composições estudadas e as massas dos componentes.

Tabela 1 – Composições das amostras e quantidades dos componentes.

Amostra	Massa de PBSA	Massa de Óleo	Massa de Solvente
Óleo-PBSA	(g)	(g)	(g)
0-100	7,86	-	31,44
20-80	7,40	1,85	29,58
30-70	7,11	3,05	28,44
40-60	6,77	4,51	27,08
50-50	6,35	6,35	25,41
60-40	5,83	8,74	23,32

4.3 Avaliação da degradação por enterramento em solo compostado

A análise da degradação por enterramento em solo compostado foi dada segundo a norma ASTM G160-03. A norma determina que as amostras dos filmes possuam dimensões de pelo menos 50 mm x 50 mm (largura e comprimento) e que cada amostra seja avaliada no mínimo em triplicata. No entanto, devido à presença de trincas nos filmes para algumas composições, não foi possível criar corpos de prova do tamanho mínimo que a norma determina, que é de 50 mm x 50 mm. O tamanho comum para todas as amostras foi de 20 mm x 20 mm. Como a metodologia baseia-se na medida da perda de massa, esse não foi um grande problema, haja visto que importante é a medida da massa inicial e da massa final dos corpos de prova da amostra. A Figura 1 apresenta imagens do filme obtido após secagem na placa de petri e de uma amostra depois de cortada.

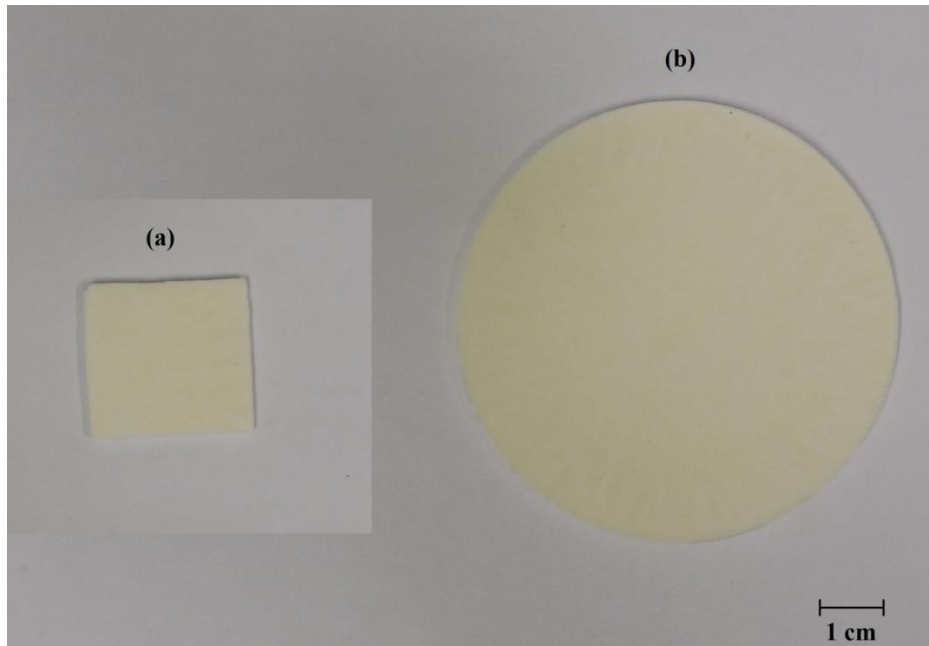


Figura 2 - Imagem (a) da amostra cortada e (b) do filme 40-60.

Pela dificuldade em se obter filmes sem trincas, foram feitas amostras no número mínimo que a norma determina, isto é três de cada composição. Além do mais, foram feitos ensaios em cinco períodos diferentes, 30, 61, 90, 119 e 150 dias. Dessa forma, para as seis composições estudadas, foram preparados 90 corpos de prova, os quais foram devidamente pesados em balança analítica antes de serem enterrados.

Os corpos de prova foram enterrados em solo compostado, a 6 cm no recipiente que possui 12 cm de altura, e foram espaçados 5 cm entre eles. Como a norma também determina, é preciso controlar a umidade relativa do ar entre 85% e 95%, para garantir que o solo tenha aproximadamente 30% de água em peso. Para garantir a umidade, o sistema foi envolvido por um plástico e a umidade foi controlada por um termohigrômetro, como mostra a Figura 2.



Figura 3 - Sistema usado para o ensaio de biodegradação em solo compostado.

Dados de umidade do ar e temperatura foram colhidos diariamente. Além disso, a norma também determina que sejam registradas umidade do solo e pH periodicamente, para garantir que nada saia das conformidades. Após o período de degradação no solo compostado as amostras foram retiradas, limpas, secas e tiveram suas massas registradas para quantificar a perda de massa das composições.

4.4 Avaliação da quantidade de óleo incorporada por espectroscopia UV

Por meio da técnica de espectroscopia UV foi possível determinar a quantidade de óleo presente em cada composição de filme. Foi utilizado o espectrofotômetro da marca Shimadzu, modelo UV-1800, pertencente ao CAQI (Central de Análises Químicas) do Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo. Quatro soluções padrões de concentrações conhecidas de óleo, apresentadas na Tabela 2, foram preparadas em heptano e medidas no UV para a construção da curva de calibração. O pico escolhido para a construção da curva foi o de comprimento de onda de 250 nm, com base na referência de Morelli e co-autores [1].

Tabela 2 – Amostras padrão de concentrações conhecidas de óleo de Copaíba.

Padrão	Concentração de óleo de Copaíba (g/L)
Amostra 1	0,0013
Amostra 2	0,0017
Amostra 3	0,0026
Amostra 4	0,0048

Para quantificar a real quantidade de óleo nas amostras dos filmes de diferentes composições, procedeu-se de acordo com o esquema apresentado na Figura 3. Inicialmente, uma pequena massa de filme foi dissolvida em uma pequena quantidade de clorofórmio. Posteriormente, gotejou-se em uma grande quantidade de heptano sobre a solução. Nesse processo, o óleo é separado do PBSA, pois no primeiro passo, o clorofórmio dissolve as duas partes, porém, como o PBSA é insolúvel em heptano, ao gotejá-lo, o PBSA prontamente se precipita e vai para o fundo do recipiente, enquanto o óleo, solúvel em heptano, fica dissolvido. Da solução resultante foi retirada uma pequena amostra de 3 ml e levada para o espectrofotômetro UV, onde mediu-se a absorvância e de acordo com a curva de calibração traçada determinou-se a concentração real contida naquela composição.

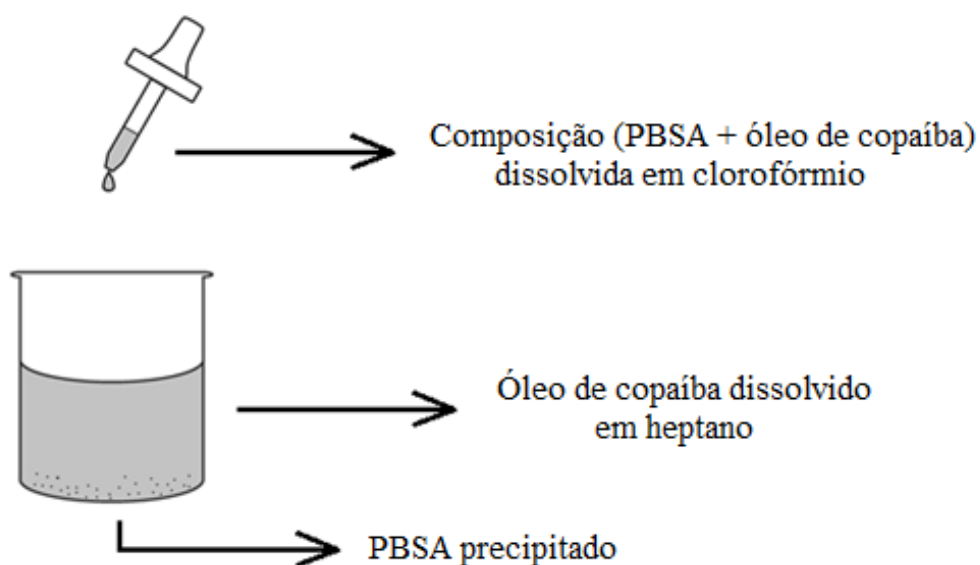


Figura 4 - Esquemática do processo de separação entre óleo de Copaíba e PBSA.

A massa utilizada de cada composição, assim como as quantidades de solventes utilizados e a concentração da solução de óleo são apresentadas na Tabela 3.

Tabela 3 – Massas das amostras e solventes utilizadas no teste de espectroscopia UV.

Amostra	Massa (g)	Clorofórmio (g)	Heptano(g)	Concentração (g/L)
0-100	0,0169	0,1265	25,0410	-
20-80	0,0148	0,1442	25,0475	0,0962
30-70	0,0177	0,1429	25,1388	0,1524
40-60	0,0192	0,1530	25,1518	0,2408
50-50	0,0185	0,2955	25,1820	0,2711
60-40	0,0146	0,3103	25,2945	0,2410

A partir da curva de calibração, estimou-se a concentração de óleo contida nas amostras levadas ao equipamento e pode-se comparar com a concentração que se esperava obter de acordo com os cálculos da Tabela 3. Desse modo, tem-se o quanto de fato desse óleo utilizado foi incorporado ao corpo de prova.

4.5 Teste de susceptibilidade antimicrobiana por disco difusão

Como o estudo destina-se a aplicação em embalagens de alimentos, buscou-se analisar as amostras com bactérias comuns do cotidiano humano. Escolheu-se linhagens bacterianas *Staphylococcus aureus* ATCC25923 e *Enterococcus faecalis* ATCC29212. Essas bactérias são armazenadas no freezer à -80 °C e foram estriadas em placas de BHI (*Brain Heart Infusion*) e incubadas a 35 °C por 24 h. Uma colônia de cada foi inoculada em 10 mL de meio BHI e incubadas a 35 °C por 18 h. Placas de meio *Mueller Hinton* (MH) ágar foram preparadas 24 h antes do experimento e armazenadas a temperatura ambiente. As bactérias foram então ajustadas para uma concentração de 10⁸ UFC/mL (0,5 na escala *McFarland*), diluídas em solução salina 0,85% (1:10) e 4 mL da suspensão bacteriana foram adicionados às placas MH.

Foram cortados discos com 14 mm de diâmetro e 1 mm de espessura das amostras com diferentes composições de óleo de Copaíba (Tabela 1). Após a completa homogeneização na superfície do ágar, retirou-se o excesso de suspensão bacteriana e as placas foram deixadas para secagem antes da colocação dos discos. Com o auxílio de uma pinça os discos de análise e de antibiótico (controle positivo) foram colocados na superfície

do ágar e as placas foram então incubadas a 35 °C por 20 h. Após este período, foi feita a leitura dos halos de inibição. O teste para *Staphylococcus aureus* foram realizados em duplicata. Todo o ensaio foi realizado de acordo com a norma CLSI M100-S25 pelo Laboratório de Epidemiologia e Microbiologia Molecular (LEMiMo) do Instituto de Física IFSC-USP.

5. RESULTADOS

5.1 Avaliação da quantidade de óleo incorporada por espectroscopia UV

Para construir a curva de calibração, as amostras padrão preparadas com concentrações conhecidas (Tabela 2) foram medidas no espectrofotômetro UV. A Figura 4 apresenta os espectros de UV obtidos para as amostras.

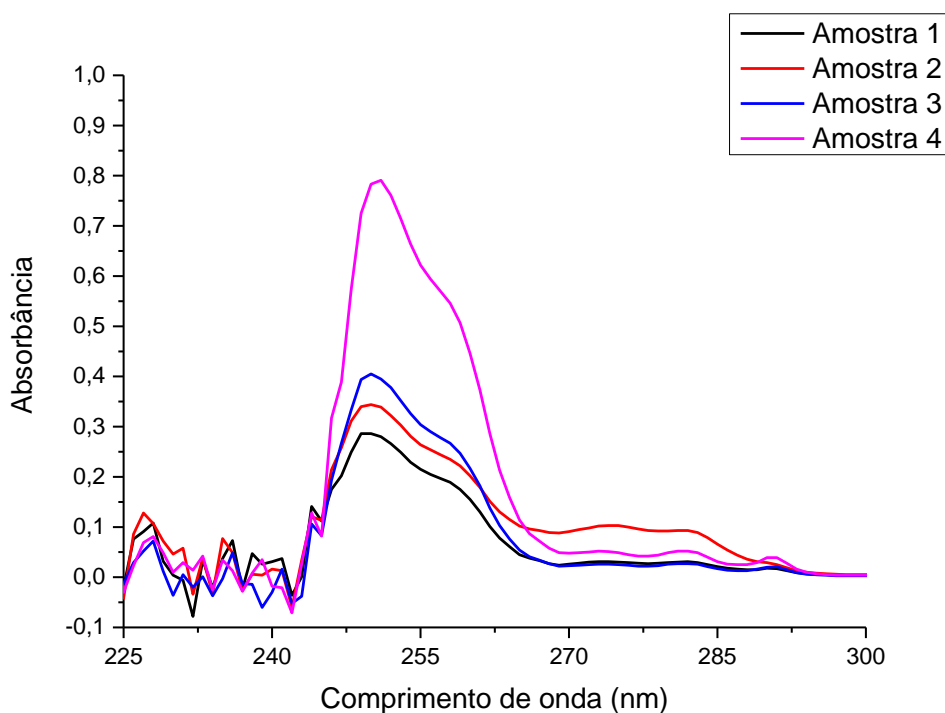


Figura 5 - Espectro de absorção UV das amostras padrão destinadas à curva de calibração.

Como no trabalho Morelli e co-autores [1], o pico de maior absorção UV do óleo de Copaíba se encontrou no comprimento de onda de 234 nm. No caso do óleo utilizado, o maior pico foi na casa dos 250 nm. Isso pode ser explicado pelo fato de que óleos de diferentes espécies do gênero *Copaifera* podem apresentar variações em sua composição. Os valores de

absorbância referentes ao máximo dos picos foram registrados para construir curva de calibração apresentada na Figura 5.

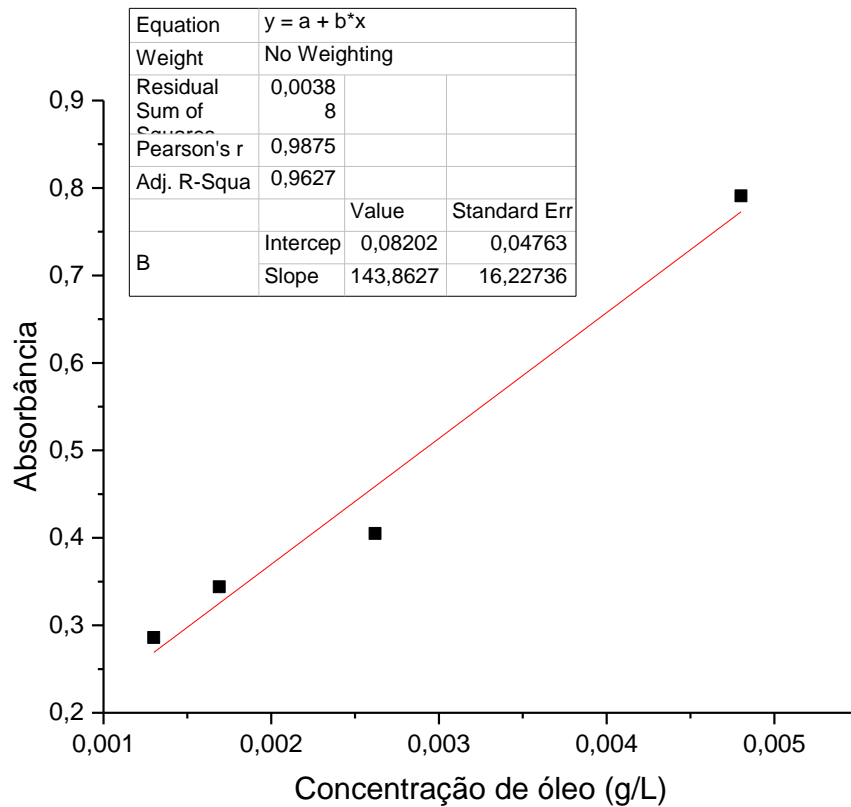


Figura 6 - Curva de calibração obtida para o óleo de copaíba.

A partir da Figura 5, obteve-se a equação da reta e o coeficiente de determinação:

Equação da reta: $y = 143,86x + 0,082$

Coeficiente de determinação: $R^2 = 0,96278$

A partir da equação da reta obtida da curva de calibração foi possível determinar a quantidade de óleo de copaíba presente nos filmes. Para tanto, as soluções do óleo dissolvido em heptano e preparadas como descrito no item 4.4, foram medidas no espectrofotômetro UV. A partir dos valores de absorbância obtidos e levando-se em consideração as diluições anteriormente realizadas para o preparo das soluções, foi possível determinar a concentração real de óleo de Copaíba para cada composição de filme estudada. A Tabela 4 apresenta os valores de absorbância, concentração e percentagem em massa de óleo para os filmes estudados.

Tabela 4 – Absorbância, concentração e percentagem de óleo das amostras estudadas.

Amostra	Absorbância	Concentração (g/L)	Óleo incorporado (%)
20-80	0,300	0,00152	8,3
30-70	0,539	0,00318	12,2
40-60	0,556	0,00340	15,5
50-50	0,699	0,00429	17,2
60-40	0,564	0,00335	15,8

Os resultados mostram que a quantidade real de óleo presente nos filmes é consideravelmente menor do que a quantidade nominal. Essa diferença é bem provavelmente devido a exudação e a volatilização do óleo tanto durante o preparo dos filmes por *casting* quanto durante o manuseio dos mesmos para os ensaios. Grandes diferenças entre o valor nominal e real de óleo contido em filmes de poli(ácido lático) também foi observado no trabalho de Morelli e co-autores [1].

5.2 Avaliação da degradação por enterramento no solo

As 90 amostras foram produzidas como descrito anteriormente e suas composições foram apresentadas na Tabela 3. Entretanto, nas últimas duas composições 50-50 e 60-40, ou seja, com 50% e 60% (valores nominais) de óleo Copaíba, o solvente calculado não foi capaz de dissolver o PBSA por completo. As maiores quantidades de óleo envolvida nesses filmes fez com que o solvente não fosse suficiente. Por isso, foram adicionados aproximadamente mais 5mL para a composição 50-50 e mais 10 mL para a composição 60-40.

Durante todo o ensaio não houve mudança de pH do solo, o qual se manteve em 7. A umidade do solos e manteve em $31,45 \pm 0,41$ %. A temperatura média do experimento foi de $19,8 \pm 1,7$ °C e a umidade média do ar foi de $90,51 \pm 5,77$ %.

A evolução da perda de massa para cada composição está registrada na Figura 6 e a Figura 7 apresenta uma fotografia representativa de cada composição antes e após o ensaio de degradação por enterramento em solo compostado. Todos os dados de perda de massa, bem como o desvio padrão das medidas, estão listados na Tabela 5.

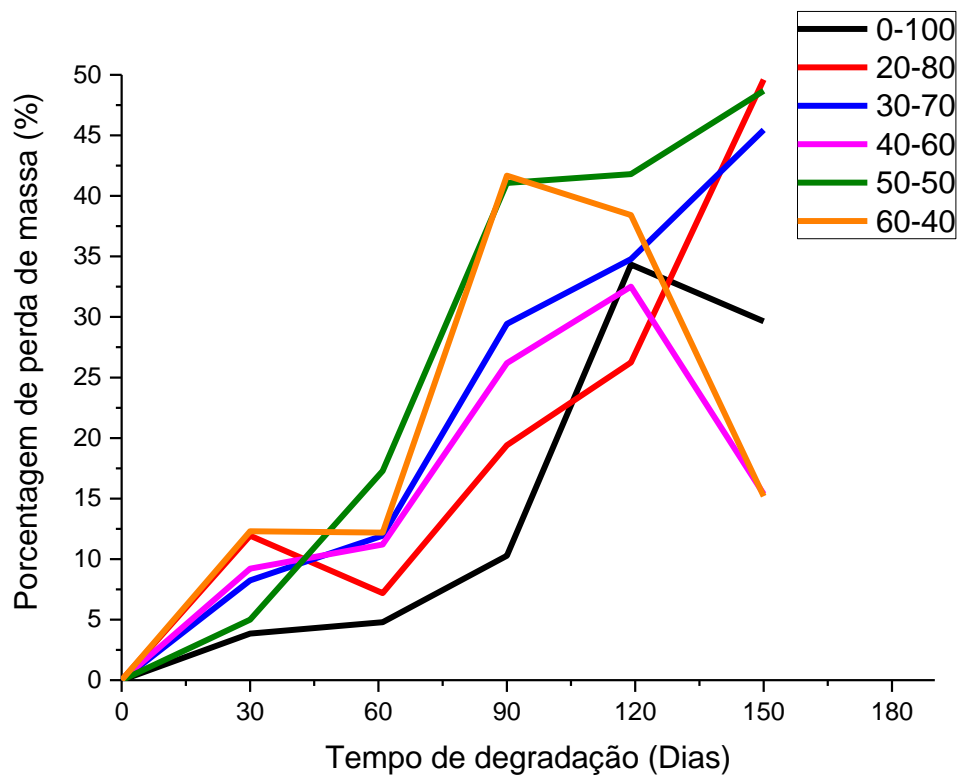


Figura 7 - Porcentagem de perda de massa versus tempo de degradação.

Tabela 5 – Perda média de massa das amostras em relação ao tempo de degradação.

Amostra	Perda Média de Massa (%)				
	30 dias	61 dias	90 dias	119 dias	150 dias
0-100	3,85±0,26	4,78 ±1,53	10,29 ±1,61	34,33 ±4,27	29,65 ±22,91
20-80	11,94 ±4,85	7,19 ±0,30	19,41 ±4,21	26,25±1,32	49,61 ±2,43
30-70	8,25 ±2,70	11,93 ±2,45	29,44 ±1,74	34,78 ±1,67	45,45 ±1,18
40-60	9,21 ±0,55	11,21 ±0,77	26,19 ±1,88	32,51 ±2,09	15,38 ±5,32
50-50	4,99 ±0,14	17,26 ±10,20	41,07 ±0,61	41,80 ±1,11	48,67 ±0,63
60-40	12,30 ±0,51	12,19 ±0,49	41,68 ±1,25	38,41 ±0,45	15,19 ±2,66

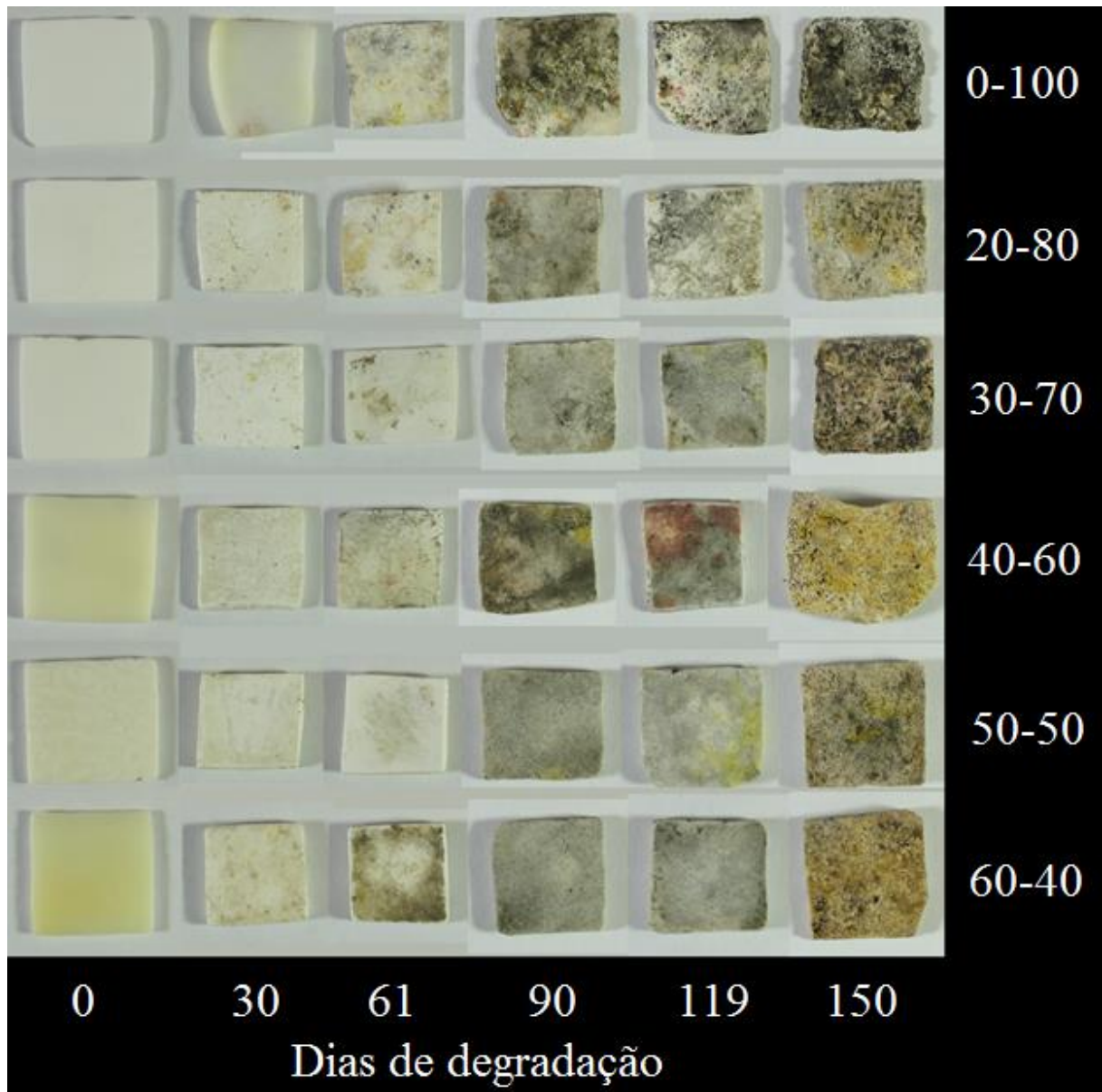


Figura 8 - Fotografias das amostras de PBSA com óleo Copaíba antes e após o ensaio de degradação em solo compostado.

A norma ASTM G160 sugere inicialmente uma avaliação visual qualitativa segundo a alteração na coloração da superfície das amostras após o ensaio. Dessa forma, observando a Figura 7 pode-se avaliar que com 30 dias de enterramento, as amostras podem ser classificadas no menor nível de observância, nível 1, pois apresentaram alteração na coloração com cobertura menor que 10%. As amostras até 61 dias enterradas foram classificadas com nível 2 de observância, pois apresentaram leve alteração com cobertura de 10 a 30%, com exceção das amostras 0-100 e 60-40 que apresentaram alteração moderada (cobertura de 30 a 60%) e foram classificadas no nível 3 de observância. A partir de 90 dias todas as amostras

apresentaram alteração pesada com coberturas acima de 60%, sendo então classificadas no maior nível de observância de coloração, nível 4. Portanto, em geral pode-se afirmar que visualmente, todas as amostras nas diferentes composições estudadas apresentaram degradação crescente com o tempo de compostagem.

O gráfico apresentado na Figura 6 mostra que a amostra 0-100, ou seja, PBSA sem óleo de Copaíba, apresenta crescente perda de massa por degradação entre 0 e 119 dias, como esperado devido a ação das enzimas que agem erodindo a superfície do filme polimérico. No entanto, aos 150 dias foi observado um decréscimo na perda de massa, de $34,33 \pm 4,27$ % aos 119 dias para $29,65 \pm 22,91$ % aos 150 dias e com elevado desvio padrão, indicando alguma inconformidade experimental.

A não conformidade pode ter acontecido pelo fato de que as amostras não ficaram uniformes, algumas ficaram com superfície mais lisa e outras apresentaram rugosidades, resultado do período em que foram feitas. Observou-se que a temperatura dos dias em que as amostras foram submetidas à secagem influenciou diretamente na qualidade do filme obtido, porém, não foi algo possível de se prever ou controlar. Dias mais frios, nos quais as amostras secaram de forma mais lenta, observou-se que as amostras apresentaram mais rachaduras e superfície mais lisa. Em dias mais quentes, as amostras secaram mais rapidamente e apresentaram menos rachaduras e superfície menos lisa.

É descrito na literatura [13] que a degradação do PBSA ocorre pelos processos de degradação hidrolítica e biodegradação induzida por microorganismos produzindo um conjunto adequado de enzimas. O mecanismo da biodegradação induzida não é conhecido, mas aparentemente a decomposição do PBSA estimula o crescimento de bactérias *Bacillus Pumilus*. Os radicais dos ácidos succínico e adípico oriundos da hidrólise servem de como nutrientes e fonte de carbono sendo devorados por microorganismos [14].

Em relação às amostras com óleo, nota-se que todas apresentaram maior degradação (perda de massa, Figura 6) em até 90 dias em comparação com a amostra sem óleo. Logo com 30 dias foi possível observar porosidade na superfície das amostras, coisa que não aconteceu com a amostra sem óleo. Com bases nesses resultados pôde-se supor que o óleo contido no PBSA difundiu para a terra, resultando no aumento da porosidade da amostra, que por sua vez favoreceu o abrigo de umidade e microorganismos, resultando assim no comportamento inverso ao esperado, ou seja, com a saída do óleo e o aumento da porosidade, o polímero sofreu maior degradação. Além disso, o óleo, ainda que parcialmente contido no filme polimérico ou nos arredores da amostra, não atuou como agente bactericida. Na Figura 8, pode-se observar como exemplo a maior porosidade da amostra 20-80, com óleo, em

comparação com a amostra 0-100, sem óleo. A porosidade favorece o ataque de microorganismos devido à maior área superficial.

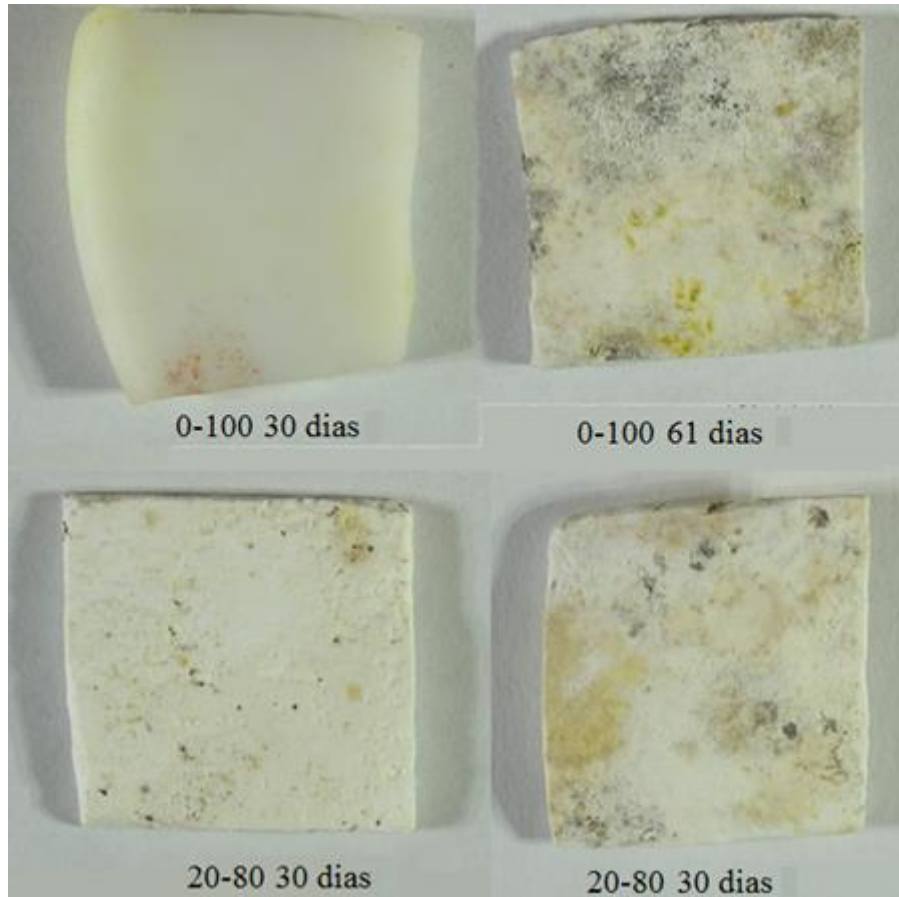


Figura 9 - Comparação entre amostras com composição 0-100 e 20-80 e com 30 e 61 dias de degradação em solo.

As perdas de massas com o tempo de enterramento observado para as amostras: 20-80 aos 61 dias; 40-60 aos 150 dias; e 60-40 aos 61, 119 e 150 dias, demonstram novamente a não conformidade experimental, similar a relatada anteriormente para a amostra 0-100, e não estão de acordo com as observações visuais das amostras.

5.3 Teste de susceptibilidade antimicrobiana por disco difusão

A Figura 9 apresenta as placas de petri com os corpos de prova nas culturas de bactérias estudadas.

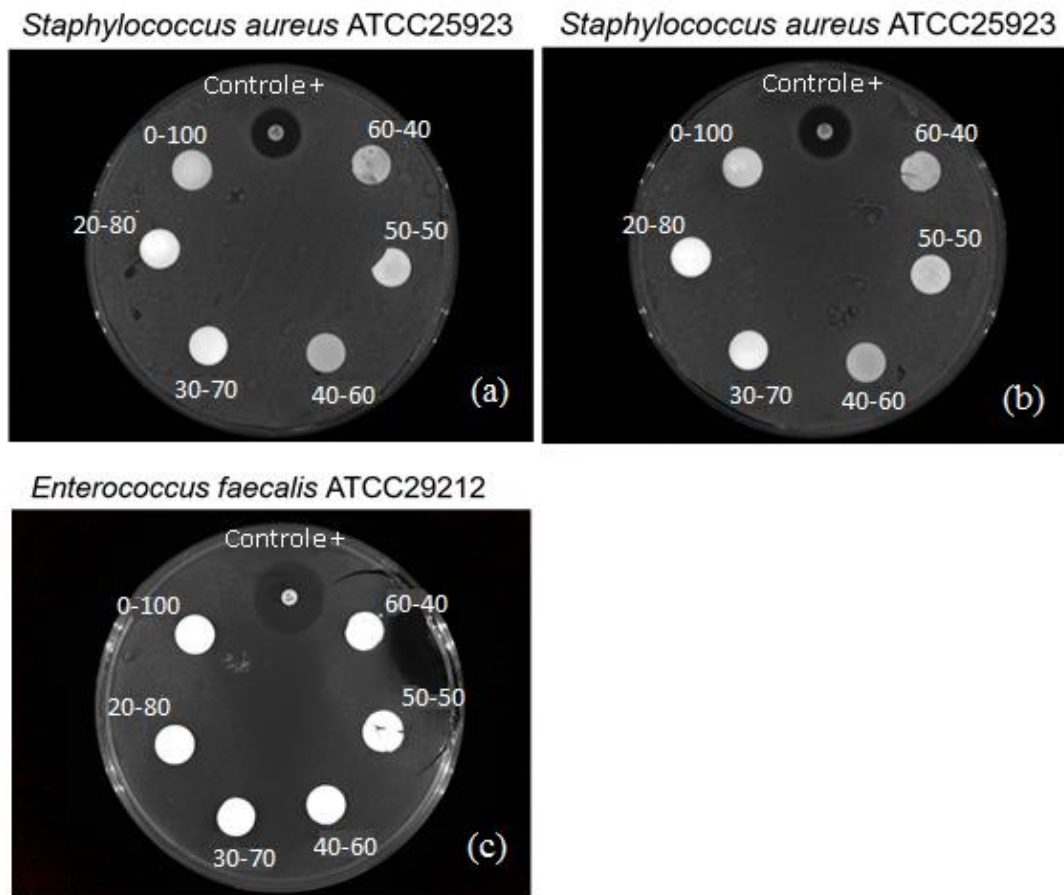


Figura 10 - Culturas de bactérias com as amostras de PBSA e óleo de copaíba em diferentes concentrações. (a) e (b) com bactéria *Staphylococcus aureus* e controle Cefotaxima 30 µg. (c) com bactéria *Enterococcus faecalis* e controle Imipenem 10 µg.

Como pode ser evidenciado na Figura 9, não foi observado halo de inibição para as concentrações testadas utilizando-se as linhagens de bactérias gram-positivas *Staphylococcus aureus* ATCC25923 (Figura 9 (a) e (b), das 2 placas representando as 2 réplicas experimentais) e *Enterococcus faecalis* ATCC29212, Figura 9 (c), indicando que o óleo não apresentou efeito bactericida para essas bactérias. Esse resultado contraria o observado no trabalho de Morelli e co-autores [1] que, apesar de terem usado a bactéria *Bacillus subtilis*, observaram um halo de inibição considerável, como mostra a Figura 10.

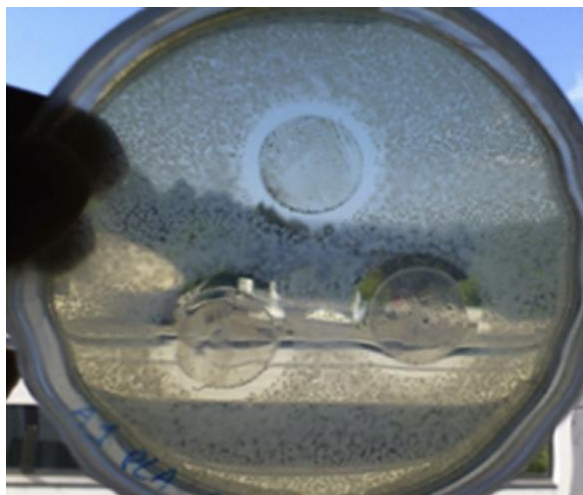


Figura 11 - Halo de inibição da amostra de poli (ácido lático) com óleo de Copaíba observado no trabalho de Morelli e co-autores [1].

Assim como foi observada na figura 10, a literatura prevê a formação de halo de inibição para as três bactérias em questão. O trabalho de Santos e co-autores [15] demonstra que concentrações menores do que as utilizadas nesse trabalho, cerca de 1.000 $\mu\text{g/ml}$, são suficientes para demonstrar atividade bactericida tanto na bactéria *Staphylococcus aureus* quanto na bactéria *Enterococcus faecalis*. Sendo assim, pode-se concluir que o óleo de Copaíba utilizado neste trabalho, fornecido pela empresa Amazon Leve, não possui o efeito bactericida como o observado por Morelli e co-autores [1]. Portanto, a principal causa dos resultados de aumento da degradação dos filmes de PBSA em solo compostado na presença do óleo, é devido ao fato do óleo não apresentar propriedades bactericidas e as amostras terem porosidades.

6. CONCLUSÕES

O processo *casting* de preparação dos filmes de PBSA com óleo se mostrou pouco controlável, pois os filmes obtidos não apresentaram boa uniformidade em termos de distribuição dos componentes e qualidade da superfície, além da baixa reprodutibilidade na obtenção dos mesmos em função das condições ambientais.

Resultados de espectroscopia UV mostraram que a quantidade real de óleo presente nos filmes é consideravelmente menor do que a quantidade nominal. Os testes de

susceptibilidade antimicrobiana por disco difusão evidenciaram que o óleo adquirido da empresa Amazon Leve não possui ação bactericida para as linhagens de bactérias gram-positivas *Staphylococcus aureus* e *Enterococcus faecalis*.

Consequentemente, a adição de diferentes quantidades de óleo de Copaíba em filmes de PBSA não se mostrou uma maneira eficiente de reduzir o ataque bacteriano e a degradação dos filmes em solo compostado.

7. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Com os resultados obtidos na realização deste trabalho, assim como o conhecimento adquirido durante o estudo, pode-se sugerir os seguintes trabalhos para serem desenvolvidos:

Procurar outro meio de fabricação que produza filmes mais uniformes e que não degrade o óleo de Copaíba. Assim, será possível obter resultados mais precisos de cada análise.

Realizar ensaio de cromatografia gasosa para determinar os constituintes do óleo e investigar o porque ele não agiu como um bactericida. O ensaio de espectroscopia UV já se mostrou um indício de não conformidade do óleo.

8. REFERÊNCIAS

[1] MORELLI, C. L. et al. **Natural copaiba oil as antibacterial agent for bio-based active packaging**. *Industrial Crops and Products* 70 (2015) 134-141.

[2] CAMPOS, C. A. et al. **Development of Edible Films and Coatings with Antimicrobial Activity**. *Food and Bioprocess Technology*. August 2011, Volume 4, Issue 6, pp 849–875.

[3] Empresa paulista dobra prazo de validade de leite fresco pasteurizado. Disponível em: <http://agencia.fapesp.br/empresa_paulista_dobra_prazo_de_validade_de_leite_fresco_pasteurizado/21325/>. Acesso em 03 nov. 2016.

- [4] WU, Y. **Biodegradation of poly(butylene succinate) film by compost microorganisms and water soluble product impact on mung beans germination.** *Polymer Degradation and Stability* 126 (2016) 22-30.
- [5] ZHAO, J. et al. **Biodegradation of poly(butylene succinate-co-butylene adipate) by *Aspergillus versicolor*.** *Polymer Degradation and Stability* 90 (2005) 173-179.
- [6] LEITE, H. D. **Métodos indicativos de estabilidade para determinação do besilato de anlodipino, nifedipino e nimodipino considerados inibidores do canal de cálcio.** 2014 104p. Tese (Doutorado em Farmácia) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.
- [7] TSERKI, V. et al. **Biodegradable aliphatic polyesters. Part I. Properties and biodegradation of poly(butylene succinate-co-butylene adipate).** *Polymer Degradation and Stability* 91 (2006) 367-376
- [8] DIAS, D. O. et al. **Optimization of Copaiba oil-based nanoemulsions obtained by different preparation methods.** *Industrial Crops and Products* 59 (2014) 154–162.
- [9] CHIU, F. **Fabrication and characterization of biodegradable poly(butylene succinate-co-adipate) nanocomposites with halloysite nanotube and organo-montmorillonite as nanofillers.** *Polymer Testing* 54 (2016) 1-11
- [10] GIRDTHEP, S. et. al. **Effect of silver-loaded kaolinite on real ageing, hydrolytic degradation, and biodegradation of composite blown films based on poly(lactic acid) and poly(butylene adipate-co-terephthalate).** *European Polymer Journal* 82 (2016) 244–259
- [11] EMADIAN, S. M. et. al. **Biodegradation of bioplastics in natural environments.** *Waste Management* 59 (2017) 526–536.
- [12] SEJAS, L. M. **Avaliação da qualidade dos discos com antimicrobianos para testes de disco-difusão disponíveis comercialmente no Brasil.** *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*. Rio de Janeiro, v. 39, n. 1, p.65, 2003.

- [13] LICHOCIK, M. et. al. **Impact of PBSA (Bionolle) Biodegradation Products on the Soil Microbiological Structure.** FIBRES & TEXTILES in Eastern Europe 2012, Vol. 20, No. 6B (96) 179-185.
- [14] GOODWIN, S. R. W. **Hydrolase activity of an extracellular depolymerase from *Aspergillus fumigatus* with bacterial and synthetic polyesters.** Polymer Degradation and Stability 1999; 64: 267-275.
- [15] SANTOS, A. O. et. al. **Antimicrobial activity of Brazilian copaiba oils obtained from different species of the *Copaifera* genus.** Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Vol. 103(3): 277-281, May 2008