UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO JOÃO DEL-REI

CAMPUS ALTO PARAOPEBA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

PRODUÇÃO DE BIOFILME ALGINATO ADITIVADO COM VANILINA PARA APLICAÇÃO COMO BIOCURATIVO

LETÍCIA SILVEIRA

OURO BRANCO - MG

2022

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO JOÃO DEL-REI
CAMPUS ALTO PARAOPEBA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

LETÍCIA SILVEIRA

PRODUÇÃO DE BIOFILME ALGINATO ADITIVADO COM VANILINA PARA APLICAÇÃO COMO BIOCURATIVO

Dissertação apresentada à Universidade Federal de São João Del-Rei como parte das exigências do programa de Pós – Graduação em Engenharia Química para a obtenção do título de Mestre em Engenharia Química.

Orientadores:
Prof. Dra. Renata Carolina Zanetti Lofrano
Prof. Dr. Boutros Sarrouh

OURO BRANCO – MG
2022

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO JOÃO DEL-REI
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

NOMEAÇÃO DE BANCA EXAMINADORA Nº 5 / 2022 - PPGEQ (13.13)

Nº do Protocolo: 23122.001007/2022-81

Ouro Branco-MG, 14 de janeiro de 2022.

MEMBROS DA BANCA EXAMINADORA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE LETÍCIA SILVEIRA, APRESENTADA AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO JOÃO DEL-REI, EM 13 DE JANEIRO DE 2022.

BANCA EXAMINADORA:

(Assinado digitalmente em 15/01/2022 09:50)
CRISTIANE MEDINA FINZI QUINTAO
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR
GABIN (11.00)
Matrícula: 1861356

(Assinado digitalmente em 17/01/2022 13:54)
RENATA CAROLINA ZANETTI LOFRANO
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR
DEQUI (12.29)
Matrícula: 1491686

(Assinado digitalmente em 14/01/2022 16:06)
MATEUS DE SOUZA AMARAL
ASSINANTE EXTERNO
CPF: 344.258.948-71

Para verificar a autenticidade deste documento entre em **https://sipac.ufsj.edu.br/public/documentos/index.jsp** informando seu número: **5**, ano: **2022**, tipo: **NOMEAÇÃO DE BANCA EXAMINADORA**, data de emissão: **14/01/2022** e o código de verificação: **7ab4c9910c**

Ficha catalográfica elaborada pela Divisão de Biblioteca (DIBIB)
e Núcleo de Tecnologia da Informação (NTINF) da UFSJ,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

S587 Silveira, Letícia.
Produção de biofilme alginato aditivado com vanilina para aplicação como biocurativo. / Letícia Silveira ; orientadora Renata Carolina Zanetti Lofrano ; coorientador Boutros Sarrouh. -- Ouro Branco, 2022.
74 p.

Dissertação (Mestrado - Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química) -- Universidade Federal de São João del-Rei, 2022.

1. Biopolímeros. 2. Biomateriais. 3. Alginato. 4. Vanilina. 5. Biocurativo. I. Carolina Zanetti Lofrano , Renata , orient. II. Sarrouh, Boutros , co orient. III. Título.

AGRADECIMENTOS

Ao longo dessa caminhada, aprendi o valor da gratidão e precisei mais do que o meu esforço para que a dissertação fosse concretizada.

Agradeço primeiramente a Deus, pelos dons, por me amparar e guiar em todos os momentos. Aos meus pais, Fernando e Neida, que nunca mediram esforços e contribuírem para eu me tornar a pessoa que sou hoje e sempre me apoiaram em todas as etapas da minha vida.

À minha irmã, Fernanda, pelas palavras de incentivo.

À minha filha, Maria Eduarda, pela inspiração e força diária.

À minha orientadora, Prof. Dra. Renata Carolina Zanetti Lofrano, por confiar na minha capacidade.

Aos professores: Prof. Dr. Fabiano Luiz Naves e Prof. Dr. Igor José Boggione Santos pela disponibilidade de ensinar.

A todos os mestres do Programa de Pós-graduação em Engenharia Química da UFSJ. E ao campus pela oportunidade de concluir este curso e pela estrutura cedida aos meus experimentos.

À FAPEMIG e a CAPES pelo apoio financeiro.

RESUMO

A utilização de polímeros de fontes renováveis é amplamente estudada e esses são, em geral, biodegradáveis, biocompatíveis e podem ser obtidos a custo relativamente baixo. O presente trabalho tem como objetivo apresentar os resultados da produção de um biofilme de alginato aditivado com vanilina utilizando o glicerol como plastificante e o cloreto de cálcio como agente reticulante. Os biofilmes a base de produtos naturais são de bastante interesse na indústria farmacêutica por apresentarem baixa rejeição pelo organismo. O alginato, um polissacarídeo encontrado nas paredes celulares de algas marrons, possui boas propriedades para o uso como biomaterial, devido a sua biodegradabilidade e biocompatibilidade. Os curativos de alginato já são uma realidade terapêutica, porém, eles atuam apenas mantendo o ambiente adequado para a cicatrização. Com o intuito de melhorar suas propriedades, foi proposta a incorporação da vanilina devido ao potencial antioxidante e antimicrobiano. Diferentes biofilmes foram produzidos com o auxílio do planejamento de experimentos e mediante a análise da superfície de resposta, o quer permitiu determinar a melhor região para um médio valor de solubilidade e alto grau de intumescimento. Esta região se refere a valores acima de 0,07g de $CaCl_2$ e concentrações superiores a 0,024g de vanilina, desencadeando uma solubilidade entre 25 e 30% e o grau de intumescimento superior a 100% e com valores fixos de alginato (0,85g). Quanto à otimização do processo, o método NBI pôde analisar regiões côncavas, prevendo os pontos ótimos e gerando o gráfico de Pareto com limites equidistantes O teste antimicrobiano permitiu observar a atividade antimicrobiana contra os micro-organismos *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa* dos biofilmes validados na otimização, bem como uma solução de vanilina com cloreto de cálcio e glicerol, comparando os resultados com o filme controle e obtendo um halo de inibição apenas na presença de vanilina. As análises térmicas de termogravimetria e calorimetria exploratória diferencial demonstraram que o material possui estabilidade térmica, na faixa de temperatura ideal para a aplicação como um biomaterial, por exemplo, o biocurativo.

Palavras-chave: Biopolímeros; Biomateriais; Alginato; Vanilina; Biocurativo.

ABSTRACT

The use of polymers from renewable sources is widely studied and these are, in general, biodegradable, biocompatible and can be obtained at relatively low cost. The present work aims to present the results of the production of an alginate biofilm additived with vanillin using glycerol as plasticizer and calcium chloride as cross-linking agent. Dressings based on natural products are of great interest in the pharmaceutical industry because they present low rejection by the body. Alginate, a polysaccharide found in the cell walls of brown seaweed, has good properties for use as a biomaterial, due to its biodegradability and biocompatibility. Alginate dressings are already a therapeutic reality, but they act only by maintaining the appropriate environment for healing. With the intention of improving its properties, the incorporation of vanillin was proposed due to its antioxidant and antimicrobial potential. Different biofilms were produced with the help of experiment planning and by means of response surface analysis, which allowed determining the best region for a medium value of solubility and high degree of intumescence. This region refers to values above 0.07g of CaCl2 and concentrations above 0.024g of vanillin, triggering a solubility between 25 and 30% and the degree of intumescence higher than 100% and with fixed values of alginate (0.85g). As for the optimization of the process, the NBI method was able to analyze concave regions, predicting the optimal points and generating the Pareto chart with equidistant limits The antimicrobial test allowed the observation of the antimicrobial activity against Escherichia coli and Pseudomonas aeruginosa microorganisms of the biofilms validated in the optimization, as well as a solution of vanillin with calcium chloride and glycerol, comparing the results with the control film and obtaining a halo of inhibition only in the presence of vanillin. Thermal analyses of thermogravimetry and differential exploratory calorimetry have shown that the material has thermal stability, in the temperature range ideal for application as a biomaterial, for example, bio-curative.

Key-words: Biopolymers; Biomaterials; Alginate; Vanillin; Bio-curative.

SUMÁRIO

1.INTRODUÇÃO 11

2.OBJETIVOS 13

2.1.GERAL 13

2.2. ESPECÍFICOS 13

3.REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 14

3.1. POLÍMEROS 14

3.1.1 BIOPOLÍMEROS 14

3.2.BIOMATERIAIS 15

3.3.POLISSACARÍDEOS 16

3.3.1ALGINATO 17

*3.3.1.1*A APLICAÇÃO DO ALGINATO SOB A FORMA DE BIOCURATIVOS 19

3.4. ADITIVOS 20

3.4.1.AGENTE RETICULANTE 21

3.4.2.PLATIFICANTE 23

3.4.3.VANILINA 24

3.4.4.PLANEJAMENTO DE EXPERIMENTOS 28

3.4.5.OTIMIZAÇÃO 30

4. MATERIAIS E MÉTODOS 32

4.1. MATERIAIS UTILIZADOS 32

4.1.1. ANÁLISE EXPERIMENTAL 32

4.2. ESTUDO DOS FILMES 35

4.2.1. ANÁLISE FÍSICA DOS FILMES 35

4.2.2. SOLUBILIDADE 36

4.2.3. GRAU DE INTUMESCIMENTO PERCENTUAL (GI) 36

4.3. TÉCNICAS DE CARACTERIZAÇÃO 37

4.3.1. ATIVIDADE ANTIMICROBIANA 37

4.3.2. Análises térmicas 38

5.RESULTADOS 39

5.1 ANÁLISE FÍSICA DOS FILMES 39

5.2 ANÁLISE DA SOLUBILIDADE E DO GRAU DE INTUMESCIMENTO 40

5.2.1. Avaliação do planejamento experimental 41

5.2.2. Análise dos efeitos principais 44

5.2.3. Análise dos efeitos das interações entre os fatores 46

5.3 OTIMIZAÇÃO 48

5.4 TÉCNICAS DE CARACTERIZAÇÃO 50

5.4.1. Atividade antimicrobiana 50

5.4.2. Análises térmicas 52

6.CONCLUSÃO 56

7.SUGESTÃO PARA TRABALHOS FUTUROS 56

REFERÊNCIAS 57

Lista de Figuras

Figura 1. Representação da formação do polímero (Adaptado de SULZBACH;BRAIBANTE; STORGATTO, 2015).....14
Figura 2. Ligações químicas do alginato baseada nas interações dos blocos M, G e MG (BRANDÃO FILHO, 2019).....18
Figura 3. Etapas da preparação do filme pelo método de *Casting* (Adaptado de LAROTONDA, 2002).....19
Figura 4. Representação da reticulação do polímero na presença do íon de cálcio (XU; BARTLEY; JOHNSON,2003).....22
Figura 5. Estrutura química do glicerol (CAZÓN *et al*., 2017).....24
Figura 6. Fava da orquídea para extração da vanilina (LIMA, 2016).....25
Figura 7. Estrutura química dos vanilóides.....27
Figura 8. Modelo geral de um sistema de um processo (MONTGOMERY, 2017).....28
Figura 9. Etapas do procedimento experimental (GALDÁMEZ, 2002).....29
Figura 10. Fronteira de Pareto para problemas bi-objetivos obtidos com o NBI (Adaptado de LOPES, 2015).....31
Figura 11. Fluxograma da metodologia empregada no primeiro estágio.....34
Figura 12. Fluxograma da metodologia empregada no segundo estágio 35
Figura 13. Princípio de teste de suscetibilidade pelo método do disco-difusão (MACHADO; GALES, 2008).....37
Figura 14. Filmes desenvolvidos de acordo com a matriz do planejamento experimental.....39
Figura 15. a) Gráfico de Pareto para a análise da solubilidade e b) Gráfico de Pareto para análise do grau de intumescimento.....43
Figura 16. Gráfico dos efeitos principais do planejamento de experimentos para solubilidade. 44
Figura 17. Gráfico dos efeitos principais do planejamento de experimentos para o grau de intumescimento.....45
Figura 18. a) Efeito das interações na solubilidade e b) efeito das interações no grau de intumescimento.....46
Figura 19. Superfície de resposta para a análise da solubilidade 47
Figura 20. Superfície de resposta para a análise de intumescimento 47
Figura 21. Fronteira de Pareto obtida pela otimização NBI. 49

Figura 22. a) Atividade antimicrobiana do biofilme **(1)** contra *E. coli*. b) Atividade antimicrobiana do biofilme **(2)** contra *E. coli.* c) Atividade antimicrobiana do biofilme **(3)** contra *E. coli*. d) Crescimento do micro-organismo *E. coli*. e) Atividade antimicrobiana da solução (VCG) contra *E. coli*. f) Atividade antimicrobiana do biofilme controle (sem vanilina) contra *E. coli* 50

Figura 23. a) Atividade antimicrobiana do biofilme **(1)** contra *P. aeruginosa*. b) Atividade antimicrobiana do biofilme **(2)** contra *P. aeruginosa.* c) Atividade antimicrobiana do biofilme **(3)** contra *P. aeruginosa* d) Crescimento do micro-organismo *P. aeruginosa* e) Atividade antimicrobiana da solução (VCG) contra *P. aeruginosa*. f) Atividade antimicrobiana do biofilme controle (sem vanilina) contra *P. aeruginosa*..... 51

Figura 24. Análise termogravimétrica (TGA) e calorimetria exploratória diferencial (DSC): filme controle..... 53

Figura 25. Análise termogravimétrica (TGA) e calorimetria exploratória diferencial (DSC): filme com vanilina (2). 54

Lista de Tabelas

Tabela 1. Estudos utilizando filmes de alginato para aplicação como curativo.....20
Tabela 2. Propriedades físico-químicas da vanilina (MEDEIROS, 2018).....26
Tabela 3. Os reagentes utilizados na confecção dos filmes.....32
Tabela 4. Concentrações utilizadas na confecção dos filmes de acordo com o planejamento de experimentos.....33
Tabela 5. Resultados encontrados para a solubilidade e o grau de intumescimento de acordo com o planejamento de experimentos 40
Tabela 6. Análise da variância para a solubilidade.....41
Tabela 7. Análise da variância para o grau de intumescimento.....42
Tabela 8. Resultado da otimização para a solubilidade e para o grau de intumescimento pelo método NBI (**(1)**, **(2)** e **(3)**: pontos avaliados da otimizados).....48
Tabela 9. Resultados encontrados para a zona de inibição (mm) dos biofilmes (**(1)**, **(2)** e **(3)**) e da solução VCG contra as bactérias *E. coli e P.aeruginosa*.....51

Lista de Abreviaturas e Símbolos

ANOVA- Análise de variância;

% GI – Grau de intumescimento percentual;

DOE – Planejamento de Experimentos (*Design of Experiments*);

DSC – Calorimetria exploratória diferencial;

° C – Grau Célsius;

g – Gramas;

hs – Horas;

NBI- *Normal Boundary Intersection;*

ml- Mililitro;

mm- Milímetro;

Min – Minuto;

Mol/g – Molaridade;

% - Porcentagem;

rpm- Rotação por minuto;

Seg – segundos;

S - Solubilidade;

Tg – Temperatura de transição vítrea;

TGA – Análise termogravimétrica;

t – Tempo;

UFSJ – Universidade Federal de São João del Rei.

1. INTRODUÇÃO

Os polímeros possuem papel fundamental na evolução industrial e no bem estar da humanidade. Estes materiais podem ser encontrados em produtos simples, como também naqueles complexos, com as mais diversas aplicações (DE OLIVEIRA, 2014; FELDMAN, 2008).

A sua utilização contribui para o desenvolvimento econômico e a melhoria da qualidade de vida da sociedade, entretanto, com aumento da poluição ambiental. A maioria dos materiais poliméricos é produzida por síntese química de derivados do petróleo, o que dificulta sua decomposição na natureza (THIRÉ, 2013). A preocupação em minimizar possíveis problemas ambientais, causados pelo descarte incorreto desses produtos, leva ao estudo e produção de polímeros biodegradáveis (ALARCON *et al*., 2017).

Os polímeros advindos de fontes naturais são chamados de biopolímeros, podem ser produzidos a partir de proteínas, polissacarídeos, lipídios e apresentar biocompatibilidade e baixo custo de produção devido à abundância de matéria prima (BAGNATO *et al*., 2017; PIRES; MORAES, 2015).

Segundo Almeida (2010), os filmes produzidos por biopolímeros, ou seja, biofilmes podem ser empregados na indústria de alimentos sob a forma de embalagens ativas e também na área da saúde e farmacêutica. A vantagem da utilização esta associada à sua capacidade de manipulação, pois, permitem modificações na superfície que podem conferir novas características.

O alginato é um polissacarídeo, extraído de algas marinhas, utilizado como polímero natural e que apresenta características como a ação gelificante e espessante, biodegradabilidade, biocompatibilidade, potencial antimicrobiano, formação de géis e filmes. Podendo ter aplicações em alimentos, cosméticos, na área médica e farmacêutica, por exemplo, em sistemas de liberação de fármacos, curativos e substitutos de pele temporários (CARVALHO, 2019; GEORGE; ABRAHAM, 2006; AGUERO *et al*., 2017).

A fragilidade dos filmes biodegradáveis de alginato leva à necessidade do uso de um agente plastificante que atue como redutor das forças intermoleculares e aumentando a mobilidade das cadeias poliméricas, a flexibilidade, resistência e estabilidade do produto final (LINS, 2018; BAGNATO *et al*., 2017; PIRES; MORAES, 2015). O glicerol é um material com função plastificante de baixo custo, utilizado na produção de biofilmes poliméricos.

Como os sistemas formados por alginato e glicerol são hidrofílicos, ou seja, exibem baixa resistência à água, o que pode limitar sua aplicabilidade, a alternativa se apresenta na preparação dos filmes a partir de polissacarídeos submetidos a processos de reticulação, o que pode reduzir a sensibilidade à água (JUNIOR, 2017; XU *et al*., 2003; ROGER *et al*., 2006).

A vanilina, extraída da vagem da baunilha, na prática, pode ser utilizada em aplicações, como por exemplo, na liberação controlada de substâncias ativas, (WALTON *et al*., 2003; NOGUEIRA, 2018). Sendo sua adição ao filme alginato/ glicerol uma busca de usufruir das suas propriedades antioxidante e antimicrobiana.

Assim sendo, esse trabalho teve como intuito a produção de um biofilme à base de alginato e vanilina utilizando o glicerol como plastificante e o cloreto de cálcio como agente reticulante e uma possível aplicação como biocurativo. Os biofilmes foram preparados por *Casting*, isto é, alíquotas da solução filme-formadora foram vertidas em placas de Petri e submetidas à secagem. O planejamento de experimentos foi utilizado visando o estudo das variáveis, alginato, vanilina e cloreto de cálcio, em detrimento as respostas almejadas: baixa solubilidade e alto grau de intumescimento, a fim de encontrar a melhor região para a produção dos biofilmes, passando por um processo de otimização. Posteriormente eles foram caracterizados quanto à atividade antimicrobiana e propriedade térmica.

2. OBJETIVOS

2.1. Geral

Esse trabalho teve por objetivo principal produzir um biofilme a partir de alginato e vanilina.

2.2. Específicos

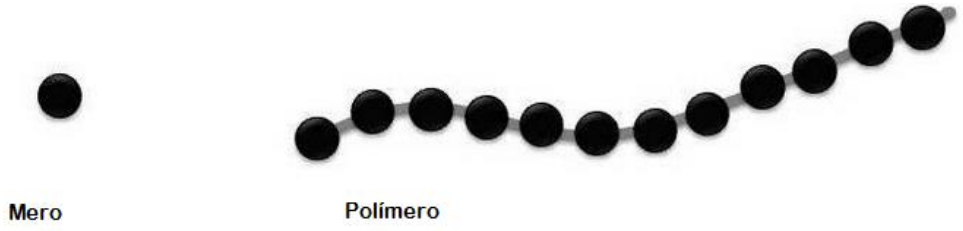
- Realizar um planejamento experimental aplicado à preparação do biofilme;
- Analisar o biofilme quanto à solubilidade e o grau de intumescimento;
- Encontrar uma região ótima para a produção por meio da superfície de resposta;
- Caracterizar quanto à atividade antimicrobiana e propriedade térmica.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Polímeros

A natureza química dos polímeros começou a ser conhecida no início dos anos vinte (1920), por meio de pesquisas sobre a celulose, borracha natural e o amido. Os polímeros são compostos por grandes cadeias de átomos de carbono unidas por ligações do tipo covalente e pela repetição de unidades menores denominadas meros (ADEKUNLE, 2015; ZAHEDI; REZAEIAN; RANAEISIADAT; JAFARI *et al*., 2010). A Figura 1 apresenta a formação do polímero através da unidade mero.

Figura 1: Representação da formação do polímero (Adaptado de SULZBACH; BRAIBANTE; STORGATTO, 2015)



A massa molecular dos polímeros está diretamente relacionada ao grau de polimerização e a disposição espacial dos meros na cadeia, fatores os quais podem influenciar em propriedades como a viscosidade da solução, temperatura de fusão, força elástica e resistência ao calor (PIRES; MORAES, 2015; SANTOS, 2005). As moléculas com baixo grau de polimerização, chamadas oligômeros, produzem soluções com menor viscosidade devido ao efeito do tamanho da cadeia.

Os materiais poliméricos se diferem de outras classes, como os metais e cerâmicos, por apresentarem características similares como resistência à tração, módulo de elasticidade, o alongamento na ruptura, a resistência ao impacto, mas são atraentes pelo menor custo e a capacidade de serem obtidos e processados por diversas técnicas (BIERHALZ; DA SILVA; KIECKBUSCH, 2012; DE SOUZA, 2016; PIRES; MORAES, 2015).

O tamanho das moléculas poliméricas e seu grau de organização dificultam o processo de degradação, o que desencadeou a preocupação com o descarte, levando à necessidade de pesquisas na obtenção de materiais alternativos que mantenham as suas principais

propriedades, mas que apresentem um tempo de degradação reduzido (ALARCO *et al*., 2017; BIERHALZ; DA SILVA; KIECKBUSCH, 2012; ZAHEDI *et al*., 2010).

3.1.1 Biopolímeros

Os biopolímeros são materiais que podem ser obtidos de fontes renováveis como a biomassa, os óleos vegetais, a cana de açúcar e o amido como também de fontes não renováveis (QUINTÃO, 2017). Os biopolímeros são compostos por cadeias heterogêneas com a presença de átomos de oxigênio e nitrogênio na cadeia principal, além dos átomos de hidrogênio, favorecendo a ação de fungos, bactérias e micro-organismos, o que torna o polímero possível o processo de biodegradação (KALE *et al*., 2007; SWAPNIL *et al*., 2015).

A atividade biológica reduz o tamanho das moléculas menores do material tornando a decomposição possível e, consequentemente, reduzindo o impacto ambiental. (CALVÃO, 2009; MOGOSANU; GRUMEZESCU, 2014; VASCONCELOS, 2014).

A utilização de polissacarídeos na produção de biofilmes é interessante ao mercado devido à sua capacidade gelificante, espessante e biodegradabilidade. Este material é utilizado na produção de embalagens bioativas e, no âmbito da medicina, na produção de dispositivos biomédicos, os biomateriais, em virtude da baixa toxicidade, da biocompatibilidade e multifuncionalidade (AGÜERO *et al*., 2017; BOATENG; CATANZANO, 2015; CONDE, 2011; LEE; MOONEY, 2012; SACCHETIN *et al*., 2010).

3.2. Biomateriais

O Biomaterial pode ser definido como um material capaz de interagir com o sistema biológico de seres vivos, permitindo promover o reparo de órgãos ou tecidos, aumentando ou substituindo sua função natural (GALLER *et al*., 2011; GUASTALDI; APARECIDA, 2010).

Como nenhum deles é, individualmente, adequado para todas as situações, novas aplicações são continuamente desenvolvidas com os avanços da medicina (CONDE, 2011; GEORGE; ABRAHAM, 2006)

Registros sobre a utilização no corpo humano existem há 9000 anos e estão associados aqueles tolerados pelo organismo (RATNER *et al*., 2004). Em múmias egípcias foram encontrados órgãos artificiais como: orelhas, olhos, dentes e narizes. Do mesmo modo, chineses e indianos faziam a utilização de colas, ceras e reconstrução de tecidos danificados (PATEL; GOHIL, 2012). O conceito de biomateriais foi introduzido no século XX, apesar de existirem relatos anteriores da aplicação desses, em sua grande maioria por tentativa e erro,

não existiam pesquisas sobre a interação dos mesmos com o organismo e informações sobre toxicidade (RATNER *et al*., 2004).

O sucesso da utilização de um biomaterial dependerá da qualidade da matéria-prima e do processo de fabricação, sendo de vital importância o desenvolvimento de produtos com alto desempenho, que interajam com o corpo hospedeiro cumprindo as especificações de biocompatibilidade e biofuncionalidade, ao mesmo tempo em que, deverá possuir propriedades mecânicas e físicas adequadas com a aplicação final (PIRES; BIERHALZ; MORAES, 2015).

Os biomateriais podem ser classificados, de acordo com a origem, em naturais ou sintéticos e, quanto a sua composição em polímeros, metais ou ligas e cerâmicos (PETERSON; BRONZINO, 2014). Os materiais poliméricos possuem um campo amplo de aplicação como biomaterial devido à sua capacidade de moldagem em diferentes formas como fibras, tecidos e filmes (FIDÉLES, 2010).

Segundo Zactiti e Kieckbusch (2006), os filmes poliméricos podem ser utilizados como veículos de substâncias que apresente ação antimicrobiana e antioxidante. Motta (2012) avaliou o potencial antioxidante de filmes de carboximetilcelulose com a incorporação de um antioxidante natural, o α- Tecofenol, os quais apresentaram um bom perfil de liberação e atividade antioxidante. Knapp (2017) desenvolveu e caracterizou filmes biodegradáveis, utilizando extrato de erva mate como componente ativo na formulação de filmes de amido, obtendo também bons resultados no potencial antioxidante. Norajit e colaboradores (2010) realizaram estudos comparativos sobre a caracterização e propriedades antioxidantes de filmes de alginato biodegradáveis contendo extrato de ginseng e a incorporação melhorou o potencial antioxidante do filme em comparação ao filme controle.

Dessa forma, os estudos acima citados, corroboram sobre uma cacterística importante dos filmes poliméricos, dentre eles os polissacarídeos, sendo a possibilidade de incorporação de substâncias ativas, como também a sua liberação, com ênfase nas antioxidantes e antimicrobiana, estudada nesse trabalho, e assim uma possível aplicação como biocurativo.

3.3. Polissacarídeos

Os polissacarídeos são polímeros que podem ser encontrados inúmeros seres vivos, como: animais, plantas, algas e micro-organismos (HARVEY; FERRIER, 2012; NELSON; COX, 2018). Estes polímeros podem ser utilizados como espessantes, gelificantes, emulsificantes, hidratantes e de suspensão, em diferentes aplicações nas indústrias de

alimento, cosmética, biomédica e farmacêutica (LU *et al*., 2019; NESIC; SESLIJA, 2017). As principais características dos polissacarídeos se referem à biocompatibilidade e biodegradabilidade, além do baixo custo de produção, aliada à alta disponibilidade de matéria prima (CONDE, 2011).

Alguns polissacarídeos têm atraído a atenção de pesquisadores das áreas de bioquímica e farmacologia devido às propriedades diferenciadas que permitem seu uso como excipientes na liberação controlada de substâncias e o aumento da estabilidade da preparação de produtos farmacêuticos. Os sistemas de liberação controlada a partir de polissacarídeos são percebidos através de hidrogéis, revestimentos para fármacos, curativos e substitutos de pele (AGÜERO *et al*., 2017; CAMARGO, 2017; GEORGE; ABRAHAM, 2006; PIRES, 2016; SILVA, 2017).

Em sua forma original ou modificada quimicamente, possuem boas propriedades mecânicas para aplicações como filmes e a incorporação de outros compostos bioativos pode ser feita por simples mistura física (KNAPP, 2017; MOTTA, 2012; NORAJIT *et al*., 2010).

Podendo citar como os exemplos mais comuns de polissacarídeos: o amido, celulose, pectina e o alginato (MOGOSANU; GRUMEZESCU, 2014; SOARES *et al*.,2004).

3.3.1. Alginato

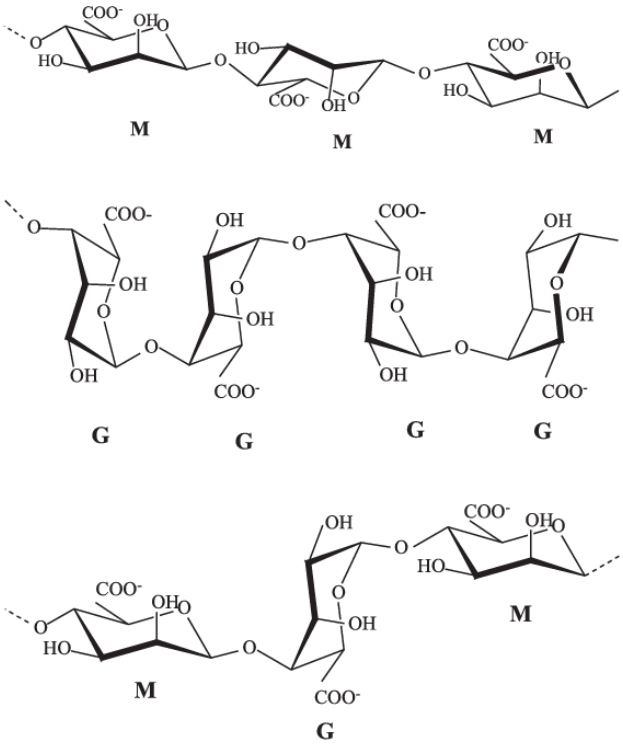
O alginato é um polímero extraído da parede celular de três espécies de algas marrons, comuns em regiões costeiras do Brasil, sendo elas: Laminaria *byperborean*, a Ascophyllum *nodosum* e Macrocytis *pyrifera* (GOH; HENG; CHAN, 2012). Nas algas, esse polissacarídeo, representa um componente estrutural que corresponde a cerca de 40% da matéria seca dos organismos citados (RINAUDO, 2008).

A síntese do alginato pode ser realizada por bactérias como *Azotobacter* e *Pseudomonas* (PAWAR; EDGAR, 2012). Entretanto, a produção não é considerada economicamente viável para aplicações comerciais, sendo, portanto, restrita a práticas em escala laboratorial (BRACCINI; PÉREZ, 2001). Esses estudos indicam como uma alternativa que permite a exploração controlada de fontes naturais e a obtenção de materiais com características uniformes (LEE; MOONEY, 2012; LEONARD *et al.*, 2004).

O alginato é constituído pelos ácidos D-manurônico (bloco M) e L-gulurônico (bloco G), os quais se encontram dispostos de maneira irregular em porções variáveis de ligações GG, MG e MM (Figura 2). A quantidade e a distribuição de cada monômero dependem da

espécie, localização e a idade das algas (DE SOUZA, 2019; DRAGET; SKJÅK-BRÆK; SMIDSRØD, 1997; FREITAS, 2020; SILVA, 2009). As características da cadeia carbônica do alginato variam em função das sequências de blocos M e G, por exemplo, filmes formados por alginato que possuem alto teor de ácido L-gulurônico (G), apresentam melhores propriedades mecânicas (DE SOUZA, 2019).

Figura 2: Ligações químicas do alginato baseada nas interações dos blocos M, G e MG (BRANDÃO FILHO, 2019).



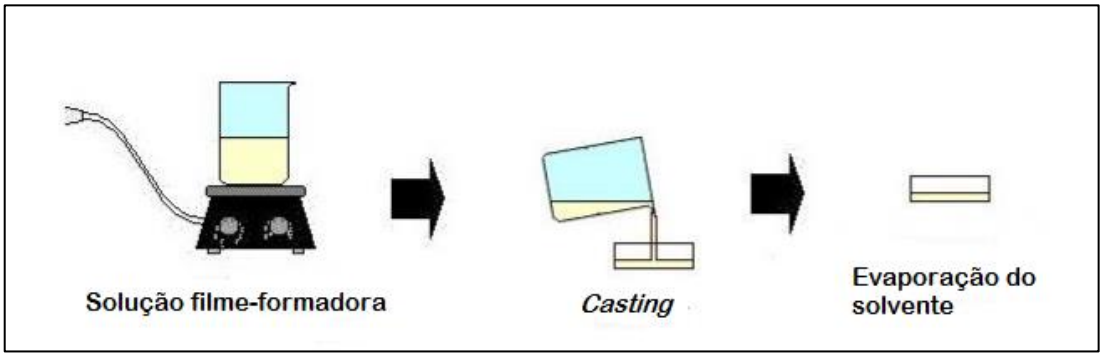
Comercialmente, o alginato é encontrado na forma de sal, como o alginato de sódio, potássio e amônio e as principais propriedades que são exploradas pela indústria são sua capacidade de aumentar a viscosidade das soluções aquosas e de formar géis e filmes (BRACCINI; PÉREZ, 2001; YANG; XIE; HE, 2011). Na indústria têxtil, ele é utilizado como espessante e na alimentícia em preparação de molhos, xaropes e coberturas de sorvetes (DE SOUZA, 2019; FREITAS, 2020). Este polímero pode ser utilizado como revestimento para conservação de alimentos evitando a oxidação e contaminação bacteriana (GOH; HENG; CHAN, 2012; PIRES; MORAES, 2015).

Na área da saúde, a propriedade de formação de filmes é explorada na obtenção de membranas para uso como curativos de lesões cutâneas (HOFFMAN, 2001; PIRES, 2016; SALEM; SALLAM; YOUSSEF, 2019; TREVISOL, 2018). Dessa forma, pode se dizer que

apresenta potencial utilização na engenharia de tecidos, devido à sua biocompatibilidade, biodegradabilidade e resistência mecânica (KHOTIMCHENKO *et al.*, 2001; KNILL *et al.*, 2004).

Segundo Santana (2010) e Turbiani (2007) os filmes de alginato podem ser preparados pelo método de *Casting* (Figura 3) na qual envolve primeiramente a solubilização do polissacarídeo em um solvente e nessa etapa pode acorrer à incorporação de diversos aditivos, de acordo com a aplicação, como: plastificante, agente reticulante, fármaco e substância antioxidante. Posteriormente, esta solução filme - formadora é vertida sobre um suporte e submetida à secagem.

Figura 3: Etapas da preparação do filme de alginato pelo método de *Casting* (Adaptado de LAROTONDA, 2002)



3.3.1.1 A aplicação do alginato sob a forma de biocurativo

Os curativos são utilizados com o intuito de cobrir a área lesionada da pele, atuando como proteção contra micro-organismos e fatores externos, evitando uma infecção futura. Possui como objetivo a proteção da ferida, mantendo um ambiente favorável para a cicatrização e permitindo que a pele respire, além disso, não deve ser tóxico e possuir características bioativas.

O alginato como um curativo pode ser utilizado tanto na forma seca, com a finalidade de absorver fluido da ferida, ou na forma de gel hidratado, fornecendo umidade ao ferimento seco. Em ambos os casos, a interação entre o biocurativo e a superfície do ferimento proporciona umidade favorável para a cicatrização, uma vez que nesses ambientes a migração de células epiteliais das extremidades da ferida para o seu centro é mais rápida do que quando os ferimentos são mantidos em um ambiente seco (CAMARGO, 2017; DE SOUZA, 2019; LEE; MOONEY, 2012; SALEM; SALLAM; YOUSSEF, 2019).

Comercialmente o alginato pode ser encontrado sob a forma de curativos como: o AlgiDERM®, Sorbson®, Nu- Derm®, Algosteril ®, Kaltostat ®, Kalginate ®, Restore ® e AlgiSite® (BUENO, 2015).

A literatura apresenta estudos sobre uso de matrizes poliméricas de alginato para a aplicação como curativos (Tabela 1) com a possibilidade de liberação de compostos bioativos (AGÜERO *et al.*, 2017; CAMPOS; GERSCHENSON; FLORES, 2011; GEORGE; ABRAHAM, 2006; LIN; YEH, 2004).

Tabela 1: Estudos utilizando filmes de alginato para aplicação como curativo

Estudo	Aplicação	Referências
Filmes de bicamada de alginato com Sinvastatina	Curativo com potencial anti-inflamatório, anti-trombagênico, antioxidante e função restauradora.	(MONTEIRO;VIEIRA, 2019)
Filmes de alginato e carboximetilcelulose com Diclofenaco de sódio	Liberação de anti-inflamatório em curativos	(TREVISOL,2018)
Biofilme de alginato contendo nanopartículas de ZnO	Curativo e embalagem antimicrobiana	(SILVA,2017)
Incorporação de nanoemulsões de óleos essenciais em filmes de alginato	Curativos	(PIRES, 2016)
Desenvolvimento de membranas mucoadesivas de quitosana e alginato para liberação controlada do fármaco antineoplásico Imiquimode	Membranas mucoadesivas	(CAMARGO,2017)

De acordo com esses estudos, o polissacarídeo apresenta-se como um importante componente na formação de filmes com características que permitem sua aplicação como curativo, destacando-se a estabilidade mecânica; a resistência à contaminação microbiológica; a alta porosidade e a natureza hidrofílica o que permite uma difusão de macromoléculas, o baixo custo de produção em relação aos polímeros sintéticos e a abundância de origem

renovável (CAMARGO, 2017; MONTEIRO; VIEIRA, 2019; PIRES, 2016; SILVA, 2017; TREVISOL, 2018).

Os curativos bioativos são preparados a partir de polímeros que participam efetivamente no processo de cicatrização e a apresentam como vantagem a possibilidade do melhoramento das características como também da aplicação (GEORGE; ABRAHAM, 2006; MONTEIRO; VIEIRA, 2019; PINHEIRO; BORGES; DONOSO, 2013).

Segundo Monteiro e Vieira (2019) a utilização do alginato como curativo proporcionou a manutenção do ambiente úmido na ferida. Camargo (2017) observou o favorecimento da aderência não excessiva na pele o que implica na facilidade de remoção do biofilme produzido quando utilizado como curativo.

Para este trabalho, em específico, aditivos como o glicerol e o cloreto de cálcio foram utilizados com a finalidade de melhorar as características mecânicas do filme e a vanilina, como a substância ativa, com o intuito de usufruir o seu potencial antioxidante e antimicrobiano.

3.4. Aditivos

3.4.1. Agente reticulante

Nas diversas aplicações dos biopolímeros há a necessidade que estes sejam parcialmente insolúveis e, em alguns casos, insolúveis em meio aquoso. Sendo assim, a adição de um agente reticulante se faz imprescindível, pois este promove ligações cruzadas entre as cadeias poliméricas, formando uma rede ou um retículo (PACHECO, 2016; ROGER; TALBOT; BEE, 2006; XU; BARTLEY; JOHNSON, 2003). Os polímeros, quando reticulados, exibem diferenças consideráveis em suas propriedades, dependendo do grau e do método de preparação, podendo ser determinado pela solubilidade, grau de intumescimento, estabilidade mecânica e, além disso, tamanho dos poros (PIRES; MORAES, 2015).

As reações de reticulação são, em geral, utilizadas para formar redes poliméricas com maior resistência o que auxilia no aprisionamento de substâncias entre essas regiões, como consequência a liberação daquela incorporadas em matrizes de polissacarídeos é adiada (AGÜERO *et al*., 2017; GEORGE; ABRAHAM, 2006).

O alginato pode passar por esse processo na presença de cátions bivalentes, como o Ca^{2+}, Mg^{2+}, Fe^{2+}, Ba^{2+}ou Sr^{2+} (BRACCINI; PÉREZ, 2001).

Na literatura o íon Ca^{2+} é utilizado como o agente reticulante em filmes de alginato em forma de solução de cloreto de cálcio (GEORGE; ABRAHAM, 2006; ROGER; TALBOT;

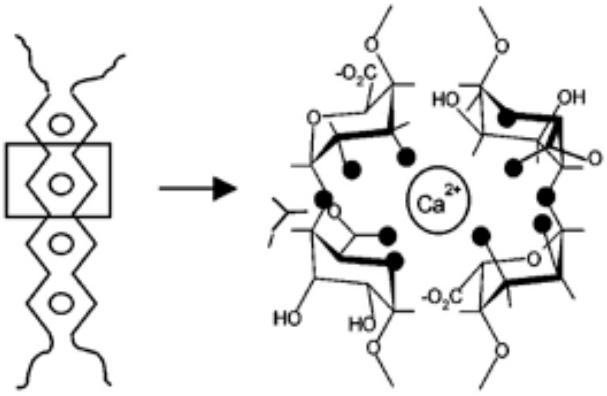
BEE, 2006; XU; BARTLEY; JOHNSON, 2003). Esse íon foi classificado como mais efetivo quando comparado em outros estudos realizados com os íons Mg^{2+} e Fe^{2+}, os quais demostraram a necessidade de uma maior concentração para que obtivessem resultados equivalentes aos de cálcio (LEE; MOONEY, 2012).

Segundo Rhim (2004) existem dois métodos para o processo de reticulção nos filmes de alginato, utilizando o íon Ca^{2+}, sendo a imersão direta do filme em uma solução de cloreto de cálcio (reticulação por imersão) ou a adição do sal na solução filme - formadora (reticulação em solução). Os filmes reticulados por imersão apresentam alterações significativas como o aumento da resistência a tração, diminuição no valor de elongação, permeabilidade e solubilidade em água, podendo ser controlados pela concentração como também pelo tempo do banho (BRACCINI; PÉREZ, 2001).

Para filmes com diferentes tipos de alginato em solução de $CaCl_2$, Sartori e colaboradores (2007) verificaram que o processo de troca iônica é rápido e que a maioria da conversão entre o sódio e o cálcio ocorreu nos primeiros 30 segundos. Nos instantes iniciais, todos os sítios ativos presentes nas cadeias estão disponíveis, já em tempos maiores, há uma resistência da difusão devido às ligações já existentes (ROGER; TALBOT; BEE, 2006).

Nesse processo os cátions divalentes se ligam aos blocos G, os quais apresentam uma estrutura que permite um maior grau de coordenação desses íons. Então, os blocos G de cadeias adjacentes se ligam, formando um modelo de reticulação conhecido como “caixa de ovos” (Figura 4). As zonas das paredes desses blocos criam cavidades em formato de losango que são preenchidas pelos cátions, aumentando a interação (BRACCINI; PÉREZ, 2001).

Figura 4: Representação da reticulação do polímero na presença do íon de cálcio (XU; BARTLEY; JOHNSON, 2003).



O alginato o qual apresenta maior proporção de bloco G é capaz de gerar filmes mais rígidos, enquanto os com maior proporção de blocos M formam filmes mais fracos, porém flexíveis (LEE; MOONEY, 2012).

A síntese de um filme polimérico envolve forças coesivas que dependem de propriedades como massa molecular, polaridade e estrutura da cadeia e podem resultar em filmes quebradiços. No entanto, esta limitação pode ser melhorada pela adição de uma plastificante (BRANDÃO FILHO, 2019; BUENO, 2019).

3.4.2. Plastificante

Os plastificantes são substâncias de baixo peso molecular que possuem a capacidade em realizar interações com as cadeias dos materiais poliméricos na estrutura dos filmes melhorando a funcionalidade dos mesmos e desencadeando um aumento no volume livre da molécula por meio da modificação na organização molecular (FARHAN; HANI, 2017; KUMAR; SHARMA; MISHRA, 2012).

A presença de grupos polares na cadeia dos plastificantes promove a substituição das interações polímero-polímero por interações de ligações de hidrogênio entre plastificante-polímero nos filmes (CIANNAMEA *et al*., 2018; PRIYADARSHI; KUMAR; NEGI, 2018).

O objetivo para o uso desse aditivo é o aumento da flexibilidade, diminuição da resistência mecânica (BAGNATO *et al*., 2017). É possível também observar uma melhoria na cristalinidade e na barreira para gases (GONÇALVES *et al*., 2019).

Os plastificantes comumente empregados em biofilmes são os monossacarídeos, oligossacarídeos, polióis e lipídeos (BIERHALZ, 2010; CAZÓN; CAZÓN; VELAZQUEZ; VÁZQUEZ, 2019; CIANNAMEA *et al*., 2018; PRIYADARSHI; KUMAR; NEGI, 2018). A escolha deve se basear na capacidade de se misturar homogeneamente e permanecer dissolvido, antes e após o resfriado (BUENO, 2019).

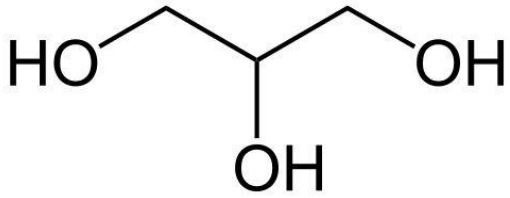
Mchugh e Krochta (2004) mostraram que polióis como, sorbitol, glicerol e polietilenoglicol são plastificantes efetivos, em biofilmes, sendo o glicerol o principal utilizado por apresentar um menor peso molecular, o que faz interagir melhor com as cadeias poliméricas.

Segundo Santana e Kieckbusch (2013) o glicerol é o mais utilizado para matrizes de alginato no contexto da produção de filmes obtendo resultados bem sucedidos, proporcionando melhorias nas propriedades mecânicas, enfraquecendo as forças

intermoleculares entre as cadeias poliméricas e reduzindo a energia necessária para fornecer mobilidade à estrutura do filme (CAZÓN *et al*., 2017; GONÇALVES *et al.*, 2019).

Quimicamente, o glicerol (Figura 5) é um tri-álcool com três carbonos, tendo como nome sistemático (IUPAC) 1, 2, 3 – propanotriol. A cadeia desse plastificante é composta por três átomos de carbono com um grupo hidroxila ligado a cada um desses que são responsáveis pela solubilização em água e pela sua natureza hidroscópica (DICK *et al.*, 2015; TAN; AZIZ; AROUA, 2013).

Figura 5: Estrutura química do glicerol (CAZÓN *et al*., 2017)



Classificado como um líquido incolor, sem cheiro e muito viscoso, derivados de fontes naturais e petroquímicas (BAGNATO *et al*., 2017). O termo glicerina aplica-se a purificação de compostos comerciais que contém, normalmente, quantidades maiores ou iguais a 95% de glicerol (TURBIANI, 2007).

3.4.3. Vanilina

A baunilha é uma substância utilizada na culinária mundial, especialmente em sobremesas como sorvetes, cremes, biscoitos e em algumas massas. Possui também propriedades farmacológicas como atividade antioxidante e antimicrobiana, atribuída aos compostos fenólicos, como a vanilina, a qual é extraída da fava seca (Figura 6) com concentrações entre 1-2 % na vagem das orquídeas (ANURADHA; SHYAMALA; NAIDU, 2013).

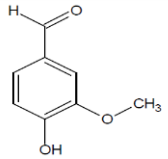
Figura 6: Fava da orquídea para extração da vanilina (LIMA, 2016)

A vanilina é um composto fenólico extraído das favas de orquídeas do gênero *Vanilla* sendo, a *Vanilla planifólia* considerada sua principal produtora por apresentar melhor aroma e sabor (WALTON *et al*., 2003; MOGOSANU; GRUMEZESCU, 2014). Esse gênero foi publicado pela primeira vez em 1754 e a sua fonte original passou a ser cultivada em países tropicais, sendo Madagascar o maior produtor, seguido pela Indonésia, China e México (KAUR; CHAKRABORTY, 2013). A Bahia se destaca em produção nacional, mas sua capacidade é reduzida o que leva à necessidade de importação para atendimento do mercado brasileiro (LIMA, 2016).

Essa substância é um dos aromatizantes mais importantes do mundo e, devido ao seu odor agradável é amplamente utilizada na indústria alimentícia e cosmética como aditivo para bebidas, comidas, velas, incenso, fragrâncias e aromatizantes de ambiente (KUMAR *et al*., 2012; PACHECO; DAMASIO, 2010).

A vanilina é classificada como é um aldeído fenólico, um composto orgânico com a fórmula molecular $C_8H_8O_3$ (3-metoxi-4-hidroxibenzaldeído). Seus grupos funcionais incluem aldeído, éter e fenol. Uma substância que possui um estado físico sólido, com aspecto de agulhas cristalinas de cor branca e com aroma doce. Solúvel em álcool, clorofórmio e éter. Essas propriedades físico-químicas são descritas na Tabela 2.

Tabela 2: Propriedades físico-químicas da vanilina (MEDEIROS, 2018)

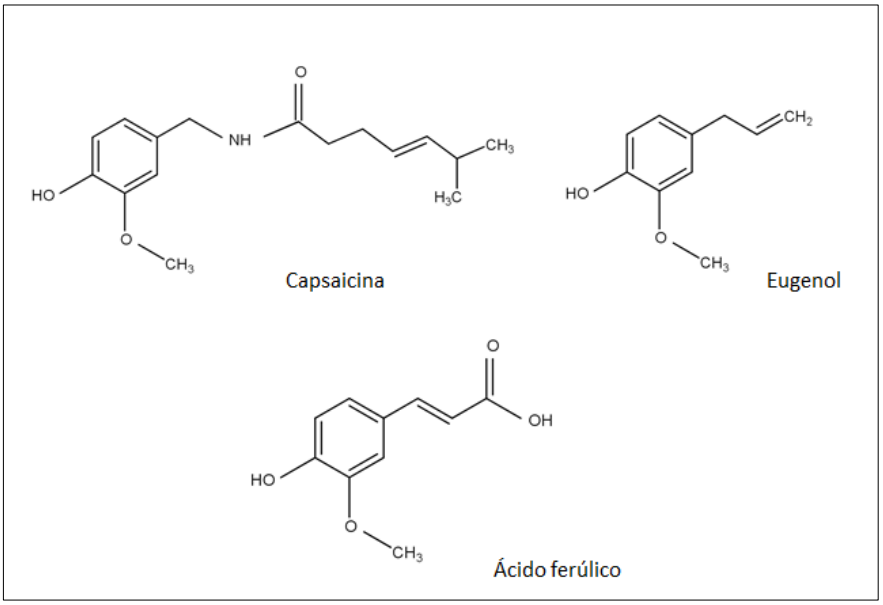
VANILINA	4-hidroxi-3-metoxibenzaldeído
Fórmula molecular	$C_8H_8O_3$
Peso molecular	152,15 g / mol
Estrutura química	
Estado físico	Sólido
Cor	Branco ou esbranquiçado
Odor	Cheiro adocicado
Aspecto físico	Agulhas cristalinas
Ponto de ebulição	285 ºC
Ponto de fusão	81,5 ºC
Solubilidade	Álcool, clorofórmio e éter.
Status de aditivo alimentar	Aprovado pela FDA

Recentemente, as propriedades bioativas da vanilina foram apresentadas nos estudos de Dhanalakshmi e colaboradores (2015) os quais constataram que o potencial antioxidante deve-se ao fato dessa substância interagir com espécies radicalares, evitando, dessa forma, processos oxidativos.

Os compostos antioxidantes são moléculas capazes de inibir e/ou retardar a oxidação causada pelo ataque de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, podendo intervir tanto no organismo quanto nos alimentos (MARTELLI; NUNES, 2014; GÜLÇIN, 2012; KUMAR; GOEL, 2019). Em sua constituição apresentam um núcleo fenólico, com diversas permutações no anel que o permitem doar átomos de hidrogênio aos radicais livres, tornando-os indisponíveis para a propagação da reação em cadeia (BOROSKI, 2015). Os fenólicos são compostos de natureza hidrofóbica e, portanto, considerado como membrana ativa (FITZGERALD *et al*., 2004).

A literatura mostra que substâncias como a capsaicina, o eugenol e o ácido ferúlico (Figura 7), ou seja, substâncias que possuem o grupo vanilóide, também apresentam propriedades antioxidantes (MEDEIROS, 2018; WORANUCH *et al*., 2016; YANG *et al*., 2016; LICCIARDELLO *et al*., 2015).

Figura 7: Estrutura química dos vanilóides (A autora)



Ao avaliar os antioxidantes de ocorrência natural, esses são mais vantajosos em termo de toxicidade, que embora existente, é menos lesiva aos tecidos do que produtos sintéticos (ESCOBAR, 2002; RAMOS *et al*; 2014).

De acordo com Fitzgerald e colaboradores (2004) a vanilina é também considerada como um composto ativo que desestabiliza a integridade da membrana bacteriana, resultando na dissipação de gradientes iónicos e, portanto, inibindo a respiração desses micro-organismos.

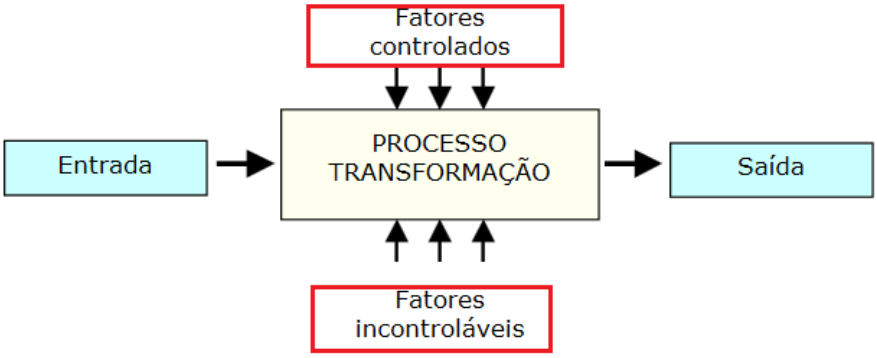
Sangsuwana e colaboradores (2008) realizaram um comparativo de filmes de quitosana/metilcelulose com e sem a incorporação de vanilina como agente antimicrobiano natural. O resultado foi um melhor efeito inibitório contra o crescimento de *Escherichia coli* na presença da vanilina. Fitzgerald e colaboradores (2004) também analisaram a ação antimicrobiana da vanilina e os resultados mostraram que ocorreu uma atividade inibitória dessa substância nas bactérias *Escherichia coli*, *Lactobacillus plantarum* e *Listeria innocua*.

Nesse cenário, a proposição de projetos e pesquisas que envolvam compostos bioativos, na produção de biofilmes representa boas perspectivas de sucesso devido às importantes propriedades das matérias primas empregadas (MELO *et al.*, 2011; MOGOSANU; GRUMEZESCU, 2014).

3.5. Planejamento de experimentos e análise das variáveis de resposta

Os experimentos são técnicas que podem ser utilizadas para analisar o desempenho de processos e sistemas. Essa ferramenta é considerada um teste ou uma série de testes nos quais se induzem mudanças deliberadas ou estímulos nas variáveis de entrada (*inputs*) do processo, com a finalidade de que seja possível observar e identificar os efeitos nas respostas ou nas variáveis de saída (*outputs*), conforme a Figura 8, buscando melhoria e a redução de custos (MONTGOMERY, 2017).

Figura 8: Modelo geral de um sistema de um processo (MONTGOMERY, 2017)



Essa ferramenta possui a capacidade de reduzir tempo e gastos desnecessários a partir de matrizes previamente construídas de acordo com o método utilizado e principalmente quantidade de fatores analisados em relação à determinada resposta (COSTA *et al*., 2016; PAIVA *et al*., 2007).

De acordo com WERKEMA; AGUIAR, 1996, apresentam-se alguns conceitos e termos fundamentais para a aplicação dessa técnica:

Fatores de controle: estes são os fatores alterados intencionalmente no experimento. O objetivo fundamental de introduzir estímulos nos fatores de controle é analisar o efeito produzido nas variáveis de resposta e com isso determinar os principais fatores do processo.

Variáveis de resposta: são as variáveis dependentes que sofrem algum efeito quando estímulos são introduzidos nos fatores que regulam ou ajustam os processos de fabricação. Nos experimentos, podem existir uma ou mais variáveis de resposta a se avaliar.

Fatores de ruído: são os fatores, conhecidos ou não, que influenciam nas variáveis de resposta do processo/experimento.

Matriz experimental: é o plano formal construído para conduzir os experimentos. Nesta matriz são incluídos os fatores de controle, os níveis e tratamento dos experimentos.

Apresentam condições individuais referentes às condições específicas de cada um dos fatores testados durante a experimentação.

Tratamento: é a combinação dos níveis de fatores de controle, isto significa que cada um dos experimentos representará um tratamento.

Efeito principal: é a diferença média observada na resposta quando se muda o nível do fator de controle investigado.

Blocos: é a técnica utilizada para avaliar a variabilidade produzida pelos fatores perturbadores dos experimentos. Mediante essa técnica procura-se criar um experimento (grupo ou unidades experimentais balanceadas) mais homogêneo e aumentar a precisão das respostas que são analisadas.

As propostas experimentais em pesquisas, em sua grande maioria, podem ser melhoradas com métodos para a construção de modelos, visando sempre a melhor interpretação do processo (MONTGOMERY, 2017; SHAYKHI; ZINATIZADEH, 2014). Tal fato é plausível a partir da análise estatística avançada, a qual se trata de uma ferramenta de estudo, em que é possível avaliar as variáveis e suas interações, como também se podem ou não ter influência sobre as respostas a serem analisadas (SUKRITI *et al*., 2017). As etapas de um procedimento experimental como todo estão apresentas na Figura 9.

Figura 9: Etapas do procedimento experimental (A autora)

O planejamento de experimentos é constituído de matrizes experimentais, que representam condições individuais referentes às condições específicas de cada um dos fatores testados durante a experimentação (SUKRITI *et al*., 2017). Ao se estudar as variáveis com pelo menos dois níveis é possível identificar os seus efeitos sobre as respostas de interesse (BARROS NETO *et al*., 2010).

Nessa classe de projeto de experimentos, existem alguns métodos que podem ser selecionados de acordo com a capacidade de análise. Os tipos mais utilizados no DOE

(*Design of Experiments*) são o planejamento fatorial completo, planejamento fatorial fracionado, os arranjos de Taguchi, a metodologia de superfície de resposta e os experimentos com mistura (LEE; ABDULHAMID; LAI; 2015).

Particularmente, os planejamentos fatoriais são técnicas que consistem em realizar testes com cada uma das combinações da matriz experimental, determinando as variáveis que são mais significativas e que influenciam direta ou indiretamente na resposta final (GALDÁMEZ, 2002). Contudo, a metodologia superfície de resposta é um conjunto de técnicas de planejamento e análise de experimentos usados na modelagem matemática, um procedimento para determinar as condições ótimas dos fatores de controle e que também interferem no sistema, além disso, é uma maneira de analisar vários fatores ao mesmo tempo permitindo a construção de modelos (OLIVEIRA, 2018).

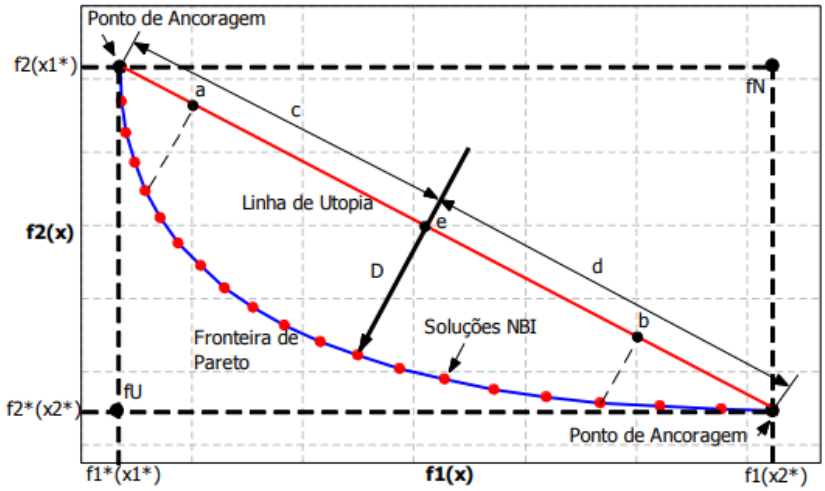
Com a finalidade do modelo de superfície de resposta ser utilizado é preciso que a região de análise seja quadrática, ou seja, observa-se a presença de curvatura a qual pode ser encontrada por meio da análise do teste de hipótese, podendo ser configurado em função da distância entre o ponto central do arranjo e a linha diagonal que liga os vértices do cubo em um modelo fatorial. Ela é encontrada quando o ponto não pertence à reta diagonal, ou seja, P-valor menor que o nível de significância igual a 0,05 (NAVES, 2017).

3.6. Otimização

A Otimização de processos pode ser definida como um grupo de técnicas capaz de melhorar e manter a qualidade dos processos dentro dos padrões desejados (MILAGRES, 2018). Na presença de problemas com múltiplos objetivos, a otimização consiste em obter uma solução ótima com vários termos sujeitos a um conjunto de restrições e algumas vezes conflitantes (LOPES, 2015; SIMAB; JAVADI; NEZHAD, 2018). Portanto, a solução de um problema multiobjetivo resulta em um conjunto de soluções ótimas, em vez de uma única solução específica (SIMAB; JAVADI; NEZHAD, 2018).

Em casos bidimensionais, o método *Normal Boundary Intersection* (NBI) desenvolvido por Das e Dennis (1996), visa à construção da fronteira de Pareto. Conforme apresentado na Figura 10, a fronteira de Pareto para problemas bi-objetivos consiste em uma curva representada no plano, nos quais os pontos distribuídos uniformemente são os valores otimizados das respostas (NAVES *et al*., 2016; PAIXÃO *et al*., 2019; SIMAB; JAVADI; NEZHAD, 2018).

Figura 10: Fronteira de Pareto para problemas bi-objetivos obtidos com o NBI (Adaptado de LOPES, 2015).



Este método é independente das escalas relativas das funções objetivo com vantagem sobre os convencionais (LOPES, 2015).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

Este capítulo descreve os materiais e métodos utilizados em cada etapa deste trabalho: o planejamento e a execução dos experimentos como também as análises e caracterizações a serem realizadas.

4.1. Materiais utilizados

Os materiais utilizados como também a procedência dos mesmos estão descritos na Tabela 3 a seguir.

Tabela 3: Os reagentes utilizados na produção dos biofilmes

Reagentes	Procedência
Glicerol	Dinâmica Química Contemporânea
Alginato de sódio	Dinâmica Química Contemporânea
Vanilina	Alphatec
Etanol	Alphatec
Cloreto de cálcio	Neon
Água destilada	Laboratório - UFSJ

4.1.1. Análise experimental

Todo o modelo da parte de experimentos foi realizado de acordo com um planejamento experimental (DOE), utilizando o fatorial completo, a fim de verificar a curvatura do modelo, o qual permite analisar posteriormente a metodologia de superfície de resposta.

Utilizou-se a combinação de 3 fatores e 2 níveis sendo $2^k = 8$ pontos fatoriais, seis pontos axiais (2k = 6), quatro pontos centrais (Cp = 4) e dois pontos centrais axiais, chegando a um resultado de 20 experimentos. Foi adotada uma distância axial de 1,633, empregada quando se tem a presença de 3 fatores.

As variáveis de entrada foram definidas como o alginato, a vanilina e o cloreto de cálcio, e, além disso, utilizou-se a técnica blocos para a avaliação de outro fator, sendo a influência na concentração de cloreto de cálcio presente na segunda etapa de desenvolvimento

do filme, apresentados na matriz do planejamento. Quanto as variáveis de resposta, duas análises foram feitas: a solubilidade e o grau de intumescimento.

A partir de testes preliminares, foi possível identificar os intervalos dos níveis de cada um dos fatores que melhor expressam as características do processo estudado. Uma matriz foi gerada (Tabela 4) pelo planejamento de experimentos e as respectivas concentrações utilizadas na produção dos filmes.

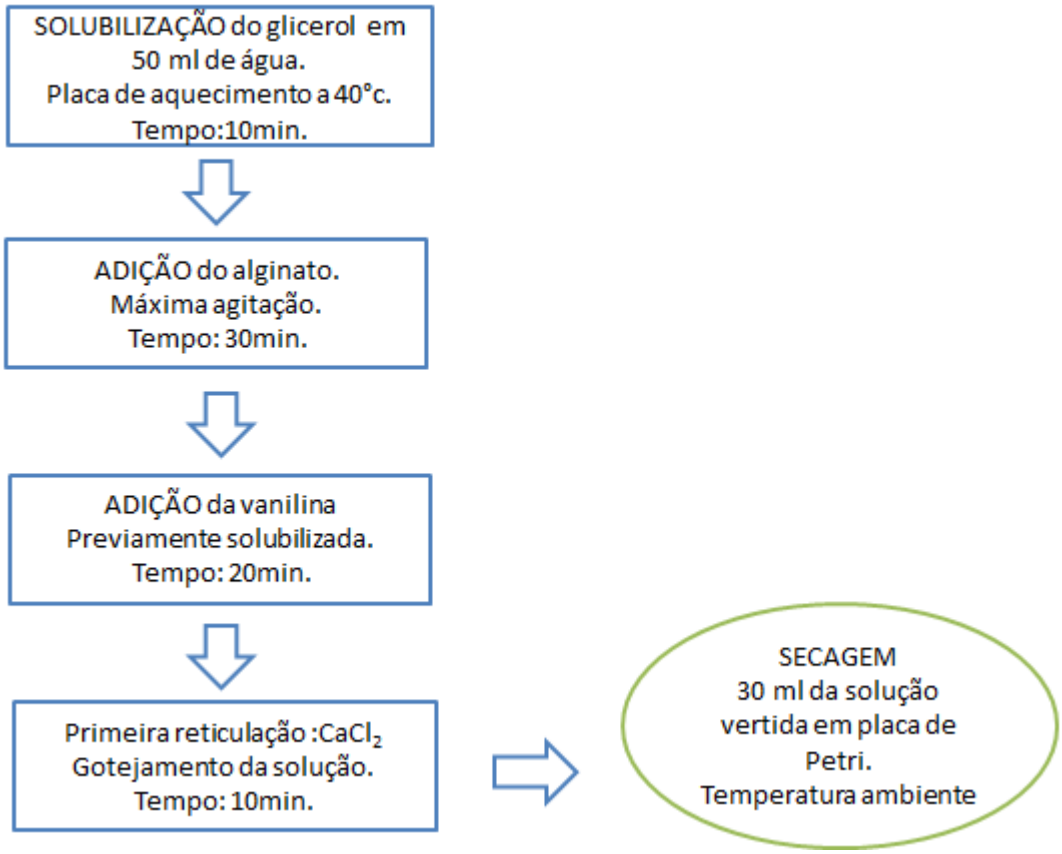
Tabela 4: Concentrações utilizadas na produção dos biofilmes de acordo com o planejamento de experimentos

Ordem	Blocos	TipoPt	Alginato (g)	Vanilina (g)	Cloreto de cálcio (g)
1	1	1	0,5	0,01	0,005
2	1	1	1,2	0,01	0,005
3	1	1	0,5	0,04	0,005
4	1	1	1,2	0,04	0,005
5	1	1	0,5	0,01	0,009
6	1	1	1,2	0,01	0,009
7	1	1	0,5	0,04	0,009
8	1	1	1,2	0,04	0,009
9	1	0	0,85	0,025	0,007
10	1	0	0,85	0,025	0,007
11	1	0	0,85	0,025	0,007
12	1	0	0,85	0,025	0,007
13	2	-1	0,27845	0,025	0,007
14	2	-1	1,42155	0,025	0,007
15	2	-1	0,85	0,000505	0,007
16	2	-1	0,85	0,049495	0,007
17	2	-1	0,85	0,025	0,003734
18	2	-1	0,85	0,025	0,010266
19	2	0	0,85	0,025	0,007
20	2	0	0,85	0,025	0,007

Os filmes foram preparados pela técnica de Casting, seguindo a metodologia de Santana (2010) e Turbiani (2007), com adaptações. O processo foi realizado em duas etapas. Inicialmente Placa Aquecedora em Cerâmica com Agitação (IKA® C-MAG HS7)

solubilizou-se a glicerina (0,75 ml) em água destilada (50 ml) por 10 minutos, em seguida, adicionou-se o alginato mantendo a máxima agitação por 30 minutos. A vanilina, previamente solubilizada em etanol, foi acrescentada ao sistema (glicerol-água-alginato), permanecendo 20 minutos sob agitação. A solução de $CaCl_2$ foi gotejada ao sistema, 10ml de solução. A temperatura do processo foi mantida constante a 40°C. Posteriormente, foi realizado o porcionamento através da dosagem de 30 ml da solução filmogênica obtida, a qual foi vertida, manualmente, em placas de Petri. As amostras foram levadas para secagem, em bancada, a temperatura ambiente. A Figura 11 apresenta o fluxograma do primeiro estágio para a produção dos filmes.

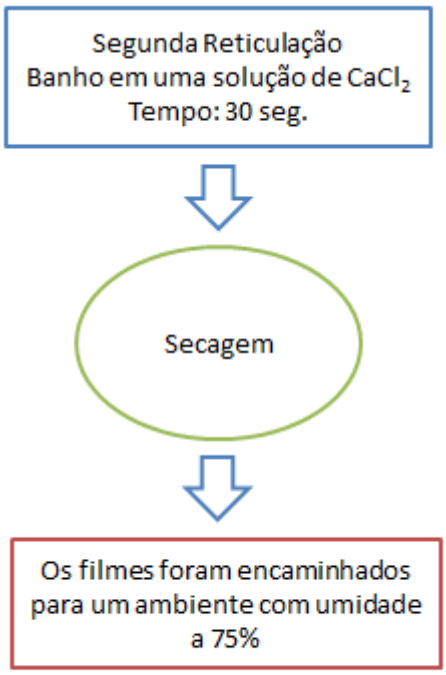
Figura 11: Fluxograma da metodologia empregada no primeiro estágio de produção dos biofilmes



O biofilme produzido é totalmente solúvel em água, deve-se então passar por uma reticulação complementar, a qual consiste na imersão do filme, previamente seco, por 30 segundos em 25 ml de uma solução de cloreto de cálcio, a temperatura ambiente, variando de 2 a 3% (bloco 1 e 2, respectivamente) conforme o planejamento de experimentos.

Após a secagem, foram levados a um ambiente com umidade (75%), utilizando uma solução saturada de cloreto de sódio (NaCl), durante 48hs e, posteriormente, os mesmos foram caracterizados. A Figura 12 a seguir apresenta o fluxograma do segundo estágio de produção dos filmes.

Figura 12: Fluxograma da metodologia empregada no segundo estágio de produção dos biofilmes



Após essas etapas, os biofilmes foram então estudados quanto a uma análise física, de solubilidade e do grau de intumescimento.

Dentre os melhores pontos gerados na fronteira de Pareto, processo de otimização das respostas, eles foram caracterizados quanto à atividade antimicrobiana e comportamento térmico.

4.2. Estudo dos filmes

4.2.1. Análise física dos filmes

Avaliações subjetivas, considerando os aspectos visuais e táteis como a homogeneidade (ausência de partículas), continuidade (ausência de rupturas ou regiões

quebradiças), flexibilidade, facilidade de desprendimento do suporte e transparência foram realizadas.

4.2.2. Solubilidade

Para a determinação da solubilidade dos filmes em água, uma amostra quadrada (2x2) cm foi imersa em 25 ml de água destilada e o sistema mantido sob agitação utilizando o equipamento *shaker* com uma rotação de 150 rpm (NERY, 2014). A amostra final foi determinada submetendo-se a um processo de secagem.

A solubilidade (S) pode ser expressa em função da massa seca inicial e final, conforme a Equação 1:

$$S = \frac{[Mi - Mf]}{Mi} x100 \quad \textbf{(1)}$$

Na qual:

S- é a quantidade de matéria solúvel (%);

Mi- é a massa inicial da amostra (g);

Mf- é a massa seca final da amostra (g).

4.2.3. Grau de intumescimento percentual (GI)

O grau de intumescimento de cada filme foi avaliado com uma amostra quadrada (2x2) cm, imersa em 5 ml de água destilada durante 40 minutos (XU *et al*., 2003). O excesso de umidade na superfície das amostras foi retirado antes de cada pesagem

O grau de intumescimento de cada amostra no tempo t pode ser calculado mediante a Equação 2:

$$\mathrm{GI} = \frac{(M_u - M_\mathrm{i})}{M_\mathrm{i}} \times 100 \quad \textbf{(2)}$$

Na qual:

GI- é o grau de intumescimento do filme;

M_u – é a massa da amostra retirada da solução (g);

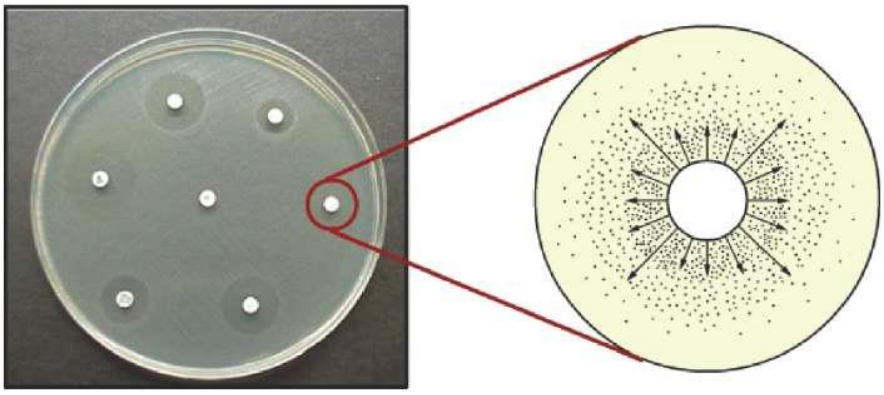
M_i – é a massa inicial da amostra (g).

4.3. Técnicas de caracterização

4.3.1. Atividade antimicrobiana

Diversos métodos laboratoriais podem ser utilizados para medir a sensibilidade das bactérias aos agentes antimicrobianos e dentre eles pode citar o método de disco - difusão em ágar (Figura 13). A amostra a ser testada é colocada em contato com o meio de cultura sólido inoculado com um micro-organismo, onde ocorre o aparecimento de um halo no qual não há o crescimento do micro-organismo, denominado halo de inibição (MAIZURA *et al.*, 2007).

Figura 13: Princípio de teste de suscetibilidade pelo método do disco-difusão (MACHADO; GALES, 2008)



Dentre os patógenos de relevância tanto na área de alimentos, quanto de infecções de lesões de pele destacam-se as bactérias *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa* (Pires *et al*. 2008). Dessa forma, a eficiência antimicrobiana dos filmes de alginato aditivado com vanilina foi avaliada contra as bactérias pelo teste de difusão em ágar.

Após a diluição seriada, a partir da cultura inicial, 0,1 ml das suspensões contento 10^6 UFC/ml de *P. aeruginosa* e *E. coli* foram inoculadas no meio de cultura Miuller-Hinton. Amostras de filme foram colocadas assepticamente sobre a superfície da placa de Petri (9 cm de diâmetro) contendo o meio inoculado e o conjunto foi incubado a 35°C por 24h. Depois deste período, o halo de inibição foi determinado pela medida do diâmetro formado ao redor do filme.

4.3.2. Análises térmicas

Um analisador termogravimétrico (Shimadzu modelo DTG60, Japão) e calorímetro diferencial de varredura (Shimadzu modelo DSC-60 Plus, Japão) foram utilizados para monitoramento das propriedades térmicas dos biofilmes. A análise termogravimétrica (TGA) foi realizada com uma amostra de 4,139 mg (filme com vanilina) e 4,976 mg (filme controle) aquecida de 0 a 600 °C à uma taxa de aquecimento de 10 °C/min, sob um fluxo de nitrogênio de 50,0 mL/min em uma célula de alumina. Mudanças na massa em função da temperatura foram registradas. As análises de calorimetria exploratória diferencial (DSC) foram realizadas com uma amostra de 3,921 mg (filme com vanilina) e 4,274 mg (filme controle), sob as mesmas condições das análises termogravimétricas (VIDAL, 2021).

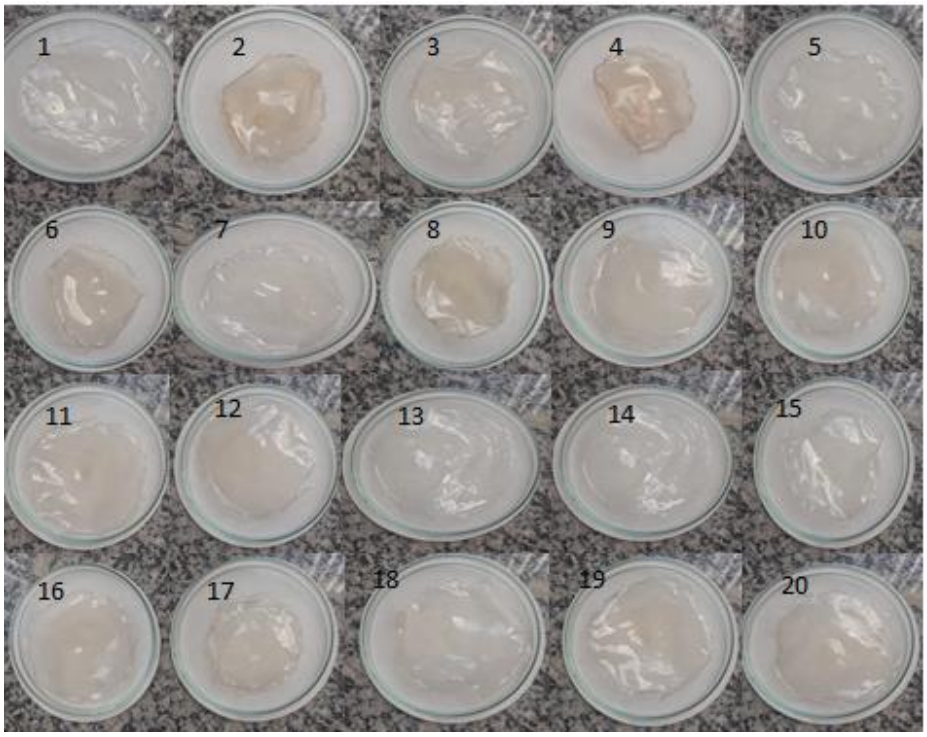
5. RESULTADOS

5.1 Análise física dos filmes

Os resultados mostraram que os biofilmes submetidos à variação de alginato, vanilina e cloreto de cálcio exibiram diferenças moduláveis nas suas propriedades, como na coloração, espessura, flexibilidade e no enrugamento da superfície.

Os biofilmes apresentaram tendência à coloração rosa claro naqueles com maior concentração de vanilina (3, 4, 7, 8 e 16), como mostra a Figura 14. Quanto à superfície, observou-se homogeneidade de mistura, pois, não verificou a permanência de qualquer substância em regiões específicas. Os biofilmes com maior concentração de alginato (2, 4, 6, 8 e 14), se apresentaram com maior espessura o que facilitou sua retirada das placas de Petri, porém os de menor concentração foram de difícil manuseio, necessitando de maior cuidado para que não houvesse a ruptura de sua estrutura.

Figura 14: Biofilmes desenvolvidos de acordo com a matriz do planejamento experimental



Após a segunda etapa de reticulação, o enrugamento da superfície, posteriormente, o banho de $CaCl_2$ ocorreu para os com maior espessura.

5.2 Análise da solubilidade e do grau de intumescimento

Diante do planejamento fatorial completo para os três fatores já elencados na Tabela 4, as análises de solubilidade e do grau de intumescimento foram realizadas e os resultados encontrados estão na Tabela 5 a seguir.

Tabela 5: Resultados encontrados para a solubilidade e o grau de intumescimento de acordo com o planejamento de experimentos

Ordem	Blocos	Alginato (g)	Vanilina (g)	Cloreto de cálcio (g)	Solubilidade (%)	GI (%)
1	1	0,5	0,01	0,005	26	35
2	1	1,2	0,01	0,005	20	205
3	1	0,5	0,04	0,005	25	53
4	1	1,2	0,04	0,005	24	249
5	1	0,5	0,01	0,009	32	76
6	1	1,2	0,01	0,009	27	248
7	1	0,5	0,04	0,009	25	39
8	1	1,2	0,04	0,009	17	211
9	1	0,85	0,025	0,007	29	127
10	1	0,85	0,025	0,007	30	128
11	1	0,85	0,025	0,007	29	127
12	1	0,85	0,025	0,007	31	126
13	2	0,27845	0,025	0,007	30	25
14	2	1,42155	0,025	0,007	23	135
15	2	0,85	0,000505	0,007	29	57
16	2	0,85	0,049495	0,007	23	43
17	2	0,85	0,025	0,00373	24	50
18	2	0,85	0,025	0,01026	25	53
19	2	0,85	0,025	0,007	30	37
20	2	0,85	0,025	0,007	29	36

A partir das respostas para as análises dos experimentos foram adotadas ferramentas a fim de avaliar o processo estudado. Primeiramente precisou identificar a presença de curvatura no modelo por meio da técnica de planejamento fatorial completo e assim gerar uma superfície de resposta com a finalidade de encontrar os fatores que mais influenciaram no

processo, suas interações e também identificar se o experimento foi executado da maneira correta e posteriormente os resultados foram então avaliados.

A análise de variância foi utilizada para um nível de significância de 5% e uma confiabilidade de 95%, nível este que reflete uma boa aproximação do modelo empírico com modelo experimental.

Com o objetivo de encontrar uma região viável do processo, ou seja, onde se consegue obter respostas mais próximas ao ideal, que oferecem uma melhor solução para o problema analisado, utilizou-se o método de otimização NBI.

5.2.1 Avaliação do planejamento experimental

Identificada à presença de curvatura no modelo linear, foi possível realizar a superfície de resposta com a finalidade de identificar a influência das variáveis de forma mais robusta no processo estudado. Também, a partir da superfície de resposta foi possível utilizar algoritmos de otimização, que faz parte da composição deste trabalho. Nas Tabelas 6 e 7 estão representadas as análises de variância para a solubilidade e para o grau de intumescimento.

Tabela 6: Análise da variância para a solubilidade

Fonte	GL	SQ (Aj.)	QM (Aj.)	Valor F	Valor P
Modelo	10	0,036485	0,003648	219,3	0
Blocos	1	0,00025	0,00025	15,01	0,004
Linear	3	0,018052	0,006017	361,68	0
Alginato	1	0,015855	0,015855	952,98	0
Vanilina	1	0,002089	0,002089	125,57	0
Cloreto de cálcio	1	0,000108	0,000108	6,48	0,031
Quadrado	3	0,009222	0,003074	184,77	0
Alginato*alginato	1	0,000562	0,000562	33,78	0
Vanilina*vanilina	1	0,002496	0,002496	150	0
Cloreto de cálcio*cloreto de cálcio	1	0,00706	0,00706	424,35	0
Interação com dois fatores	3	0,008961	0,002987	179,54	0
Alginato*vanilina	1	0,000042	0,000042	2,55	0,145
Alginato*cloreto de cálcio	1	0,000058	0,000058	3,5	0,094

Vanilina*cloreto de cálcio	1	0,00886	0,00886	532,57	0
Erro	9	0,00015	0,000017		
Falta de ajuste	5	0,00015	0,00003	*	*
Erro puro	4	0	0		
Total	19	0,036635			
Modelo	R^2:	99,14%	R^2 Ajust: 99,59%		

GL: grau de liberdade; SQ: soma dos quadrados; QM: quadrado médio e F: valor da estatística F.

Tabela 7: Análise da variância para o grau de intumescimento

Fonte	GL	SQ (AJ.)	QM (Aj.)	Valor F	Valor P
Modelo	10	121417	12141,7	42,24	0
Blocos	1	21529	21528,5	74,9	0
Linear	3	85916	28638,5	99,63	0
Alginato	1	85722	85722,3	298,22	0
Vanilina	1	91	91,2	0,32	0,587
Cloreto de cálcio	1	102	102,1	0,36	0,566
Quadrado	3	11516	3838,5	13,35	0,001
Alginato*alginato	1	10923	10923,2	38	0
Vanilina*vanilina	1	127	126,6	0,44	0,523
Cloreto de cálcio*cloreto de cálcio	1	85	84,8	0,3	0,6
Interação com dois fatores	3	2457	819	2,85	0,097
Alginato*vanilina	1	85	84,5	0,29	0,601
Alginato*cloreto de cálcio	1	61	60,5	0,21	0,657
Vanilina*cloreto de cálcio	1	2312	2312	8,04	0,02
Erro	9	2587	287,4		
Falta de ajuste	5	2587	517,4	*	*
Erro puro	4	0	0		
Total	19	124004			
Modelo		R^2 : 95,60	R^2 Ajust: 97,91%		

GL: grau de liberdade; SQ: soma dos quadrados; QM: quadrado médio e F: valor da estatística F.

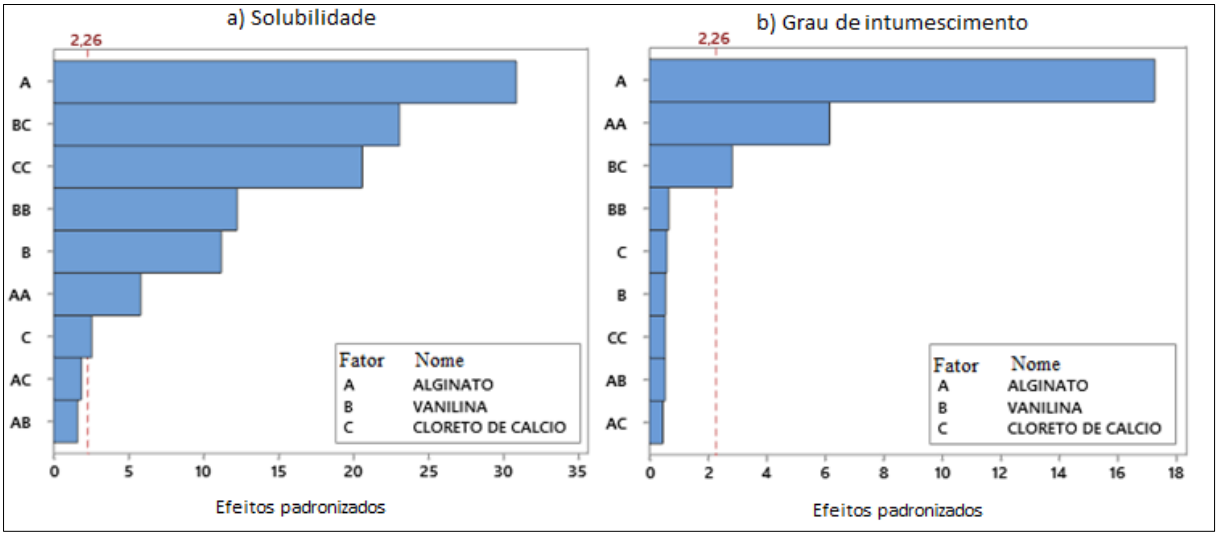
Dentre os principais fatores avaliados para a solubilidade, todos foram significativos para essa resposta, ou seja, p-valor < 0,05. O mesmo não ocorreu para o grau de intumescimento, sendo o alginato o único fator relevante.

Quanto a interações entre dois fatores, a vanilina*cloreto de cálcio (BC) foi à única significativa para as duas análises. Em relação à ferramenta *blocos a concentração utilizada no experimento de bloco 1 foi mais considerável na produção dos biofilmes.

Pode-se perceber, a partir da análise do p-valor para falta de ajuste do modelo, que ambos estão ajustados às condições experimentais, com valores superiores ao nível de significância de 5%. Para o modelo completo estudado, os valores dos ajustes R^2 Ajust são superiores a 97 %. O conjunto dessas duas análises reflete ao estudo uma possibilidade de replicação e de confiabilidade.

Apesar de se identificar a partir da análise de variância (ANOVA) quais são os fatores mais significantes nas respostas de solubilidade e no grau de intumescimento é importante determinar em qual magnitude cada um desses fatores afeta a resposta final. Para isso, uma forma de apresenta-la, porém com um conceito mais visual é pelo gráfico de Pareto (Figura 15).

Figura 15: a) Gráfico de Pareto para a análise da solubilidade e b) Gráfico de Pareto para análise do grau de intumescimento

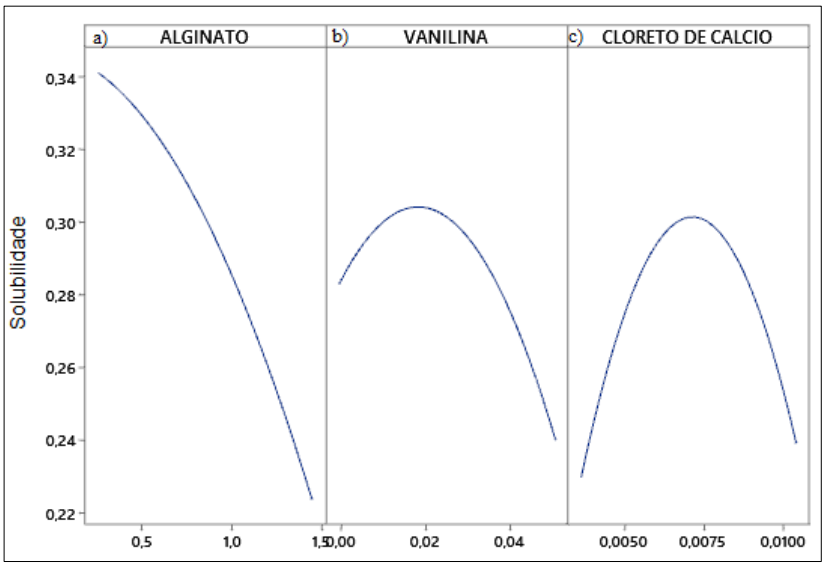


Ambos os gráficos na Figura 15 indicam a importância do alginato e da interação BC para as duas respostas analisadas. Isto pode vir a ilustrar que a região do ponto próximo à curvatura desses fatores levam as melhores respostas.

5.2.2 Análise dos efeitos principais

Diferentemente do gráfico de Pareto, a análise dos efeitos principais, as Figuras 16 e 17, permitem identificar em cada uma das respostas analisadas, o comportamento em termos de gradiente atribuído aos níveis de cada um dos fatores. Assim, essa análise se torna uma das primeiras premissas para a aplicação de qualquer algoritmo de otimização. Após a identificação desses fatores e dos seus níveis, facilita encontrar uma possível região que leva a melhores respostas no processo (NAVES, 2017).

Figura 16: Gráfico dos efeitos principais do planejamento de experimentos para solubilidade.



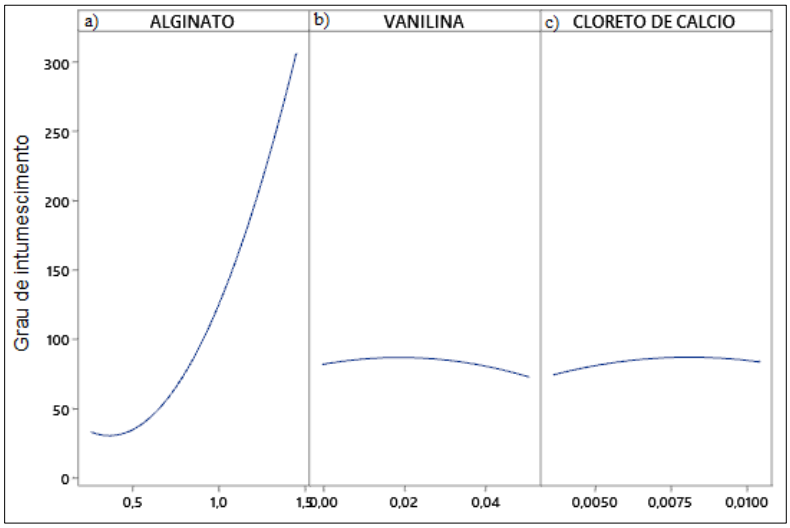
De acordo com a Figura 16, a concentração de alginato é inversamente proporcional ao resultado da solubilidade, uma menor a concentração desse reagente formou-se filmes mais finos, facilitando a desintegração. O mesmo comportamento foi observado no trabalho de Bierhalz (2010) na produção de filmes de alginato reticulados com cálcio.

Entretanto, o acréscimo da vanilina proporcionou uma diminuição na solubilidade, devido à região hidrofóbica definida por "interfaces da vanilina" ao longo da estrutura do filme o que desencadeia um efeito contrário da desintregação do mesmo (MARIN *et al.*, 2013). Polifenóis como a vanilina, estabelecem ligação de hidrogênio, o que pode limitar as interações entre grupos hidrofílicos com as moléculas de água, reduzindo a solubilidade pela diminuição do “H” livre disponível (QUIN ZOU *et al.*, 2015). Os menores valores para a solubilidade nesse estudo são encontrados ao se utilizar uma concentração maior do que 0,02g dessa substância.

Em relação ao agente reticulante $CaCl_2$, observa-se que uma reticulação efetiva no primeiro estágio de produção dos filmes ocorreu com uma concentração superior a 0,007g.

No gráfico de efeitos principais para análise do grau de intumescimento (Figura 17) apresenta uma importância significativa na concentração de alginato e o acréscimo da vanilina não interferiu no intumescimento dos filmes. O mesmo comportamento também foi observado no trabalho de Stroescu e colaboradores (2015) na produção de filmes poliméricos com vanilina. Todavia, no estudo de Qin Zou e colaboradores (2015) a vanilina foi utilizada como agente de reticulação em filmes de quitosana para a produção de microesferas na liberação de fármacos, porém com uma concentração maior do que a empregada nessa pesquisa, influenciando na redução do grau de intumescimento.

Figura 17: Gráfico dos efeitos principais do planejamento de experimentos para o grau de intumescimento



O cloreto de cálcio não influenciou na resposta para o grau de intumescimento, como a concentração utilizada na reticulação complementar, segundo estágio, foi baixa (2%), a rede tridimensional formada não é tão efetiva (BIERHALZ, 2010).

A capacidade dos filmes poliméricos de intumescer, como o de alginato é facilitada pelos grupos carboxílicos, que se associam fortemente as moléculas de água (DONATI *et al*., 2005; YANG, 2011). Dessa forma, ocorre a difusão do solvente para o interior dos filmes que se acomodam na fase polimérica, promovendo a liberação de substâncias ativas como também provocando a desintegração dos mesmos, assim a concentração do agente reticulante utilizada deve estar de acordo com a finalidade de aplicação (XU *et al*., 2003; ROGER *et al*., 2006).

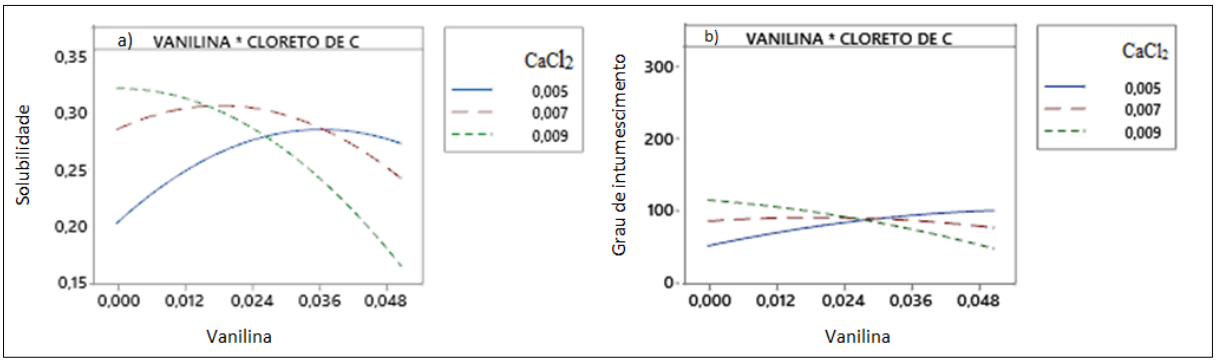
5.2.3 Análise dos efeitos das interações entre os fatores

O comportamento individual de cada um dos fatores nos níveis em ambas as respostas foi avaliado. No entanto, deve-se averiguar se existe alguma relação entre eles e a forma com que podem interferir na resposta final. Como observado nas Tabelas 6 e 7, a interação a qual influenciou foi a BC, em ambas as respostas, sendo ela a ser analisada.

A partir da Figura 18, é possível de observar que a concentração de 0,005g de $CaCl_2$ não apresenta bons resultados de reticulação para as respostas solubilidade e grau de intumescimento. A solubilidade abaixo de 30%, por exemplo, é encontrada utilizando valores de $CaCl_2$ acima de 0,007g e de vanilina superiores a 0,024g.

Quanto a análise do grau de intumescimento para a concentração de 0,007g de $CaCl_2$ não ocorreu variação na resposta mesmo variando a massa de vanilina. Entretanto, ao utilizar a concentração de 0,009 g de $CaCl_2$ o aumento na presença de vanilina, influencia fortemente nos resultados, ocorrendo uma diminuição no grau de intumescimento, como explicado anteriormente.

Figura 18: a) Efeito das interações na solubilidade e b) efeito das interações no grau de intumescimento

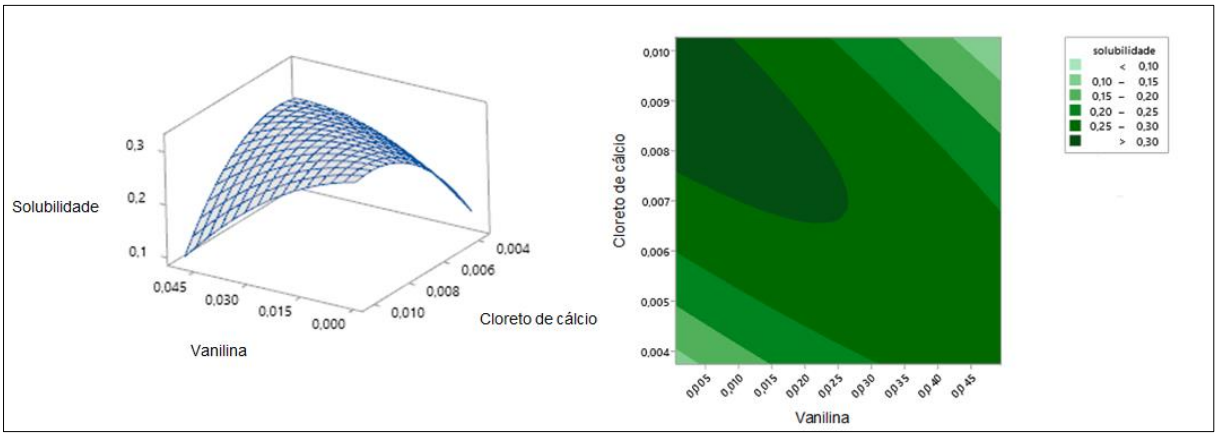


Ao avaliar as Figuras 19 e 20 pôde-se detectar a presença de curvatura no modelo e analisar que se trata de uma superfície côncava. As funções quadráticas completas evidenciam pontos de máximo, o que caracterizam essas funções, desse modo é possível de se encontrar uma região ótima (média solubilidade e alto grau de intumescimento) de acordo com a aplicabilidade desse material, o uso da superfície de resposta auxilia nesse resultado.

De uma forma geral, os valores encontrados para a solubilidade foram considerados de baixo/médio valor (17 a 30%) o que não provocou a desintegração dos mesmos em 24hs. Com o auxílio da superfície de resposta, foi possível encontrar a melhor região para um médio valor de solubilidade sendo aquela utilizando valores acima de 0,007g de $CaCl_2$ e

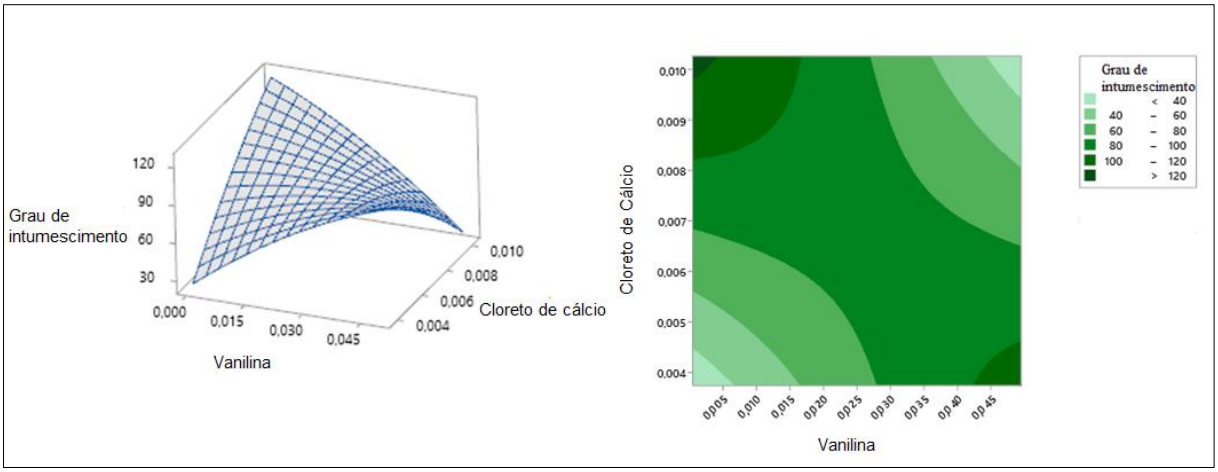
concentrações consideráveis de vanilina, ou seja, maiores do que 0,024g, desencadeando uma solubilidade entre 25 e 30%.

Figura 19: Superfície de resposta para a análise da solubilidade



Na Figura 20 a mesma região foi considerada a ideal em relação ao grau de intumescimento, atribuída aos maiores valores.

Figura 20: Superfície de resposta para a análise de intumescimento



Por mais que a superfície de resposta ajude a identificar visualmente região de ótimo, ela não permite elencar o valor específico de cada parâmetro do processo a fim de alcançar as respostas desejadas. Sendo assim, o pesquisador pode seguir dois caminhos distintos, sendo de tentativa e erro para encontrar os níveis dessas variáveis ou empregos de métodos de otimização mais robustos e precisos para a obtenção de resultados mais adequados (SABIONI, 2018).

5.3 Otimização

Para realizar a otimização do processo por meio da função NBI primeiramente foi necessário definir as especificações desejáveis para as variáveis estudadas (maximizar o grau de intumescimento e minimizar a solubilidade).

Das e Dennis (1998) criaram essa ferramenta com o objetivo de compensar as deficiências atribuídas ao método de somas ponderadas como sua insuficiência em encontrar um espalhamento uniforme de soluções ótimas de Pareto, mesmo se uma propagação uniforme de vetores de peso usava. O surgimento se deu ao fato de não gerar fronteiras com uma uniformidade entre os pontos de Pareto e apresentar restrições em análises quando o conjunto for não convexo, perdendo-se os pontos localizados nas partes côncavas da superfície. Portanto, se a qualidade das soluções de Pareto está relacionada aos pesos, podem-se descobrir novas soluções modelando e otimizando o espaço mapeado pela fronteira de Pareto (NAVES *et al*., 2017). Utilizando o método NBI e variando interativamente os pesos de 0 a 1, obtiveram-se os resultados apresentados na Tabela 8.

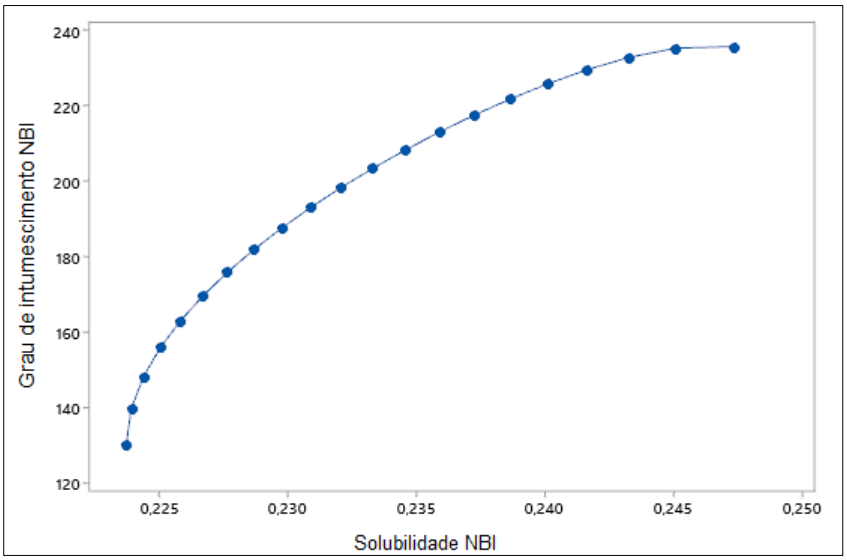
Tabela 8: Resultado da otimização para a solubilidade e para o grau de intumescimento pelo método NBI (**(1)**, **(2)** e **(3)**: pontos avaliados da otimizados)

Solubilidade (%)	Grau de intumescimento (%)	Alginato (g)	Vanilina (g)	Cloreto de cálcio (g)
(1) 22%	**129%**	**1,057**	**0,037**	**0,00859**
22%	139%	1,083	0,0366	0,00852
22%	148%	1,104	0,0362	0,00846
23%	155%	1,124	0,0358	0,0084
23%	162%	1,141	0,0355	0,00833
23%	169%	1,156	0,0351	0,00827
23%	175%	1,171	0,0347	0,00821
23%	181%	1,184	0,0343	0,00814
23%	187%	1,197	0,0339	0,00807
23%	192%	1,209	0,0335	0,008
(2) 23%	**198%**	**1,22**	**0,0331**	**0,00792**
23%	203%	1,231	0,0326	0,00785
23%	208%	1,241	0,0322	0,00777
24%	212%	1,25	0,0317	0,00768
24%	217%	1,26	0,0311	0,00759

24%	221%	1,268	0,0305	0,00749
24%	225%	1,276	0,0298	0,00739
24%	229%	1,283	0,029	0,00727
24%	232%	1,29	0,028	0,00714
(3) 25%	**235%**	**1,295**	**0,0266**	**0,00701**
25%	235%	1,296	0,0243	0,007

Com os pontos ótimos obtidos na Tabela 8 gerou-se o gráfico com a fronteira de Pareto equispaçada, conforme a Figura 21, abordando uma região mais próxima do ponto ótimo.

Figura 21: Fronteira de Pareto obtida pelos pontos da otimização (NBI)



Por meio do conjunto de parâmetros otimizados foi possível configurar o processo da de tal forma que se obtivesse os melhores resultados para as respostas de interesse, dentro das condições de operação do processo estudado. A partir da Figura 21 espera-se uma variação na faixa de solubilidade entre 22,5% e 25% e do grau de intumescimento entre 120% e 240%, quando o processo operar em condições ótimas.

Alguns autores relatam a eficiência do método NBI em seus processos como por exemplo Sabioni (2018) o qual utilizou a técnica para otimização do processo de filagem de queijo mussarela, implicando na padronização do teor de água dos produtos fabricados e no aumento do rendimento do processo, em termos de recuperação de gordura. Naves e colaboradores (2017) apontaram o método NBI como ideal para otimização no tratamento de alaranjado de metila

Por fim, para verificar a consistência e eficiência das condições otimizadas pelo NBI, aplicou-se o teste *One-Sample-T* (MONTGOMERY; RUNGER, 2017). Após a realização de 3 experimentos de validação do método, os quais estão destacados na Tabela 8, obteve-se valores próximos, percebendo que otimização foi efetiva.

5.4 Técnicas de Caracterização

5.4.1 Atividade antimicrobiana

A atividade antimicrobiana contra *E. coli* e *P. aeruginosa* foi avaliada utilizando a formulação dos três filmes validados na Tabela 8, além do filme controle, como também de uma solução de vanilina com cloreto de cálcio e glicerol (VCG), depositada em papel de filtro. O efeito antimicrobiano foi determinado pela medida das zonas formadas ao redor dos filmes incluindo o diâmetro da amostra (5 mm). Os resultados podem ser observados nas Figuras 22 e 23.

Figura 22: a) Atividade antimicrobiana do biofilme **(1)** contra *E. coli.* b) Atividade antimicrobiana do biofilme **(2)** contra *E. coli.* c) Atividade antimicrobiana do biofilme **(3)** contra *E. coli.* d) Crescimento do micro-organismo *E. coli.* e) Atividade antimicrobiana da solução (VCG) contra *E. coli.* f) Atividade antimicrobiana do biofilme controle (sem vanilina) contra *E. coli*

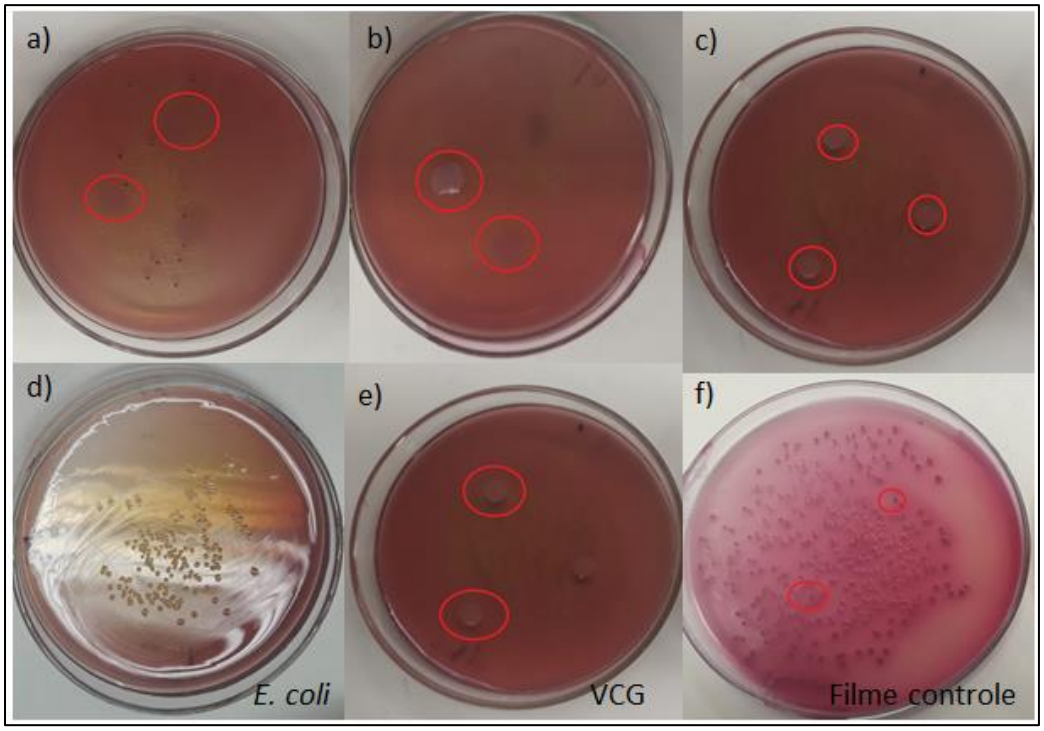
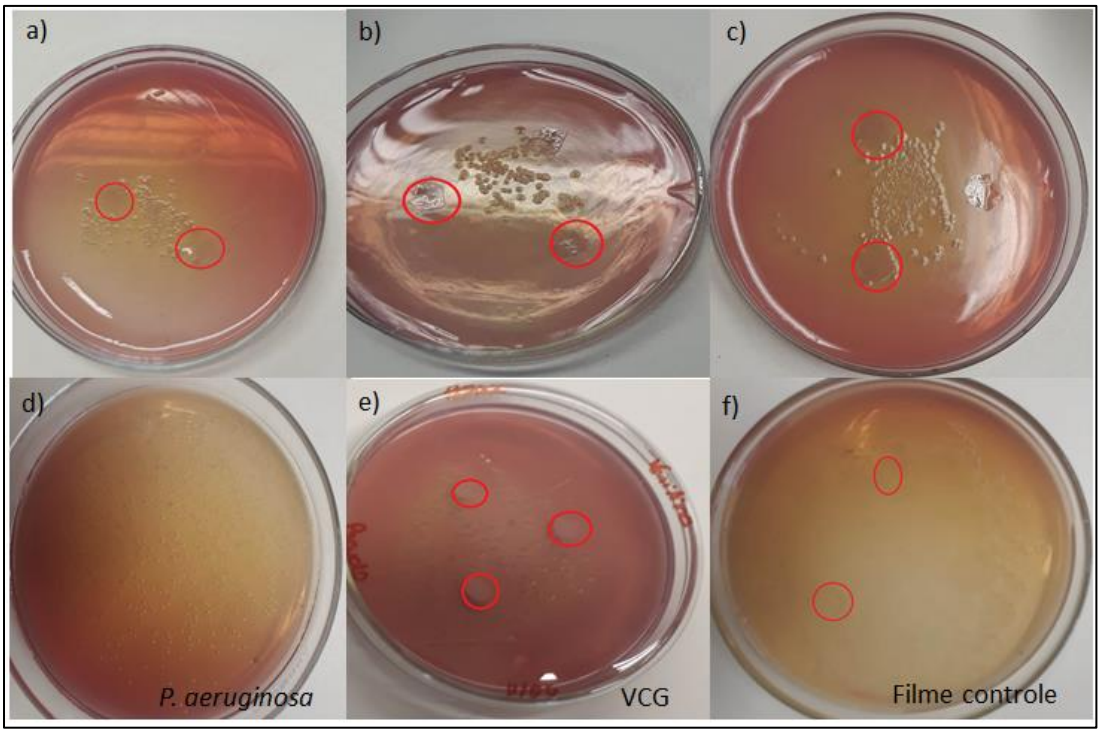


Figura 23: a) Atividade antimicrobiana do biofilme **(1)** contra *P. aeruginosa.* b) Atividade antimicrobiana do biofilme **(2)** contra *P. aeruginosa.* c) Atividade antimicrobiana do biofilme **(3)** contra *P. aeruginosa* d) Crescimento do micro-organismo *P. aeruginosa* e) Atividade antimicrobiana da solução (VCG) contra *P. aeruginosa.* f) Atividade antimicrobiana do biofilme controle (sem vanilina) contra *P. aeruginosa*



Os halos (mm) apresentados na Tabela 9 mostram que todos os biofilmes contendo vanilina promoveram a inibição do crescimento dos dois tipos de bactérias, com valores maiores do que utilizando somente a solução VCG. As bactérias presentes nesse estudo são gram- negativas e essa classe caracteriza-se por apresentar uma parede celular mais complexa, o que as tornam mais resistentes (MOURTZINOS *et al*., 2009; STROESCO *et al*., 2015).

Tabela 9: Resultados encontrados para a zona de inibição (mm) dos biofilmes (**(1)**, **(2)** e **(3)**) e da solução VCG contra as bactérias *E. coli e P.aeruginosa*

Filme	*E. coli*: halo (mm)	*P. aeruginosa*: halo (mm)
(1)	$10,97 \pm 0,16^{d}$	$8,2 \pm 0,14^{a}$
(2)	$10,77 \pm 0,04^{d}$	$8,2 \pm 0,14^{a}$
(3)	$8,6 \pm 0,37^{a}$	$7,33 \pm 0,12^{c}$
Controle	$5,13 \pm 0,05^{b}$	$5,1 \pm 0,08^{b}$

VCG	7,13 ± 0,05[c]	6,13 ± 0,047[e]

[*]Valores com o mesmo sobrescrito indicam que não houve diferença significativa, de acordo com o Teste de Tukey.

Os biofilmes (1) e (2), aqueles com a maior concentração de vanilina, foram os que proporcionaram melhor halo de inibição, mas com respostas diferentes para as bactérias, uma justificava para esse fato poderia ser a maior resistência da *P. aeruginosa* (Novaruckiene *et al*., 2021; Bezerra *et al*., 2017)

Stroescu e colaboradores (2015) desenvolveram biofilmes de quitosana com vanilina e obtiveram resultados próximos aos encontrados contra a *E. coli*, 11mm de halo de inibição, porém utilizando uma amostra com diâmetro de 6mm. Adicionalmente, Kim e colaboradores (2016) relataram a inibição contra este mesmo micro-organismo, na associação entre o ácido caprílico e a vanilina.

Bizerra e colaboradores (2017) avaliaram a atividade antimicrobiana da vanilina com antibióticos contra a *E. coli*, *P. aeruginosa*, em conclusão, a vanilina modulou seletivamente a atividade dos antibióticos contra bactérias multirresistentes.

Estes dados corroboram com os resultados obtidos no presente estudo, os quais demonstraram que a vanilina apresentou atividade significativa quando combinada com outros produtos e os valores de cloreto de cálcio, utilizado como reticulação, não impediram a liberação dessa substância.

O biofilme controle apresentou inibição por contato para as duas bactérias, não ocorrendo à formação do halo, resultados semelhantes foram observados no estudo de Laia (2015) a qual produziu biofilmes e hidrogéis à base de alginato e goma gelana e os mesmos não apresentaram diâmetro de inibição. Rodrigues e colaboradores (2008) também não observaram a formação do halo de inibição em biofilmes de alginato e quitosana.

Os resultados são, portanto satisfatórios, tendo em vista o poder inibitório do biofilme de alginato aditivado com vanilina em relação aos micro-organismos avaliados.

5.4.2 Análises térmicas

Para estabelecer os limites de temperatura em que o polímero pode ser utilizado foram realizados estudos de análises térmicas. O controle desse parâmetro é importante, pois o filme precisa ser termicamente estável no intervalo de temperatura de trabalho, dependendo da aplicação (IWAKI, 2010).

As medidas de termogravimetria e DSC foram realizadas em duas amostras sendo o objetivo a comparação dos resultados entre o filme controle e o acréscimo da vanilina, utilizando o melhor ponto da otimização (Tabela 8).

De acordo com os termogramas, o primeiro estágio de perda de massa ocorreu na região entre 35 e 110 ^{0}C para o filme controle, Figura 24, e 35 e 90 °C, Figura 25, para o filme com vanilina, caracterizando a desidratação da água presente no material, ocorrendo à perda de 20% e 18%, de massa, respectivamente.

Figura 24: Análise termogravimétrica (TGA) e calorimetria exploratória diferencial (DSC): filme controle

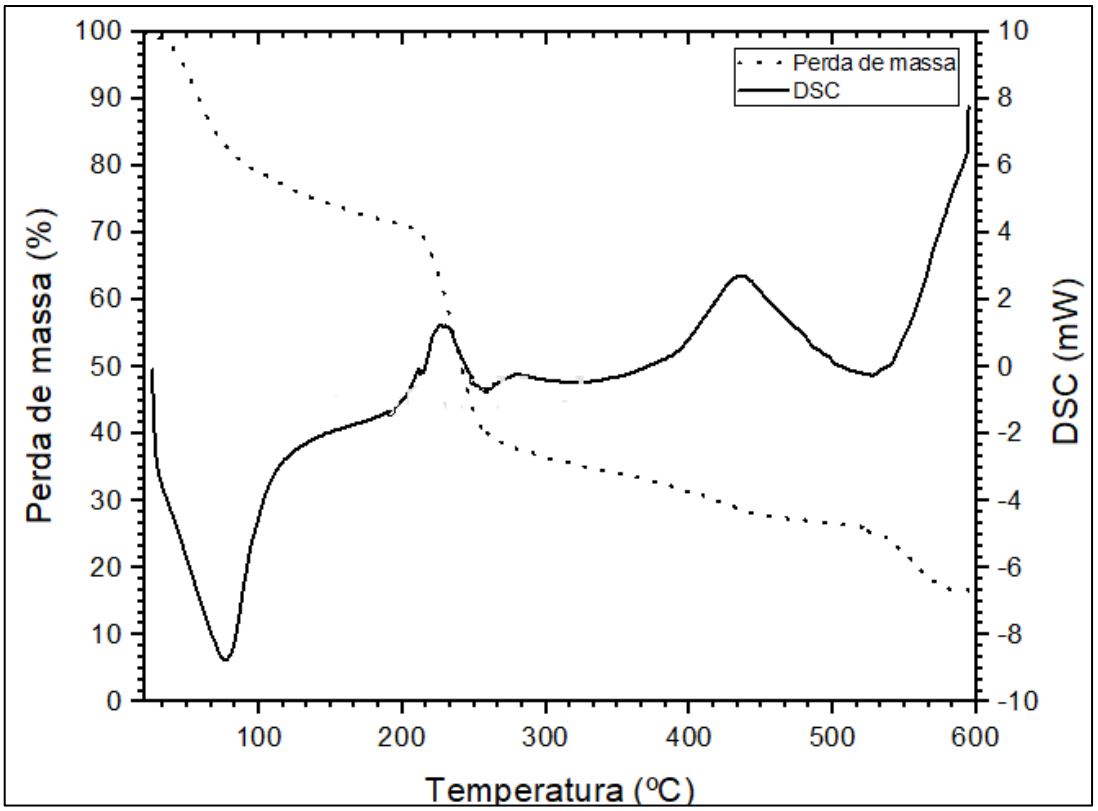
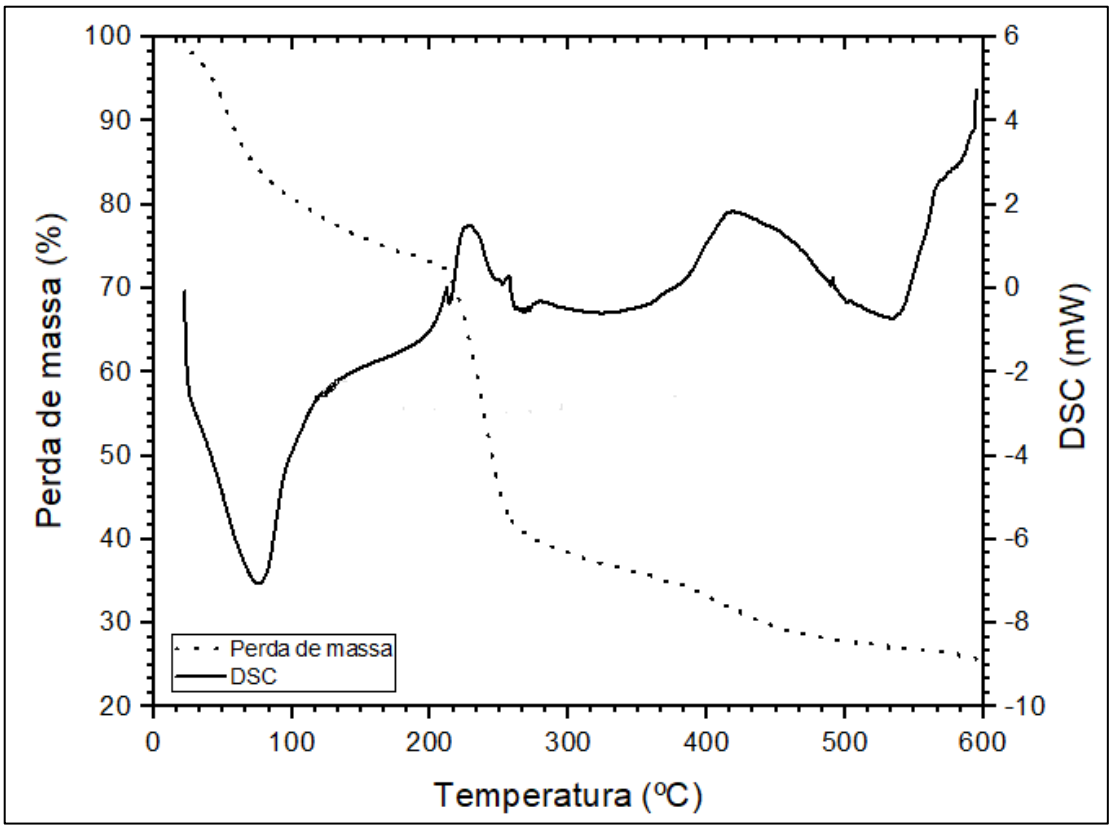


Figura 25: Análise termogravimétrica (TGA) e calorimetria exploratória diferencial (DSC): filme com vanilina (2).



A região de decaimento até, aproximadamente, 210 ^{0}C representa a decomposição do glicerol. Gao e colaboradores (2017) ao produzirem filmes contendo alginato plastificado com glicerol, obtidos por mistura termomecânica, identificaram esse evento em uma temperatura próxima a 218 ^{0}C. É possível de se observar que para essa região, a adição da vanilina promove um aumento na estabilidade dos filmes, diminuindo a perda inicial de massa para 27% quando comparado com o filme controle (32%).

Entre 210 e 260°C há uma perda de massa de 60% devido aos processos de degradação do alginato, sendo os valores encontrados bem próximos para os dois filmes estudados. Segundo Trevisol (2018) nessa faixa de temperatura ocorre a degradação dos anéis sacarídeos, quebra das ligações C-H e das ligações glicosídicas C-O-C da cadeia principal do alginato. Da silva e colaboradores (2015) produziram filmes de alginato e monoetanolamina e de acordo com esse estudo, na faixa de 410°C ocorre à formação de resíduos carbonáceos

(Na_2CO_3). Com o aumento da temperatura promoveu a degradação completa dos filmes (soares *et al* 2004; CANDIDO, 2019).

A análise de DSC mostrou diferentes picos endotérmicos e exotérmicos para os filmes estudados. O primeiro evento endotérmico com pico em 75°C refere-se à evaporação da água, conforme constatado no TGA.

Em torno de 210 º C observa-se um pico endotérmico, o que sugere a decomposição do glicerol. O primeiro evento exotérmico observado no gráfico presente na faixa de temperatura de 215°C a 250 °C, apresentando ápice 225°C no filme controle e 240° C para filme com vanilina, pode estrar associado ao processo de decomposição da amostra (Soares *et al* 2004; Laia, 2015). É possível observar que a presença da vanilina gera um pequeno deslocamento em relação aos eventos quando comparados ao filme controle e, além disso, como a amplitude maior em alguns eventos, isso se justifica pela necessidade de uma maior energia para que esse processo aconteça. Em seguida foi iniciado um segundo evento exotérmico, somente para os filmes com vanilina, correspondendo à oxidação dessa substância. De acordo com Mourtzinos e colaboradores (2009) ao realizar o DSC de uma amostra de vanilina a sua oxidação ocorreu em uma faixa de temperatura 258-273 °C, sendo essa a mesma encontrada nesse estudo.

Um terceiro pico exotérmico, aproximadamente a 420°C foi observado e pode ser atribuída a temperatura de carbonização das amostras. O último evento endotérmico com pico em 550° C ocorre à decomposição da amostra com liberação de CO_2.

Com a finalidade de aplicação desse biofilme como um biocurativo, nota-se que a vanilina apresenta uma estabilidade térmica, ou seja, a mesma não apresentou degradação de suas características na faixa de temperatura ideal, até 50º C, sendo assim, ao ocorrer o aumento da temperatura no corpo humano o biofilme irá perder água e a vanilina continuará a fornecer suas propriedades antioxidante e antimicrobiana.

6. CONCLUSÃO

A metodologia aplicada pelo planejamento experimental permitiu a produção de um filme de alginato dopado com vanilina no intuito de usufruir de suas propriedades antioxidante e antimicrobiana. Os filmes apresentaram boas características quanto à homogeneidade da superfície e transparência. As análises de solubilidade e intumescimento mostraram que o acréscimo da vanilina influenciou somente nos resultados da solubilidade, mas a interação dessa substância com o cloreto de cálcio interferiu nas duas respostas analisadas, podendo encontrar a melhor região para a produção do material com o auxílio da superfície de respostas e a otimização do processo. Ao avaliar os filmes dopados com vanilina ocorreu um aumento no halo de inibição contra os micro-organismos *E. coli e P.aeruginosa*, quando comparado ao filme controle. A análise termogravimétrica apresentou-se em consonância com a análise de calorimetria exploratória diferencial e o perfil demonstrou a estabilidade térmica do material, na faixa de temperatura ideal. Dessa forma, os biofilmes desenvolvidos apresentam características que exprimem seu potencial uso como um biocurativo e baixa toxicidade mediante as matérias – primas empregadas.

7. SUGESTÃO PARA TRABALHOS FUTUROS

Para continuar analisando os resultados obtidos nesse trabalho, como também a sugerida aplicação, seria imprescindível realizar os testes de toxicidade e antioxidante desse biofilme.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICA

ADEKUNLE, K. F. A. Review of vegetable oil-based polymes: Synthesis and applications. Journal of polymer chemistry, v. 2, p. 34-40, 2015.

AGÜERO, L.; ZALDIVAR-SILVA, D.; PEÑA, L.; DIAS, M. L. Alginate microparticles as oral colon drug delivery device: A review. *Carbohydrate Polymers,* v. 168, p. 32–43, 2017.

ALARCON, R. T.; ALMEIDA, M. V.; RINAUDO, D.; BANNACH, G. Synthesis and thermal study of polymers from soybean, sunflower and grapeseed marinated oil. *European journal of lipid science*, v. 119, p. 16-20, 2017.

ALMEIDA, J. F. S. L. Caracterização de hidrogéis para aplicações biomédicas. *Tese de doutorado* - Departamento de Engenharia Química. Faculdade de ciências e tecnologia da universidade de Coimbra, Coimbra, 2010.

ALVES, P. A. Preparação e caracterização de filmes binários de carboximetilcelulose/PVA com vanilina e avaliação da aplicação em alimentos. *Trabalho de conclusão de curso* – Departamento de Engenharia de Alimentos. Universidade Federal do Mato Grosso, Barra do Garças, 2018.

ANURADHA, K.; SHYAMALA, B. N.; NAIDU, M. M. Vanilla-Its science of cultivation, curing, chemistry, and nutraceutical properties. *Critical reviews in food science nutrition*, v. 53, p. 1250-1276, 2013.

BAGNATO, G.; IULIANELLI, A.; SANNA, A.; BASILE, A. Glycerol production and transformation: A critical review with particular emphasis on glycerol reforming reaction for producing hydrogen in conventional and membrane reactors. *Membranes*. v.7, p. 17, 2017.

BARROS, A. M. C. Síntese e caracterização de um polímero biodegradável. *Dissertação de mestrado* - Departamento de Química. Universidade do Moinho, 2011.

BEZERRA, C. F.; CAMILO, C. J.; DO NASCIMENTO SILVA, M. K.; DE FREITAS, T. S. . Vanillin selectively modulates the action of antibiotics against resistant bacteria. *Microbial pathogenesis*, v.113, p. 265-268, 2017.

BIERHALZ, A. C. K.; DA SILVA, M. A.; KIECKBUSCH, T. G. Natormycin release from alginate/pectin films for food packaging application. *Journal of food engineering,* v. 110, p. 18-25, 2012.

BIERHALZ, A. C. K. Confecção e caracterização de biofilmes ativos à base de pectina BTM e de pectina BTM/alginato reticulados com cálcio. *Dissertação de mestrado*- Departamento de Engenharia Química. Universidade Estadual de Campinas, 2010.

BIERHALZ, A. C. K.; MORAES, Â. M. Tuning the properties of alginate-chitosan membranes by varying the viscosity and the proportions of polymers. *Journal of Applied Polymer Science*, v. 133, p. 1–11, 2016.

BOATENG, J.; CATANZANO, O. Advanced therapeutic dressings for effective wound healing. *Journal of pharmaceutical sciences*, v.104, p. 3653-3680, 2015.

BRACCINI, I.; PÉREZ, S. Molecular basis of Ca^{2+}-induced gelation in alginates and pectins: The egg-box model revisited. *Biomacromolecules*, v. 2, p. 1089–1096, 2001.

BRANDÃO FILHO, E. A. Produção de membranas de alginato e mesocarpo de coco babaçu com adição de fibras de sisal e lã de algodão: Estudo de diferentes variáveis- *Trabalho de conclusão de curso*-Departamento de ciências exatas e tecnologia. Universidade Federal do Maranhão, 2019.

BRITO, G. F.; AGRAWAL, P.; ARAÚJO, E. M.; MÉLO, T. J. A. Biopolímeros, polímeros biodegradáveis e polímeros verdes. *Revista de materiais e processos*. v.6.p. 127-139, 2011.

BRONZINO, J.; WONG, J.; PETERSON, D. Biomaterials: principles and Practices. *CRC Press*, 2012.

BRUGUEL, K. A. A. Estudo da liberação controlada de derivados de ácido cinâmico utilizando sistemas baseados em polímeros biodegradáveis/biocompatíveis. *Trabalho de conclusão de curso* – Departamento de Química. Universidade Tecnológica Federal do Paraná, 2015.

BUENO, C. Z. Desenvolvimento e análise das propriedades de membranas de quitosana e alginato contendo polihexametileno biguanida para o tratamento de lesões de pele. *Tese de doutorado* – Departamento de Engenharia Química. Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2015.

BUENO, C. Z.; MORAES, Â. M. Development of porous lamellar chitosan-alginate membranes: Effect of different surfactants on biomaterial properties. *Journal of Applied Polymer Science*, v. 122, p. 624–631, 2011.

CALVÃO, P. S. Obtenção e caracterização de misturas do polímero biodegradável P[3HB-*co*- 3HV] com elastômeros. *Tese de doutorado* – Departamento de Engenharia de Materiais. Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

CAMARGO, L. G. Desenvolvimento de membranas mucoadesivas compostas por diferentes proporções de quitosana e alginato para a liberação controlada do fármaco antineoplásico imiquimode. *Dissertação de mestrado* – Departamento de Engenharia Química. Universidade Estadual de Campinas, 2017.

CAMPOS, C. A.; GERSCHENSON, L. N.; FLORES, S.K. Development of edible films and coaring with antimicrobial actvity. *Food and bioprocess technology*. v.4, p. 849-875, 2011.

CARVALHO, P. F. S. Preparação e caracterização de géis de alginato, quitosana e nanoceluloses para aplicações biomédicas. *Tese de doutorado* - Departamento de Engenharia de materiais. Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2019.

CARULO, M. F. Desenvolvimento e caracterização de biofilmes ativos de alginatos contendo sorbato de potássio, feitos de alginato de cálcio e ácidos graxos. *Dissertação de Mestrado* – Departamento de Engenharia Química. Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2005.

CAZÓN, P.; VELAZQUEZ, G.; VÁZQUEZ, M. Novel composite films from regenerated cellulose-glycerol-polyvinyl alcohol: Mechanical and barrier properties. *Food Hydrocolloids*, v.89, p. 481-491, 2019.

CIANNAMEA, E. M.; CASTILLO, L. A.; BARBOSA, S. E.; DE ANGELIS, M. G. Barrier properties and mechanical strength of bio-renewable, heat-sealable films based on gelatin, glycerol and soybean oil for sustainable food packaging. *Reactive Functional Polymers*, v. 125, p. 29-36, 2018.

CLEMENTI, F.; CRUDELE, M. A.; PARENTE, E.; MANCINI, M.; MORESI, M. Production and characterization of alginate from Azotobacter vinelandii. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, v. 79, p. 602-610, 1999.

CONDE, L. M. S. Polímeros naturais para aplicações biomédicas. *Dissertação de mestrado*- Departamento de Química. Universidade do Minho, 2011.

COSTA, D. M. D. *et al*. Normal boundary intersection method based on principal components and Taguchi signal-to-noise ratio applied to the multiobjective optimization of 12L14 free machining steel turning process. *International Journal of Advanced Manufacturing Technology*, v. 87, p. 825–834, 2016.

DA SILVA, R. d. C.; CAVALHEIRO, É. T. G. Synthesis, characterization, and thermal analysis of alginate and monoethanolamine product. *Journal of Thermal Analysis Calorimetry*, v.120, p. 855-862, 2015.

DAS, I.; DENNIS, J. An Alternate Method For Generating Pareto Optimal Points In Multicriteria Optimization Problems. *Society for Industrial and Applied Mathematics Journal on Optimization*, v. 201, p. 631–657, 1996.

DE OLIVEIRA, J. D. Desenvolvimento biotecnológico de pululana e caracterização físico-química. 2014. *Tese de Doutorado* - Departamento de ciências. Universidade Federal do Rio de Janeiro.

DE SOUZA, J. C. Síntese e caracterização de novos polímeros baseados em poli (arileno éter sulfona) sulfonados reticulados e produção de membrana para aplicação em células a combustível do tipo PEMFC. *Tese de Doutorado*- Departamento de Engenharia Química. Universidade Federal de Minas Gerais, 2016.

DE SOUZA, T. D. C. Análise de curativo de membrana de celulose vegetal incorporada com alginato de sódio na cicatrização de lesões cutâneas. *Dissertação de mestrado*- Departamento de ciência animal. Universidade católica do Paraná, 2019.

DHANALAKSHMI, C.; MANIVASAGAM, T.; NATARAJ, J.; JUSTIN THENMOZHI, A. Neurosupportive role of vanillin, a natural phenolic compound, on rotenone induced neurotoxicity in SH-SY5Y neuroblastoma cells. *Evidence-Based Complementary Alternative Medicine*, 2015.

DICK, M.; COSTA, T. M. H.; GOMAA, A.; SUBIRADE, M. Edible film production from chia seed mucilage: Effect of glycerol concentration on its physicochemical and mechanical properties. *Carbohydrate Polymers*, v.130, p. 198-205, 2015.

DONATI, I.; HOLTAN, S.; MØRCH, Y.; MASSIMILIANO, B.; DENTINI, M; SKJÅKBRÆK, G. New hypothesis on the role of alternating sequences in calcium alginates gels. *Biomacromolecules*, v. 6, p. 1031-1040, 2005.

DRAGET, K. I.; SKJÅK-BRÆK, G.; SMIDSRØD, O. Alginate based new materials. *International journal of biological macromolecules*, v.21, p. 47-55, 1997.

ESCOBAR, R.G. Eugenol: propiedades farmacológicas y toxicológicas. Ventajas y desventajas de su uso. *Revista Cubuna de Estomatogía*. V.39, p. 139-156, 2002.

FARIAS, S. S. DE.; SIQUEIRA, S. M. C.; CRISTIANO, J. H. I.; ROCHA, J. M. Biopolímeros: uma alternativa para promoção do desenvolvimento sustentável. *Revista Geonorte*, v. 7, p. 61-77, 2016.

FARHAN, A.; HANI, N. M. Characterization of edible packaging films based on semi-refined kappa-carrageenan plasticized with glycerol and sorbitol. *Food Hydrocolloids*, v.64, p. 48-58, 2017.

FELDMAND, D. Polymer history. *Designed manomers and polymes*, v. 11, p. 1-15, 2008.

FERREIRA, G. M. Estudo das propriedades reológicas do sistema polpa de cupuaçu – biopolímeros. *Tese de Doutorado* - Departamento de processos químicos e bioquímicos. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2008.

FIDÉLES, T. B. Filmes reticulados de quitosana para aplicação como biomaterial. *Dissertação de mestrado* – Departamento de Ciência e Engenharia de materiais. Universidade Federal de Campina Grande, 2010.

FITZGERALD, D. J.; STRATFORD, M.; GASSON, M. J.; UECKERT, J.; BOS, A.;NARBAD, A. Mode of antimicrobial action of vanillin against *Escherichia coli, Lactobacillus plantarum and Listeria innocua. Journal of Applied Microbiology, v. 97*, p. 104–113, 2004.

FITZGERALD, D. J.; STRATFORD, M.; GASSON, M. J.; NARBAD, A. The potential application of vanillin in preventing yeast spoilage of soft drinks and fruit juices. *Journal of food protection*, v.67, p. 391-395, 2004.

FREITAS, E. D. d. Desenvolvimento de partículas a partir da blenda de sericina e alginato para incorporação e liberação modificada de anti-inflamatórios cetoprofeno e

naproxeno. *Tese de Doutorado*- Departamento de Engenharia Química. Universidade Estadual de Campinas, 2020.

GALDÁMEZ, E. V. C. Aplicação das técnicas de planejamento e análise de experimentos na melhoria da qualidade de um processo de fabricação de produtos plásticos. *Dissertação de mestrado*- Departamento de Engenharia de produção. Universidade de São Paulo, São Carlos, 2002.

GALLER, K. M.; D'SOUZA, R.; HARTGERINK, J.; SCHMALZ, G. Scaffolds for dental pulp tissue engineering. *Advances in Dental Research*, v.23, p. 333-339, 2011.

GEORGE, M.; ABRAHAM, T. E. Polyionic hydrocolloids for the intestinal delivery of protein drugs: alginate and chitosan—a review. *Journal of controlled release*, v.114, p. 1-14, 2006.

GOH, C. H.; HENG, P. W. S.; CHAN, L. W. Alginates as a useful natural polymer for microencapsulation and therapeutic applications. *Carbohydrate Polymers*, v. 88, p. 1–12, 2012.

GOMES, D. N. Desenvolvimento e caracterização de filmes de alginato incorporados com extratos de *Anadenanthera colubrina* (vell.) brenan visando o desenvolvimento de substituto de pele. *Dissertação de mestrado* – Departamento de Biomedicina. Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2016.

GOMEZ, E. J.; LOPEZ, D. C.; HERNANDEZ, M. P.; CATALA, R.; |GAVARA, R. Advances in antioxidant active food packaging. *Trends in Food Science & Technology*, v. 35, p. 42-51, 2014.

GOMBOTZ, W. R.; WEE, S. Protein release from alginate matrices. *Advanced drug delivery reviews*, v. 31, n. 3, p. 267-285, 2008.

GONÇALVES, S. M.; DOS SANTOS, D. C.; MOTTA, J. F. G.; DOS SANTOS, R. R. Structure and functional properties of cellulose acetate films incorporated with glycerol. *Carbohydrate polymers*, v.209, p. 190-197, 2019.

GUASTALDI, A. C.; APARECIDA, A. H. Fosfatos de cálcio de interesse biológico: importância como biomateriais, propriedades e métodos de obtenção de recobrimentos. *Química Nova*, v. 33, p.7, 2010.

HARVEY, R.; FERRIER, D. Bioquimica ilustrada Artmed. *Porto Alegre*, 2012.

HOFFMAN, A. S. Hydrogels for biomedicinal application. *Advanced drug delivery reviews*. v. 43.p. 3-12, 2002.

IWAKI, Y. O. Eletrólitos sólidos poliméricos a base de alginato de sódio. *Dissertação de mestrado* – Departamento de ciência e engenharia de materiais. Universidade de São Paulo, 2010.

JUNIOR, A. F. A. Síntese e caracterização de biofilmes a base de alginato de sódio reticulado com poliacrilamina catiônica. *Dissertação de Mestrado* – Departamento de Química. Universidade Federal do Maranhão, São Luís, 2017.

KALE, G. *et al*. Compostability of bioplastic packaging materials: An overview. *Macromolecular Bioscience*, v. 7, p. 255–277, 2007.

KHOTIMCHENKO, Y. S.; KOVALEV, V.; SAVCHENKO, O.; ZIGANSHINA, O. Physical–chemical properties, physiological activity, and usage of alginates, the polysaccharides of brown algae. *Russian Journal of Marine Biology*, 27, n. 1, p. S53-S64, 2001.

KNAPP, M. A. Caracterização de filmes biodegradáveis de amido com extrato de erva mate. *Trabalho de conclusão de curso* – Departamento de Engenharia de alimentos. Universidade Federal da Fronteira Sul, Laranjeiras do Sul, 2017.

KNILL, C.; KENNEDY, J.; MISTRY, J.; MIRAFTAB, M. et al. Alginate fibres modified with unhydrolysed and hydrolysed chitosans for wound dressings. C*arbohydrate Polymers*, v.55, p. 65-76, 2004.

KUMAR, N.; GOEL, N. Phenolic acids: Natural versatile molecules with promising therapeutic applications. *Biotechnology Reports*, v.24, 2019.

KUMAR, R.; SHARMA, P. K.; MISHRA, P. S. A Review on the Vanillin derivatives showingvarious Biological activities. *International Journal of PharmTech Research*, v.4, p 266-279, 2012.

LANDUCI, M. C. Caracterização das propriedades mecânicas de biomateriais metálicos. *Dissertação de Mestrado* - Departamento de Engenharia Mecânica. Universidade Estadual Paulista, São Paulo, 2016.

LAROTONDA, F. D. S. Desenvolvimento de biofilmes a partir de fécula de mandioca. Dissertação de mestrado – Departamento de Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, 2002.

LAURIENZO, P. Marine polysaccharides in pharmaceutical applications: an overview. *Marine drugs*, v 8, 2435-2465, 2010.

LEE, K. M.; ABDULHAMID, S. B.; LAI, C. W. Multivariate analysis of photocatalytic-mineralization of Eriochrome Black T dye using ZnO catalyst and UV irradiation. *Materials Science in Semiconductor Processing*, v. 39, p. 40–48, 2015.

LEE, K. Y.; MOONEY, D. J. Alginate: properties and biomedical applications. *Progressin Polymer Science*. v. 37, p. 106-126, 2012.

LEONARD, M.; DE BOISSESON, M. R.; HUBERT, P.; DALENCON, F. Hydrophobically modified alginate hydrogels as protein carriers with specific controlled release properties. *Journal of controlled release*, v. 98, n, p. 395-405, 2004.

LICCIARDELLO, F.; WITTENAUER, J.; SAENGERLAUB, S.; REINELT, M.; STRAMM, C. Rapid assessment of the effectiveness of antioxidant active packaging— Study with grape pomace and olive leaf extracts . *Food Packaging and Shelf Life*, v. 6, p. 16, 2015.

LIN, H. R.; YEH, Y. J. Porous alginate/hydroxyapatite composite scaffolds for bone tissue engineering: preparation, characterization, and in vitro studies. *Journal of Biomedical Materials Research*, v.71, p. 52-65, 2004.

LINS, L. O. Filmes bioativos a base de alginato aditivados com *mix* de farinhas do resíduo industrial de abacaxi, acerola e goiaba. *Dissertação de mestrado* – Departamento de Ciências Domésticas. Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2018.

LU, H.-T.; LU, T.-W.; CHEN, C.-H.; MI, F.-L. Development of genipin-crosslinked and fucoidan-adsorbed nano-hydroxyapatite/hydroxypropyl chitosan composite scaffolds for bone tissue engineering. *International journal of biological macromolecules*, v.128, p. 973-984, 2019.

LOPES, C. M.; LOBO, J. M. S.; COSTA, P. Formas farmacêuticas de liberação modificada: polímero hidrofílico. *Revista brasileira ciência farmacêutica*. v.41.p.143-154, 2005.

LOPES, L. G. D. Fronteiras Equiespaçadas de Pareto para Funções Objetivo Correlacionadas. *Tese de Doutorado* – Departamento de Engenharia de Produção, Universidade Federal de Itajubá. Itajubá, 2015.

LÓPEZ, D. C.; GÓMEZ, E. J.; CATALÁ, R.; GAVARA, R.; HERNÁNDEZ, M. P. Active antioxidant packaging films: Development and effect on lipid stability of brined sardines. *Food Chemistry*, v.131, p. 1376-1384, 2012.

MACHADO, A. M. d. O.; GALES, A. C. Interpretação de dados microbiológicos. In: *Uso racional de antimicrobianos para prescritores*, p. 1-23, 2008.

MAIZURA, M.; FAZILAH, A.; NORZIAH, M.H.; KARIM, A.A. Antibacterial activity and mechanical properties of partially hydrolyzed sago-starchalginate edible film containing lemongrass oil. *Food Science*,v.72, 2007.

MANDELBAUM, S. H.; DISANTIS, E. O.; MANDELBAUM, M. H. S. Cicatrização: conceitos atuais e recursos auxiliares. *Anais brasileiros de dermatologia*. v.78.p393-410, 2003.

MANCINI, M.; MORESI, M.; RANCINI, R. Mechanical properties of alginate gels: empirical characterization. *Journal of food engineering*. v. 39, p. 369-378, 1999.

MANO, E. B.; MENDES, L .C. Introdução a polímeros. 2. Ed. São Paulo: Editora Blucher; 1999.

MARIN, L.; STOICA, I.;MARES, M.; DINU, V.; BOGDAN, C. S.; BARBOIU, M. Antifungal vanillin imino-chitosan biodynameric films. *Journal of Materials Chemistry B, v. 1*, p. 3353–3358, 2013.

MARTELLI, F.; NUNES, F. M. F. Radicais livres: em busca do equilíbrio. *Ciência e Cultura*, v. 66, p. 54-57, 2014.

MCHUGH, T.H.; KROCHTA, J.M. Sorbitol vs. glycerol-plasticized whey protein edible films: integrated oxygen permeability and tensile property evaluation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 42, p. 841 - 845, 2010.

MEDEIROS, W. M. T. Complexo de vanilina e derivados: Síntese, caracterização e estudo biológico. *Tese de doutorado* - Departamento de Engenharia Química. Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2018.

MELO, P. S.; BERGAMASCHI, K. B.; TIVENON, A. P.; MASSARIOLI, A. P.; OLDONI, T. L. C.; ZANUS, M. C.; PEREIRA, G. E.; ALENCAR, S. M. Composição fenólica e antioxidante de resíduos agroindustriais. *Ciência Rural*. v.41, p.1088-1093, 2011.

MILAGRES, K. A. Avaliação do processo de tratamento de petróleo/água por meio dos métodos de otimização Desirability e NBI para a construção de fronteira de Pareto em regiões não convexas. *Dissertação de Mestrado* – Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal de São João Del Rei, Ouro Branco, 2018.

MOGOSANU, G. D.; GRUMEZESCU, A. M. Natural and syntheic polymers for wounds and burns dressing. *Internatonal journal of pharmaceutics*, v.463, p. 127-136, 2014.

MONTEIRO, R. T.; VIEIRA, R. S. Produção e caracterização de filmes de bicamada de alginato para liberação controlada de sinvastatina. 2019.

MONTGOMERY, D. C. Design and analysis of experiments. 6. ed. LTC, Arizona, 2017.

MONTGOMERY, D. C.; RUNGER, G. C. Estatística aplicada e probabilidade para engenheiros. 2ª ed. Rio de Janeiro, 2003.

MOTTA, C. Incorporação do antioxidante natural α- Tocofenol em filmes de carboximetilcelulose. *Dissertação de Mestrado* - Departamento de Química. Universidade Federal da Fronteira Sul, Laranjeiras do Sul, 2017.

MOURTZINOS, I.; KONTELES, S.; KALOGEROPOULOS, N.; KARATHANOS, V. T. Thermal oxidation of vanillin affects its antioxidant and antimicrobial properties. *Food Chemistry*, v.114, p. 791-797, 2009.

NAVES, F. L.; PAULA, T. I.; BALESTRASSI, P. P.; BRAGA, W. L. M.; SAWHNEY, R. S.; PAIVA, A. P. Multivariate Normal Boundary Intersection based on rotated factor scores: A multiobjective optimization method for methyl orange treatment. *Journal of Cleaner Production*, v. 143, p. 413–439, 2017.

NELSON, D. L.; COX, M. M. Princípios de Bioquímica de Lehninger-7. Artmed Editora, 2018.

NERY, J. C. Obtenção e caracterização de filmes contendo alginato de sódio e quitosana para potencial aplicação no tratamento de lesões cutâneas. *Dissertação de Mestrado* - Departamento de Engenharia de Materiais. Centro Federal de Educação Tecnológica de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2014.

NESIC, A. R.; SESLIJA, S. I. The influence of nanofillers on physical–chemical properties of polysaccharide-based film intended for food packaging. In: *Food packaging: Elsevier*, v.2. p. 637-697.2017.

NETO, B. B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. Como Fazer Experimentos: Pesquisa e Desenvolvimento na Ciência e na Indústria. Bookman, 2010.

NOGUEIRA, G. F. Incorporação de polpa de amora como antioxidante em filmes comestíveis e biodegradáveis de amido de araruta. *Tese de doutorado* – Departamento de Engenharia Agrícola. Universidade Estadual de Campinas, Campina, 2018.

NORAJIT, K; KIM, K. M; RUY, G. H. Comparative studies on the characterization and antioxidant properties of biodegradable alginate films containing ginseng extract. *Journal of food Engineering*. V. 98, P. 377-384, 2010.

OLIVEIRA, L. G. Fundamentos da metodologia de superfície de resposta e suas aplicações em manufatura avançada: uma análise crítica. *Dissertação de mestrado*- Departamento de qualidade e produto. Universidade Federal de Itajubá, Itajubá, 2018.

PACHECO, L. R. E. Obtenção e caracterização de uma matriz polimérica a base de alginato com diferentes agentes reticulantes. *Dissertação de mestrado* - Departamento de ciência dos materiais. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes, 2016.

PACHECO, S. M. V.; DAMASIO, F. Vanilina: Origem, Propriedades e Produção. *Química nova na escola*, v.32, 2010.

PAIVA, A. P.; FERREIRA, J. R.; BALESTRASSI, P. P. A multivariate hybrid approach applied to AISI 52100 hardened steel turning optimization. *Journal of Materials Processing Technology*, v. 189, p. 26–35, 2007.

PAIXÃO, K.; ABREU, E.; LAMAS SAMANAMUD, G. R.; BOSCARO FRANÇA, A.; ALMEIDA LOURES, C. C.; PRADO BASTON, E.; LIMA REZENDE NAVES, L.; CANELLAS BOSCH, J.; NAVES, F. L. Normal boundary intersection applied in the scale-up for the treatment process of Eriochrome Black T through the UV/TiO2/O3 system. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, v. 7, p. 102801, 2019.

PAVLATH, A. E., ROBERTSON, G. H. Biodegradable polymers vs. recycling: what are the possibilities. *Critical Reviews in analytical Chemistry*, v. 29, p.231-241, 1999.

PATEL, N.; GOHIL, P. A review on biomaterials: scope, applications and human anatomy significance. *International Jornal of Emerging Technology and Advanced Enginnering*, v.2, p. 91-101, 2012.

PAVLATH, A. E.; ROBERTSON, G. H. Biodegradable polymers vs. recycling: What are the possibilities. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, v.29, p. 231-241, 1999.

PAWAR, S. N.; EDGAR, K. J. Alginate derivatization: A review of chemistry, properties and applications. *Biomaterials*, v. 33, p. 3279–3305, 2012.

PETERSON, D. R.; BRONZINO, J. D. *Biomechanics: Principles and practices*. CRC Press, 2014.

PINHEIRO, L. S.; BORGES, E. L.; DONOSO, M. T. V. Uso de hidrocolóide e alginato de cálcio no tratamento de lesões cutâneas. *Revista Brasileira de Enfermagem*, v 66, p. 760-770, 2011.

PIRES, O. A. B. Síntese e caracterização de um polímero a partir de glicerol e óleo de macadâmia. *Dissertação de mestrado* – Departamento de Ciência e Tecnologia dos materiais. Universidade Estadual Paulista, Bauru, 2018.

PIRES, A. L. R. Desenvolvimento de curativos flexíveis e neutralizados de quitosana e alginato contendo alphasan® Rc2000. *Dissertação de mestrado* – Departamento de Engenharia Química. Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2013.

PIRES, A. L. R. Desenvolvimento de dispositivos flexíveis densos e porosos visando à liberação controlada de compostos bioativos extraídos de plantas para potencial aplicação em lesões de pele. *Tese de doutorado*. Departamento de Engenharia Química. Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2017.

PIRES, V. G. A. Incorporação de nanoemulsões de óleos essenciais de malaleuca, copaíba e limão em filmes de alginato de sódio para utilização como curativo. *Dissertação de mestrado* - Departamento de Ciência dos materiais. Universidade Estadual paulista, Ilha Solteira, 2016.

PIRES, G. Biomateriais derivados de quitosana e hidroxiapatita com potencial para preenchimento ósseo. *Tese de doutorado* - Departamento de bioquímica. Universidade estadual de campinas, Campinas, 2010.

PIRES, A. L. R.; MORAES, Â. M. Improvement of the mechanical properties of chitosan-alginate wound dressings containing silver through the addition of a biocompatible silicone rubber. *Journal of Applied Polymer Science*, v. 132, p. 1–9, 2015.

PIRES, A. L. R.; BIERHALZ, A. C. K.; MORAES, Â. M. Biomateriais: tipos, aplicações e mercado. *Química nova*, v. 38, p. 957-971, 2015.

PRIYADARSHI, R.; KUMAR, B.; NEGI, Y. S. Chitosan film incorporated with citric acid and glycerol as an active packaging material for extension of green chilli shelf life. *Carbohydrate polymers*, v.195, p. 329-338, 2018.

QUINTÃO, C. M. F. Estudo de misturas poliméricas formadas por PEBD e plásticos biodegradáveis com o óleo e o polímero de moringa oleífera. *Tese de doutorado*- Departamento de Engenharia de Materiais. Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2017.

RAMOS, M.; JIMÉNEZ, A.;PELTZER, M.; GARRIGÓS, M. C. Development of novel nano-biocomposite antioxidant films based on poly (lactic acid) and thymol for active packaging. *Food Chemistry*, v. 162, p. 149-155, 2014.

RATNER, B. D.; HOFFMAN, A. S.; SHOEN, F. J. Biomaterials science - An introduction to materials in medicine. Elsevier. Oxford, 2013.

RINAUDO, M., Review: Main properties and current applications of some polysaccharides as biomaterials, *Polymer International*, v. 57, p. 397-430, 2008.

RHIM, J. W. Physical and mechanical properties of water resistant sodium alginate films. LWT – *Food Science and Technology*, v. 37, p. 323-330, 2004.

RODRIGUES, A. P. Preparação e caracterização de membranas de quitosana e alginato para aplicação em terapia de lesões. *Tese de doutorado*- Departamento de Engenharia química, Universidade estadual de Campinas, 2008.

ROGER, D.; TALBOT, D.; BEE, A. Preparation and effect of Ca^{2+} on water solubility, particle release and swelling properties of magnetic alginate films. *Journal of Magnetismand Magnetic Materials*, v. 305, p. 221-227, 2006.

ROZATTO, M. R. Determinação da atividade antimicrobiana in vitro de extratos, frações e compostos isolados de *Arrabidaea brachypoda*. *Dissertação de Mestrado* - Departamento de Ciências Farmacêuticas. Universidade Estadual Paulista, São Paulo, 2012.

RUSSO, R.; MALINCONICO, M.; SANTAGATA, G. Effect of cross-linking with calcium ions on the physical properties of alginates films. *Biomacromolecules*, v.8, p. 3193-3197, 2007.

SACCHETIN, P. S. C.; MORAES, A. M.; LEAL, C. A. G.; FIGUEREDO, H. C. P. Produção de micropartículas de alginato contendo *Flavobacterium Columnare* inativada pelo método da emulsão para vacinação de peixes por via oral. *Revista Química nova*, v. 33, p. 45- 54, 2010.

SABIONI, R. C. Otimização de um Processo Industrial de Filagem: uma Comparação entre Métodos Multiobjetivo. Dissertação de mestrado- Departamento de Engenharia de produção. Universidade Federal de Itajubá, Itajubá, 2018.

SAHOO, P.; PRATAP, A.; BANDYOPADHYAY, A. Modeling and optimization of surface roughness and tool vibration in CNC turning of Aluminum alloy using hybrid RSM-WPCA methodology. *International Journal of Industrial Engineering Computations*, v. 8, p. 385–398, 2017.

SALEM, D. M. S. A. Synthesis of compounds having antimicrobial activity from alginate. *Bioorganic Chemistry*. v. 87, p. 103-111, 2019.

SANGSUWANA, J.; RATTANAPANONEB, N.; RACHTANAPUN, P. Effect of chitosan/methyl cellulose films on microbial and quality

characteristics of fresh-cut cantaloupe and pineapple. *Postharvest Biology and Technology*, v. 29, p. 403-410, 2008.

SALEM, D. M.; SALLAM, M. A.; YOUSSEF, T. N. Synthesis of compounds having antimicrobial activity from alginate. *Bioorganic chemistry*, v.87, p. 103-111, 2019.

SANTANA, A.; KIECKBUSCH, T. Physical evaluation of biodegradable films of calcium alginate plasticized with polyols. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, v.30, p. 835-845, 2013.

SANTANA, A. A. Influência de caracteristicas físicas e químicas de plastificantes na confecção e no comportamento estrutural e higroscopico de filmes de alginato de calcio. *Dissertação de mestrado*- Departamento de Engenharia Química. Universidade Estadual de Campinas, 2010.

SANTOS, S. F. Análise de filmes poliméricos densos por técnicas de DSC, DMA, XPS, ângulo de contato e AFM. *Dissertação de Mestrado* - Departamento de Física. Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2005.

SANTOS, A. E. D. Desenvolvimento de parafuso de interferência bioabsorvível para cirurgia de joelho em pldl (poli ácido lático) e compósito pldl + btcp (beta trifosfato de cálcio). *Dissertação de mestrado* - Departamento de Engenharia Química. Universidade Estadual Paulista, Bauru, 2015.

SARTORI, C.; FINCH, D.S.; RALPH, B.; GILDING, K. Determination of the cation content of alginate thin films by FTIR, spectroscopy. *Polymer*, v. 38, p. 43-51, 1997.

SHAYKHI, Z. M.; ZINATIZADEH, A. A. L. Statistical modeling of photocatalytic degradation of synthetic amoxicillin wastewater (SAW) in an immobilized TiO2 photocatalytic reactor using response surface methodology (RSM). *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, v. 44, p. 1717–1726, 2014.

SHIRANE, H. Y.; ODA, D. Y.; PINHEIRO, T. C.; CUNHA, M. R. Implantes de biomateriais em falha óssea produzida na fíbula de ratos. *Revista brasileira de ortopedia.* V.45.p.10-12, 2010.

SILVA, S. H. T. Confecção e caracterização físico - química e da atividade antimicrobiana de filmes nanocompósitos a base de alginato contendo nanopartículas de ZnO. *Dissertação de mestrado*- Departamento de Química. Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2017.

SILVA, S. L.; NASCIMENTO, A. A.; RIBEIRO, E. F. B.; RIBEIRO, R. B.; ALVES, C. M.; SANTOS, A. M.; BURMANN, A. P. R. Avaliação da toxicidade aguda pré-clínica do extrato metabólico das cascas do caule de *Parahancornia Amapa* (Apocynaceae). Acta Amazônica. v.46, p. 73-80, 2016.

SILVEIRA, L. M. S. *et al*. Metodologias de atividade antimicrobiana apliacadas a extrato de plantas: comparação entre duas técnicas de difusão. *Revista Brasileira de Farmácia, Maranhão*, v. 90, p. 124-128, 2009.

SIMAB, M.; JAVADI, M. S.; NEZHAD, A. E. Multi-objective programming of pumped-hydro-thermal scheduling problem using normal boundary intersection and VIKOR. *Energy*, 143, p. 854-866, 2018.

SOARES, J. P.; SANTOS, J. E.; CHIERICE, G. O.; CAVALHEIRO, E. T. G. Thermal behavior of alginic acid and its sodium salt. *Eclética Química*, v. 29, p.57-64, 2004.

SOUZA, J. C. Síntese e caracterização de novos polímeros baseados em poli (arileno éter sulfona) sulfonados reticulados e produção de membrana para aplicação em células a combustível do tipo PEMFC. *Tese de doutorado* – Departamento de Engenharia Química. Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2016.

SRIAMORNSAK, P.; KENNEDY, R. A. Swelling and diffusion studies of calcium polysaccharide gels intended for film coating. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 358, p. 205-213, 2008.

SUKRITI *et al*. Sequestration of dyes from artificially prepared textile effluent using RSM - CCD optimized hybrid backbone based adsorbent-kinetic and equilibrium studies. *Journal of Environmental Management*, v. 190, p. 176–187, 2017.

STROESCU, M.; STOICA-GUZUN, A.; ISOPENCU, G.; JINGA, S. I. Chitosan-vanillin composites with antimicrobial properties. *Food Hydrocolloids*, v.48, p. 62-71, 2015.

SULZBACH, A. C.; BRAIBANTE, M. E. F.; STORGATTO, G. A. A bioquímica do glúten através de oficinas temáticas. *Ciência e Natura*, v.37, p. 767-776, 2015.

SWAPNIL *et al*. Microbial degradation of plastics: a review. Journal of biochemistry and technology, v. 6, p. 952–961, 2015.

TAN, H.; AZIZ, A. A.; AROUA, M. Glycerol production and its applications as a raw material: A review. *Renewable sustainable energy reviews*, v.27, p. 118-127, 2013.

THIRÉ, R. M. S. M. Obtenção e caracterização de filmes biodegradáveis a base de amido de milho com reduzida sensibilidade a água. *Tese de doutorado* - Departamento de Engenharia metalúrgica e de materiais. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2003.

TREVISOL, T. C. Filmes em mono e bicamada de alginato e carboximetilcelulose com liberação controlada de diclofenaco de sódio. *Dissertação de mestrado* – Departamento de Engenharia Química. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2018.

TURBIANI, F. R. B. Desenvolvimento e caracterização de filmes ativos de alginato de sódio reticulados com benzoato de cálcio. *Dissertação de mestrado*- Departamento de Engenharia Química. Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2007.

VASCONCELOS, M. O. P. F. Filmes bioativos de quitosana, alginato e suas blendas aditivas com nanoZnO: produção e caracterização. *Dissertação de mestrado* - Departamento de ciências domésticas. Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2016.

VASCONCELOS, M. S. Obtenção de Vanilina por via microbiana. *Tese de doutorado* - Departamento de química. Universidade Federal do Paraná, Curitiba 2014.

VIDAL, I. F. S. Sensor colorimétrico com antocianinas aplicado a embalagens inteligentes para detecção do estado de conservação de carnes suínas via alteração do pH. Dissertação de mestrado – Departamento de Engenharia Química. Universidade Federal de São João del – rei, Ouro Branco, 2021.

WALTON, N.; MAUER, M. J.; NARBAD, A. Molecules of interest vanillin. *Phytochemistry*, v. 63, p. 505-515, 2003.

WERKEMA, M. C. C.; AGUIAR, S. Planejamento e análise de experimentos: como identificar as principais variáveis influentes em um processo. Fundação C ed. Belo Horizonte.

WORANUCH, S.; YOKSAN, R.; AKASHI, M. Ferulic acid-coupled chitosan: Thermal stability and utilization as antioxidant for biodegradable active packaging film Sarekha. *Carbohydrate Polymers*, v. 115, p. 744-751, 2015.

XU, J. B.; BARTLEY, J. P.; JOHNSON, R. A. Preparation and characterization of alinate-carraggenan hydroel films crosslinked using a water- solube carbodiimide (WSC) *journal of membrane science*, v. 28, p. 131-146. 2003.

YANG, H., LEE, J., WON, M., CANÇÃO, K. B. Atividades antioxidantes do destilador grãos secos com solúveis como filmes de proteínas que contêm extratos de chá e sua aplicação na embalagem de carne suína. *Química Alimentar*, v. 196, p. 174-179, 2016.

YANG, J. S. Research progress on Chemical modification of alginate: A review. *Carbohydrate Polymes*, v. 84, p. 33-39, 2011.

YANG, J. S.; XIE, Y. J.; HE, W. Research progress on chemical modification of alginate: A review. *Carbohydrate Polymers*, v. 84, p. 33–39, 2011.

ZACTITI, E.; KIECKBUSCH, T. Potassium sorbate permeability in biodegradable alginate films: Effect of the antimicrobial agent concentration and crosslinking degree. *Journal of Food Engineering*, v.77, p. 462-467, 2006.

ZAHEDI, P.; REZAEIAN, I.; RANAEISIADAT, S. O.; JAFARI, S. H. A review on wound dressings with an emphasis on electrospun nanofibrous polymeric bandages. *Polymers for Advanced Technologies*, v.21, p. 77-95, 2010.