



UNIVERSIDADE DE ARARAQUARA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA EM MEDICINA
REGENERATIVA E QUÍMICA MEDICINAL

MARCO ANTONIO DA COSTA BORGES

FILMES BIOPOLIMÉRICOS BASEADOS EM *ALLIUM CEPA* VISANDO
APLICAÇÕES BIOMÉDICAS

Araraquara
2023

MARCO ANTONIO DA COSTA BORGES

**FILMES BIOPOLIMÉRICOS BASEADOS EM *ALLIUM CEPA* VISANDO
APLICAÇÕES BIOMÉDICAS**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia em Medicina Regenerativa e Química Medicinal da Universidade de Araraquara – UNIARA – como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Biotecnologia, Área de Concentração: Biotecnologia em Medicina Regenerativa e Química Medicinal.

Orientador: Prof. Dr: Hernane da Silva Barud

Coorientador: Dr: Diógenes dos Santos Dias

Araraquara, SP

2023

FICHA CATALOGRÁFICA

B733f Borges, Marco Antonio da Costa
Filmes biopoliméricos baseados em Allium cepa visando aplicações biomédicas/Marco Antonio da Costa Borges. – Araraquara: Universidade de Araraquara, 2023.
120f.

Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia em Medicina Regenerativa e Química medicinal – UNIARA

Área de Concentração : Biotecnologia em Medicina Regenerativa e Química Medicinal

Orientador: Prof. Dr. Hernane da Silva Barud
Co-Orientador: Prof. Dr. Diógenes dos Santos Dias

1. Biopolímeros. 2. Biomateriais. 3. Allium Cepa. I. Título.

CDU 577.4

MARCO ANTONIO DA COSTA BORGES

Tese apresentada a Universidade de Araraquara UNIARA, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Biotecnologia em Medicina Regenerativa e Química Medicinal.

Araraquara, 28 de fevereiro de 2023.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. HERNANE DA SILVA BARUD (Orientador) Universidade de Araraquara - UNIARA

Prof^aDr^a SANDRA ANDREA CRUZ
Departamento de Química de São Carlos/UFSCar

Documento assinado digitalmente
SANDRA ANDREA CRUZ
Data: 04/03/2023
Verifique em <https://d/verificador.iti.br>

Dr^a ALESSANDRA CRISTINA ADAMETTO
Pesquisadora junto a Empresa BioSmart Nanotechnology de Araraquara/SP



Documento assinado digitalmente
FERNANDA LOURENCAO BRIGHENTI
Data: 02/03/2023 12:43:52-0300
Verifique em <https://jverificador.iti.br>

Prof Dr^a . FERNANDA LOURENÇÃO BRIGHENTI
Faculdade de Odontologia de Araraquara/UNESP

Prof Dr^a FLÁVIA APARECIDA RESENDE NOGUEIRA
Universidade de Araraquara - UNIARA

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho

A minha amada esposa Alessandra por todo apoio e ao meu precioso filho Guilherme.

A minha querida mãe pelo seu amor dedicado aos filhos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pelo ensejo de participar deste doutorado, possibilitando muito aprendizado.

Agradeço o meu orientador Professor doutor Hernane da Silva Barud pela oportunidade que me deu, pela sua maestria como orientador e além de tudo, pela amizade.

Ao meu coorientador doutor Diógenes dos Santos Dias pela paciência e a disponibilidade de em ensinar a produzir os filmes de *Allium cepa*.

Ao professor doutor Clóvis Augusto Ribeiro por me ajudar nas análises dos resultados bem como na escrita dos artigos publicados desta tese.

A todos do grupo do laboratório BioPolMat sempre disponíveis para me ajudar.

À secretária Sandra Regina Pavanelli pela organização dos nossos documentos.

Aos parceiros de pesquisa em especial professor doutor Rogério Lustre (UNIARA), à professora doutora Flávia Aparecida Resende (UNIARA), Doutor Renan Lira (UNESP), Professora doutora Rosana Maria Nascimento de Assunção (UFU), Professora doutora Sandra Andrea Cruz (UFSCAR).

A CAPES pelo apoio financeiro destinada ao meu doutorado.

EPÍGRAFE

“A dúvida é o princípio da sabedoria”.

(Aristóteles)

RESUMO

A necessidade de se utilizar materiais biocompatíveis, de fácil produção e de baixo custo tem sido foco de muitas pesquisas. O uso de produtos naturais tornou-se uma tendência no mundo científico, principalmente na formação de compósitos com a finalidade de uso terapêutico ou até mesmo em substituição á produtos de difícil degradação, bem como uso na área odontológica voltados para regeneração de tecidos. A espécie *Allium cepa* mais conhecida como cebola está sendo pesquisada em algumas formulações na área médica. Assim, é importante avaliar propriedades físicas e químicas, sustentabilidade, biossegurança e propriedades biológicas, tais como biocompatibilidade, biodegradabilidade e baixa toxicidade. No presente trabalho teve como objetivo realizar um levantamento bibliográfico sobre os biopolímeros para regeneração óssea na Odontologia, realizar filmes por meio do processo casting a partir do beneficiamento da polpa de cebola (*Allium cepa* L.) e submetidos a esterilização por radiação gama de Cobalto e realizar filmes incorporados ao glicerol. Os filmes obtidos foram avaliados quanto às propriedades físico-químicas e biológicas, por meio de caracterizações morfológicas, estruturais, térmicas, mecânica, citotóxicas e mutagênicas. Verificou que na prospecção tecnológica o colágeno foi biopolímero com maior número de artigos e patentes para regeneração óssea. E para os filmes lavados W-HTP e não lavados HTP apresentaram diferenças nas suas caracterizações devido processo de lavagem e os filmes irradiados sofreram modificações físico-químicas devido processo de irradiação provavelmente por causa da reticulação e formação de radicais livres. Já para os filmes incorporados com glicerol observou que a presença do glicerol modificou algumas propriedades comparados com os filmes sem glicerol. Ao final foi concluído que os filmes de *Allium cepa* L se apresentaram com possibilidade para uso na área médica e odontológica.

Palavras chaves: Biopolímeros, biomateriais, *Allium Cepa*.

ABSTRACT

The need to use biocompatible, easy-to-produce and low-cost materials has been the focus of much research. The use of natural products has become a trend in the scientific world, mainly in the formation of composites with the purpose of therapeutic use or even replacing products that are difficult to degrade, as well as use in the dental area aimed at tissue regeneration. The species *Allium cepa*, better known as onion, is being researched in some formulations for treatment in the medical fields. Thus, it is important to evaluate physical and chemical properties, sustainability, biosafety and biological properties such as biocompatibility, biodegradability and low toxicity. The objective of this work was to carry out a bibliographic survey on biopolymers for bone regeneration in Dentistry, to make films using the casting process from the processing of onion pulp (*Allium cepa* L.) and submitted to sterilization by cobalt and gamma radiation make films incorporated to glycerol. The films obtained were evaluated for physicochemical and biological properties, through morphological, structural, thermal, mechanical, cytotoxic and mutagenic characterizations. It was verified that in the technological prospection, collagen was the biopolymer with the highest number of articles and patents for bone regeneration. And for the washed W-HTP and unwashed HTP films, they showed differences in their characterizations due to the washing process and the irradiated films underwent physicochemical modifications due to the irradiation process, probably because of the crosslinking and formation of free radicals. As for the films incorporated with glycerol, it was observed that the presence of glycerol modified some properties compared to films without glycerol. In the end, it was concluded that the films of *Allium cepa* L presented themselves with the possibility of use in the medical and dental field.

Keywords: Biopolymers, biomaterials, *Allium Cepa*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1 - Número de artigos científicos por ano de publicação na <i>web of Science</i> e <i>Scopus</i> (2010,2021)	28
Figura 1.2 - Número de patentes por ano dos biopolímeros selecionados (2010-2021)	29
Figura 1.3 - <i>Ranking</i> dos países que mais publicaram artigos na <i>Web of Science</i> e <i>Scopus</i> dos biopolímeros associados à regeneração óssea (RO).....	30
Figura 1.4 - <i>Ranking</i> dos países que mais publicaram artigos na <i>Web of Science</i> e <i>Scopus</i> dos biopolímeros associados à regeneração óssea na Odontologia (RO/Odonto)	31
Figura 1.5 - <i>Ranking</i> dos países que mais publicaram patentes dos biopolímeros associados à regeneração óssea (RO)	32
Figura 1.6 - <i>Ranking</i> dos países que mais publicaram patentes dos biopolímeros associados á regeneração óssea na Odontologia (RO/Odonto)	33
Figura 1.7 - Áreas de pesquisa predominantes nos artigos publicados na base <i>Web of Science</i> e na <i>Scopus</i> dos biopolímeros associados à regeneração óssea (RO) ...	34
Figura 1.8 - Áreas de pesquisa predominantes nos artigos publicados na base <i>Web of Science</i> e na <i>Scopus</i> dos biopolímeros associados à regeneração óssea na Odontologia (RO/Odonto)	34
Figura 1.9 - Periódicos predominantes nos artigos publicados na base <i>Web of Science</i> e <i>Scopus</i> dos associados à regeneração óssea (RO).....	36
Figura 1.10 - Periódicos predominantes nos artigos publicados na base <i>Web of Science</i> <i>Scopus</i> dos biopolímeros associados à regeneração óssea na Odontologia (RO/Odonto)	37
Figura 1.11 - Principais classificações atribuídas às patentes dos biopolímeros associados à regeneração óssea (RO)	38

Figura 1.12 Principais classificações atribuídas às patentes dos biopolímeros associados à regeneração óssea na Odontologia (RO/Odonto)	39
Figura 2.1 Micrografias obtidas via FE-SEM de filmes não irradiados à base de cebola HTP e filmes irradiados W-HTP com doses entre 5 e 40 kGy de radiação γ (Ampliação: 25.000 x).....	57
Figura 2.2 Curvas termogravimétricas (TG) e derivadas (DTG) de filmes de cebola HTP (a,b) e W-HTP (c,d) esterilizados sob diferentes doses de radiação γ	60
Figura 2.3 Curvas DSC mostrando as principais transições térmicas dos filmes à base de cebola: (a) HTP; (b) W-HTP.....	61
Figura 2.4 Espectro FTIR de filmes à base de cebola para números de onda de 4000 – 2000 cm^{-1} (a,c) e 2000 – 800 cm^{-1} (b,d).....	64
Figura 2.5 Difractogramas de raios X (DRX) de filmes HTP e W-HTP esterilizados com doses de 5 (a,c) e 40 kGy (b,d) de radiação γ	65
Figure 2.6 Propriedades mecânicas dos filmes HTP e W-HTP: (a) resistência à tração; (b) alongamento na ruptura; (c) Módulo de Young.....	68
Figura 2.7 Ângulo de contato aparente das superfícies dos filmes de cebola irradiados com HTP e W-HTP γ sob diferentes doses e imagens das gotas de água 0,001 s após sua deposição.....	70
Figura 2.8 Propriedades de barreira dos filmes de cebola HTP e W-HTP sob diferentes doses de radiação: (a) coeficiente de permeabilidade – α ; (b) taxa de transmissão de vapor d'água – TPVA; (c) permeação de vapor de água – PVA.....	73
Figura 2.9 Análise da viabilidade de células em HaCat expostas a diferentes concentrações de filmes de cebola HTP por 24 horas a partir de três experimentos independentes para as amostras HTP (a) e W-HTP (b)	76
Figura 3.1 Imagens dos filmes de Allium cepa obtidos com glicerol nas concentrações de 5%(a1), 10%(a2), 15% (a3) e 20% e filme sem glicerol.....	98
Figura 3.2 Opacidade dos filmes de Allium cepa obtidos com glicerol nas concentrações de 5%, 10%, 15% e 20% e filme sem glicerol (0%).....	99

Figura 3.3 Espessura dos filmes de Allium cepa obtidos com glicerol nas concentrações de 5%, 10%, 15% e 20% e filme sem glicerol (0%).....	100
Figura 3.4 Imagem MEV dos filmes de Allium cepa obtidos com glicerol nas concentrações de 5%, 10%, 15% e 20% e filme sem glicerol (0%).....	101
Figura 3.5 Espectro de Infravermelho (4000- 800 cm ⁻¹) dos filmes de Allium cepa incorporados com glicerol nas concentrações de 5%, 10%, 15% e 20%.....	102
Figura 3.6 Curvas TG e DTG e DSC dos filmes W-HTP sem glicerol e W-HTPG nas concentrações de 5%, 10%,15% e 20%.....	104
Figura 3.7 Análise DRX dos filmes W-HTP sem glicerol e W-HTPG nas concentrações de 5%, 10%,15% e 20%.....	105
Figura 3.8 Ensaio mecânicos dos filmes W-HTP sem glicerol(0%) e W-HTPG nas concentrações de 5%, 10%,15% e 20%.....	107
Figura 3.9 Análise de intumescimento dos filmes W-HTP sem glicerol e W-HTPG nas concentrações de 5%, 10%,15% e 20%.....	109
Figura 3.10 Propriedades de barreira à água dos filmes W-HTP sem glicerol (0%) e W-HTPG nas concentrações de 5%, 10%,15% e 20%.....	110
Figura 3.11 Solubilidade.....	113
Figura 3.12 Erosão.....	114
Figura 3.13 Ensaio de citotoxicidade.....	115

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1 Artigos e patentes dos biopolímeros associados à regeneração óssea (RO)	25
Tabela 1.2 Artigos e patentes dos biopolímeros associados à regeneração óssea na Odontologia (RO/Odonto).....	26
Tabela 2.1 Valores das temperaturas de desidratação (T_{desid}) e de cristalização (T_c), – incluindo as temperaturas inicial (T_{onset}) e final (T_{endset}) dessas transições – para os filmes HTP e W-HTP irradiados com doses entre 5 e 40 kGy de radiação γ	62
Tabela 2.2 Intensidade dos picos cristalinos – denominados I(200) e lam – e índice de cristalinidade (Crl) dos filmes HTP e W-HTP irradiados com doses entre 5 e 40 kGy de radiação γ	67
Tabela 2.3 Atividade mutagênica expressa como média e desvio padrão do número de revertentes/placa e índice de mutagenicidade nas cepas TA98 e TA102 de Salmonella.....	75
Tabela 3.1 Intensidade dos picos cristalinos – denominados I(200) e lam – e índice de cristalinidade (Crl) dos filmes HTP e W-HTP irradiados com doses entre 5 e 40 kGy de radiação γ	106
Tabela 3.2 Mostra a resistência a tração, alongamento de ruptura e módulo de Young dos filmes W-HTP sem glicerol (0%) e W-HTPG nas concentrações de 5%, 10%,15% e 20%.....	108
Tabela 3.3 Propriedades de barreira à água constituídos de polpa de Allium cepa filmes W-HTP sem glicerol (0%) e W-HTPG nas concentrações de 5%, 10%,15% e 20%.....	111

LISTA DE ABREVIATURAS

- DII-** Índice de Inovação Derwent
- DRX-** Difratoformas de raios X
- DTG-** Derivada da TG
- EPO-** Escritório Europeu de Patentes
- FTIR-** Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier
- HTP-** Polpa Tratada hidrotermicamente não lavada
- IPC-** Classificação Internacional de Patentes
- INPI-** Instituto Nacional de Propriedade Intelectual
- kGy-** Guilo Gray- Unidade de Dose Absorvida
- MEV-** Microscopia Eletrônica de Varredura
- NaOH-** Hidróxido de sódio
- PBS-** Solução salina tamponada com fosfato
- PCL-** Ácido policaprolactona
- PGA-** Ácido poliglicólico
- PHA-** Polihidroxialcanoato
- PLA-** Ácido polilático
- PTFE-** Politetrafluoretileno
- PVA-** Permeabilidade ao vapor de água
- RO-** Regeneração óssea
- RO/Odonto-** Regeneração óssea na Odontologia
- TG-** Termogravimetria
- TPVA-** Taxa de transmissão de vapor de água
- USPTO-** Escritório de Patentes e Marcas dos Estados Unidos
- UV-** Ultravioleta
- W-HTP-** Polpa tratada hidrotermicamente lavada.
- W-HTPG-** Polpa tratada hidrotermicamente lavada incorporada com glicerol

SUMÁRIO

APRESENTAÇÃO	17
CAPÍTULO 1- BIOPOLÍMEROS PARA REGENERAÇÃO ÓSSEA: UMA PROSPECÇÃO TECNOLÓGICA	19
1 INTRODUÇÃO	21
2 MATERIAIS E MÉTODOS	24
3 RESULTADOS E DISCUSSÕES	25
4 CONCLUSÕES	40
5 REFERÊNCIAS	41
CAPÍTULO 2- FILMES AUTO-SUSTENTÁVEL À BASE DE BULBO DE CEBOLA (ALLIUM CEPA L.): EFEITOS DA RADIAÇÃO GAMA EM DOSES ESTERILIZANTES	44
1 INTRODUÇÃO	47
2 OBJETIVOS	50
3 MATERIAIS E MÉTODOS	51
3.1 Produções de filmes à base de cebola	51
3.2 Radiação Co-60γ	51
3.3 Caracterizações dos filmes	51
3.3.1 Microscopia eletrônica de varredura por emissão de campo (FE SEM)	51
3.3.2 Termogravimetria TG e TG derivada DTG	51
3.3.3 Calorimetria exploratória diferencial (DSC	52
3.3.4 Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)	52
3.3.5 Difração de Rx (DRX)	52
3.3.6 Propriedades mecânicas	53
3.3.7 Medição do ângulo de contato	53
3.3.8 Propriedade de barreira	53
3.3.9 Ensaio de mutagenicidade	54
3.3.10 Ensaio de citotoxicidade	55
4. RESULTADOS E DISCUSSÕES	56
4.1 Microscopia eletrônica de varredura por emissão de campo(FE SEM)	57

4.2 Termogravimetria TG e TG derivada DTG.....	59
4.3 Calorimetria exploratória diferencial (DSC).....	62
4.4 Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR).....	63
4.5 Difração de Rx (DRX).....	66
4.6 Propriedades mecânicas.....	68
4.7 Medição do ângulo de contato.....	70
4.8 Propriedade de barreira.....	72
4.9 Ensaios de mutagenicidade.....	74
4.10 Ensaios de citotoxicidade.....	76
5 CONCLUSÕES.....	77
6. REFERÊNCIAS.....	78
CAPÍTULO 3 ESTUDO DA INFLUÊNCIA DO GLICEROL INCORPORADAS AOS FILMES DE <i>ALLIUM CEPA</i>.....	85
1 INTRODUÇÃO.....	88
2 OBJETIVOS.....	91
3 MATERIAS E MÉTODOS.....	92
3.1 Produção dos filmes de <i>Allium cepa</i>	92
3.2 Obtenção dos filmes de <i>Allium cepa</i> com glicerol.....	92
3.3 Caracterizações dos filmes.....	92
3.3.1 Espessura dos filmes.....	92
3.3.2 Transparência e opacidade.....	92
3.3.3 Microscopia eletrônica de varredura por emissão de campo (FE SEM).....	93
3.3.4 Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR).....	93
3.3.5 Termogravimetria TG e TG derivada DTG.....	93
3.3.6 Difração de Rx (DRX).....	93
3.3.7 Propriedades mecânicas.....	94
3.3.8 Teste de intumescimento.....	94
3.3.9 Propriedade de barreira.....	95
3.3.10 Avaliação da solubilidade dos filmes em água.....	95
3.3.11 Ensaio de erosão.....	96

3.3.12 Ensaio de citotoxicidade.....	96
4 RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	98
4.1 Característica dos filmes.....	98
4.2 Espessura dos filmes.....	99
4.3 Microscopia eletrônica de varredura por emissão de campo (FE SEM).....	100
4.4 Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR).....	101
4.5 Termogravimetria TG e TG derivada DTG.....	103
4.6 Difração de Rx (DRX)	104
4.7 Propriedades mecânicas.....	106
4.8 Teste de intumescimento.....	108
4.9 Propriedade de barreira.....	109
4.10 Avaliação da solubilidade dos filmes em água.....	111
4.11 Ensaio de erosão.....	113
4.12 Ensaio de citotoxicidade.....	114
5 CONCLUSÕES.....	116
6 REFERÊNCIAS.....	117

APRESENTAÇÃO

O *Allium cepa* L. ou cebola é uma planta herbácea, com folhas cerosas e raízes fasciculadas e que possui baixo teor proteico e de aminoácidos essenciais, não podendo ser considerada uma boa fonte nutritiva. Ela é muito usada in natura na culinária mundial, não como alimento principal, mas como temperos ou acompanhamento e na composição de saladas, por isso sua produção e comércio é a nível mundial. A cebola fresca é constituída por 90% de água, 1,5% de proteínas solúveis, 0,1% de gorduras e 8,7% de carboidratos estruturais e não estruturais. Várias substâncias são encontradas nas cebolas como os flavonoides, antocianinas, compostos lacrimogêneos e saborosos como ácidos sulfônicos, carboidratos estruturais como celulose, xilanos e pectinas e carboidratos não estruturais também estão presentes. Entre outras funcionalidades, a cebola está sendo investigada pelo fato de ser de fonte renovável, por ser de origem natural, por apresentar ausência de mutagenicidade in vitro e conformidade na citotoxicidade, por seus biopolímeros possuírem grande capacidade de incorporar novos princípios ativos e podendo atuar como suporte de aditivos e também pelo seu custo x benefício e fácil acesso.

Este trabalho está dividida em três capítulos. O primeiro capítulo é dedicado a prospecção tecnológica dos biopolímeros para regeneração óssea na Odontologia publicado como capítulo de livro pela editora científica digital no livro Ciência e Engenharia de Materiais: conceitos, fundamentos e aplicação (DOI. 10.37885/210705537). O segundo capítulo refere-se aos efeitos da radiação gama em doses esterilizantes nos filmes de *Allium cepa* obtidos pelo método casting também publicado (<https://doi.org/10.3390>). A esterilização é o processo que elimina os microrganismos como vírus, fungos e bactérias através de técnicas como calor seco, calor úmido, filtração e ou radiação com o objetivo de garantir níveis adequados de segurança em alimentos, medicamentos, instrumentos como também, em diversos segmentos industriais. Uma vez que o processo de esterilização pode afetar a composição dos produtos, este processo deve ser selecionado de acordo com as propriedades químicas e físicas dos produtos que voltados para área farmacêutica, médica e industrial como alimentos. O terceiro capítulo refere-se a obtenção e caracterização de filmes lavados de *Allium cepa* contendo diferentes concentrações de glicerol. O glicerol foi utilizado como plastificante, visando melhoria nas propriedades mecânicas. Estudos recentes com o uso de glicerol como plastificante

demonstrou eficácia, tornando os filmes mais hidrofílicos (por aumentar a sua capacidade de interação com a água) e mais flexíveis.

CAPÍTULO 1- BIOPOLÍMEROS PARA REGENERAÇÃO ÓSSEA NA ODONTOLOGIA: UMA PROSPECÇÃO TECNOLÓGICA

RESUMO

Uma vez que ocorre a perda da estrutura dental, a regeneração óssea é um procedimento imprescindível para reconstrução do tecido ósseo que ocorre naturalmente, mas que pode ser reconstruída pela ajuda do profissional através da regeneração óssea guiada. Os biopolímeros vêm sendo estudados como uma alternativa em terapias de regeneração óssea, que é um tratamento comumente empregado na Odontologia. O objetivo deste trabalho, foi realizar um mapeamento científico e tecnológico das aplicações de biopolímeros para regeneração óssea entre 2010 e junho de 2021. Para tanto, a metodologia foi utilizar palavras-chave “biopolímeros” “regeneração óssea” e “odontologia” nas bases de artigos *Scopus* e *Web of Science* e nas bases de patentes *European Patent Office (EPO)*, *United States Patent and Trademark Office (USPTO)* e Instituto Nacional de Propriedade Industrial (INPI), além da base *Derwent Innovation Index (DII)* da *Web of Science/Clarivate Analytics*. Como resultados o colágeno foi o biopolímero com maior número de publicações em artigos. China e EUA foram os países com maior participação nas publicações. A Organização Mundial de Propriedade Intelectual (WIPO) ficou em primeiro colocado entre as patentes. A Engenharia e Medicina para Cirurgia Oral Odontológica obtiveram os maiores resultados como área de pesquisa e o periódico *Materials Science Engineering C: Materials for Biological Applications* e o *Clinical Oral Implants Research* apresentaram maior número de publicações. Para a classificação Internacional de Patentes, os destaques foram a patente A61L 027/54 referente a materiais biologicamente ativos e a patente A61L027/58 relacionada a membranas reabsorvíveis. Por fim, o aumento no número de publicações de artigos verificado neste trabalho ao longo da última década sugere um avanço científico e tecnológico de materiais voltados a produtos naturais em uso médico e odontológico, ainda que o número de patentes seja significativamente menor dos que publicações de artigos.

Palavras- chave: polímeros naturais, engenharia de tecido ósseo, membranas reabsorvíveis.

ABSTRACT

Once the loss of tooth structure occurs, bone regeneration is an essential procedure for rebuilding the bone tissue that occurs naturally, but which can be rebuilt with the help of a professional through guided bone regeneration. Biopolymers have been studied as an alternative in bone regeneration therapies, which is a commonly used treatment in dentistry. The objective of this work was to carry out a scientific and technological mapping of the applications of biopolymers for bone regeneration between 2010 and June 2021. For this purpose, the methodology was to use keywords “biopolymers”, “bone regeneration” and “dentistry” in the databases of Scopus and Web of Science articles and in the European Patent Office (EPO), United States Patent and Trademark Office (USPTO) and National Institute of Industrial Property (INPI) patent databases, in addition to the Derwent Innovation Index (DII) database of Web of Science /Clarivate Analytics. As a result, collagen was the biopolymer with the highest number of publications in articles. China and the USA were the countries with the highest participation in publications. The World Intellectual Property Organization (WIPO) ranked first among patents. Engineering and Medicine for Dental Oral Surgery obtained the highest results as a research area and the journal Materials Science Engineering C: Materials for Biological Applications and Clinical Oral Implants Research presented the highest number of publications. For the International Patent Classification, the highlights were patent A61L 027/54 referring to biologically active materials and patent A61L027/58 related to resorbable membranes. Finally, the increase in the number of publications of articles verified in this work over the last decade suggests a scientific and technological advance of materials aimed at natural products in medical and dental use, although the number of patents is significantly smaller than publications of articles.

Keywords: natural polymers, bone tissue engineering, resorbable membranes.

1. INTRODUÇÃO

A regeneração do tecido ósseo lesionado não acontece por completo dependendo do tamanho do defeito. Nesse sentido, os enxertos ósseos passam a ser procedimentos imprescindíveis para reconstrução necessária do osso (FARDIN et al., 2010). Tais enxertos necessitam promover a osteogênese, osteocondução, estimular a osteoindução, não apresentar resposta imunológica do hospedeiro, revascularizar rapidamente e ser substituído completamente por osso em quantidade e qualidade semelhante ao do hospedeiro (ARTZI et al., 2005). Os enxertos autógenos, considerados referência, são de fácil obtenção e com propriedades osteoindutoras, osteocondutoras e osteogênicas, (PELTONIEMI et al., 2002; MYEROFF, 2011; ASHMAN, 2013) porém, estão associados a altas taxas de morbidade do local doador (FILLINGHAM, 2012). Os alógenos, provenientes do banco de doação, são osteocondutores e de baixo custo, entretanto, apresentam potencial de transmitir agentes infecciosos (ROBERTS, 2012).

A técnica de regeneração óssea pode vir acompanhada do uso de membranas que funcionam como barreiras que protegem o coágulo sanguíneo (MACEDO et al., 2003), evitam a presença de microorganismos infecciosos, bem como favorecem o isolamento dos tecidos indesejáveis no local a ser regenerado (HARDWICK et al., 1996). Tais membranas podem ser não absorvíveis ou absorvíveis. As membranas não absorvíveis podem ser produzidas com politetrafluoretileno expandido (e-PTFE), politetrafluoretileno denso (d-PTFE), titânio, e-PTFE reforçada com titânio e polipropileno (RONDA, 2014). As membranas absorvíveis, por sua vez, podem ser fabricadas a partir de polímeros naturais, como o colágeno, ou sintéticos, como o ácido polilático e o ácido poliglicólico (RAKHMATIA et al., 2013). Essas membranas servem como barreira, criando um espaço para as células osteoprogenitoras e auxiliando na formação de vasos sanguíneos, que levam oxigênio e células mesenquimais indiferenciadas ao sítio enxertado, podendo reestabelecer a função e estética nos locais acometidos pelo defeito ósseo (COSTA et al., 2021).

No contexto da engenharia de tecidos, outras opções passaram a ser exploradas como alternativa aos os enxertos ósseos autógenos (MATASSI et al., 2011), como os materiais xenógenos (provenientes de espécies diferentes, como é o caso do osso bovino) que exigem prévia desproteínização (NAZIRKAR et al., 2014),

os materiais aloplásticos (ou sintéticos) como as cerâmicas bioativas (SAIMA et al, 2016) e outros materiais como polímeros biológicos ou sintéticos e materiais compósitos (STEVENS, 2008) destinados a substituir transplantes autólogos e alogênicos.

As importantes características físicas e mecânicas dos polímeros, bem como a biocompatibilidade, biodegradabilidade, sustentabilidade, baixo custo e renováveis (GREGORY et al., 2021) têm proporcionado seu emprego nas indústrias de alimentos, farmacêutica e terapêutica. Em geral, os polímeros sintéticos são não-biodegradáveis e, por isso, os biopolímeros passam a ser uma opção mais interessante em diversas áreas. Os biopolímeros são macromoléculas compostas por unidades monoméricas orgânicas presentes em fontes naturais e podem ser empregados na fabricação de materiais como embalagens, filmes comestíveis, alimentos e biocurativos (UDAYAKUMAR et al., 2021; AZEREDO et al., 2019). Assim, os biopolímeros contribuem para a manutenção de um meio ambiente ecologicamente mais equilibrado ao reduzir a dependência de recursos não-renováveis e poluentes (GEORGE et al, 2020).

Os biopolímeros encontram vasta aplicação na área médica onde são utilizados na liberação de fármacos, na cicatrização de feridas, e na fabricação de suturas e de *scaffolds* na engenharia de tecidos (VAN DE VELDE, 2002). Na Odontologia, os biopolímeros são usados especialmente na regeneração periodontal, onde se destaca o emprego do colágeno reabsorvível e de esponjas de gelatina (CHEN et al., 2021). Neste sentido, os biopolímeros são de grande interesse para Engenharia Tecidual óssea pois possuem a capacidade de dar suporte estrutural e direcionar o crescimento celular na área a ser regenerada (MARTINS-JÚNIOR et al., 2013).

Um dos grandes desafios atualmente na área médica e odontológica é a regeneração óssea. Nesse contexto, o uso de biopolímeros vem sendo estudado como uma alternativa para terapias de regeneração óssea. Entre os polímeros naturais empregados nesse cenário destacam-se: proteínas (ex.: colágeno, gelatina e fibroína), polissacarídeos (ex.: celulose, quitina, quitosana, alginato, e ácido hialurônico), polinucleotídeos, poli-isoprenos (ex. borracha natural), poliésteres (ex.: poli(β -hidroxibutirato) (PHB), poli(β -hidroxivalerato) (PHV) e poli(hidroxibutirato-covalerato) (PHB-V)) (AHAMED et al, 2020)

O objetivo deste trabalho é apresentar uma prospecção científica e tecnológica das aplicações de biopolímeros para regeneração óssea com foco na área Odontológica. Essa análise foi feita a partir de dados publicados nos periódicos das bases de dados *Web of Science* e *Scopus* e também por meio de buscas de patentes nas bases *Derwent Innovation Index* (DII) da *Web of Science/Clarivate Analytics*, do Escritório Europeu de Patentes (EPO), do Instituto Nacional de Propriedade Intelectual (INPI) e do Escritório de Patentes e Marcas dos Estados Unidos (USPTO) na última década (2010-2021).

2- MATERIAIS E MÉTODOS

Para esta pesquisa foi realizada uma busca de anterioridade em bases de artigos e patentes nos anos de 2010 até meados de 2021. Os artigos foram pesquisados nas bases *Web of Science* e *Scopus* e as patentes nas bases *Derwent*, *EPO*, *USPTO* e *INPI*. Inicialmente foram realizadas buscas com as palavras-chave *biopolymers AND "bone regeneration"*. Dos biopolímeros encontrados, foram selecionados os oito com maior número de artigos encontrados: colágeno, quitosana, alginato, gelatina, ácido hialurônico, fibroína da seda, ácido polilático e ácido glicólico.

Depois de selecionados esses biopolímeros, a pesquisa definitiva foi realizada com as palavras-chave *chitosan AND "bone regeneration"*, *collagen AND "bone regeneration"*, *"hyaluronic acid" AND "bone regeneration"*, *alginate AND "bone regeneration"*, *gelatin AND "bone regeneration"*, *"silk fibroin" AND "bone regeneration"*, *PLA/"polylactic acid" AND "bone regeneration"* e *PLGA/"glycolic acid" AND "bone regeneration"*. Esse grupo foi denominado RO, referindo-se aos artigos de regeneração óssea de forma genérica.

Para a pesquisa dos biopolímeros selecionados nesta pesquisa para regeneração óssea na área odontológica, foram acrescentadas as palavras chaves: *dental/oral/dentistry* (exemplo: *alginate AND "bone regeneration" AND dental*, *alginate AND "bone regeneration" AND oral*, *alginate AND "bone regeneration" AND dentistry*) com a intenção de englobar o máximo de artigos possíveis, pois em pesquisa referente a Odontologia é comum encontrar artigos com as palavras-chave em inglês "dental", "oral" ou "dentistry". Esse grupo foi denominado RO/Odonto, referindo-se aos artigos de regeneração óssea na Odontologia.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na análise realizada, os biopolímeros associados à regeneração óssea com maior quantidade de publicações científicas foram o colágeno e a quitosana. A base de dados *Web of Science* foi a que apresentou a maior quantidade de artigos (Tabela 1.1). Analogamente, no que se refere a essa busca na área odontológica (RO/Odonto), foi também encontrado maior quantidade de artigos sobre colágeno e quitosana (Tabela 1.2), indicando que são esses os biopolímeros mais usados para regeneração óssea na área médica em geral bem como na odontologia.

Tabela 1.1 Artigos e patentes dos biopolímeros associados à regeneração óssea (RO).

Palavras-chave	Bases de artigos		Bases de patentes			
	<i>Web of Science</i>	<i>Scopus</i>	<i>Derwent</i>	EPO	USPTO	INPI
<i>Collagen AND "bone regeneration"</i>	2991	1874	293	66	9	7
<i>Chitosan AND "bone regeneration"</i>	1045	644	155	29	2	0
<i>Gelatin AND "bone regeneration"</i>	738	470	123	29	3	2
<i>"Glycolic acid" AND "bone regeneration"</i>	585	444	94	15	3	2
<i>Alginate AND "bone regeneration"</i>	404	258	91	20	1	1
<i>"Polylactic acid" AND "bone regeneration"</i>	269	190	96	13	0	1
<i>"Silk Fibroin" AND "bone regeneration"</i>	274	148	27	12	1	0
<i>"Hyaluronic acid" AND "bone regeneration"</i>	225	114	116	17	1	3

Similarmente, Rocha e colaboradores (2012) ao realizar uma prospecção tecnológica de artigos e patentes sobre polímeros biocompatíveis para engenharia de tecidos reportaram que os polímeros naturais mais citados nos artigos foram PHA (polihidroxialcanoato), colágeno, quitosana, ácido polilático (PLA), ácido polilactona (PCL) e ácido poliglicólico (PGA).

Tabela 1.2. Artigos e patentes dos biopolímeros associados à regeneração óssea na Odontologia (RO/Odonto).

Palavras-chave	Bases de artigos		Bases de patentes			
	<i>Web of Science</i>	<i>Scopus</i>	<i>Derwent</i>	EPO	USPTO	INPI
<i>Collagen AND "bone regeneration" AND dental</i>	567	223	72	10	4	1
<i>Chitosan AND "bone regeneration" AND dental</i>	89	55	28	6	1	0
<i>"Glycolic acid" AND "bone regeneration" AND dental</i>	67	34	22	0	0	0
<i>Gelatin AND "bone regeneration" AND dental</i>	49	29	33	3	2	0
<i>Alginate AND "bone regeneration" AND dental</i>	31	20	15	0	0	0
<i>"Hyaluronic acid" AND "bone regeneration" AND dental</i>	29	14	24	3	1	1
<i>Polylactic acid" AND "bone regeneration" AND dental</i>	25	17	20	0	0	0
<i>Fibroína da Seda AND "bone regeneration" AND dental</i>	21	7	3	0	0	0

Nas bases de patentes, o colágeno e a quitosana foram os biopolímeros com maior número de patentes, indicando coerência entre número de artigos e número de patentes publicados. Na Odontologia, entretanto, os dois polímeros mais citados foram colágeno e gelatina, nessa ordem. Na base INPI e USPTO não foram encontrados resultados significativos, diferentemente do grande número de registros extraídos da base de dados da Derwent.

Na mesma linha, Borschiver e colaboradores (2008), ao fazer um estudo de monitoramento tecnológico e mercadológico de biopolímeros, documentaram que os polímeros naturais que mais apareceram na busca de patentes entre 2002 a 2007 foram o colágeno e a quitosana. Nesse cenário, esses biopolímeros estavam associados principalmente às áreas médica e de nanotecnologia com foco na regeneração óssea.

Estudos conduzidos por Tamimi et al. (2008) demonstram que o colágeno é um polímero natural com potencial de aumentar a regeneração do tecido ósseo. Em seu estudo, o compósito Brushita-colágeno foi preparado pela combinação de soluções de ácido cítrico / colágeno tipo I com pó de cimento de brushita. A pasta de cimento produzida apresentou resistência à compressão semelhante a do osso esponjoso, excelente propriedade de coesão e alta capacidade de adesão celular, além de

propriedades osteocondutoras e biodegradáveis inerentes à brushita e aos biomateriais à base de colágeno.

Uma revisão crítica de Ferreira et al. (2012) descreve os desafios para a fabricação de materiais à base de colágeno para aplicações na área médica com foco na regeneração óssea. Esse trabalho apresenta técnicas inovadoras para fabricação de *scaffolds* e materiais biomiméticos capazes de interagir com células e biomacromoléculas para substituição e restauração da função do tecido ósseo.

A regeneração óssea tem sido amplamente aplicada na Odontologia na área da implantodontia. Nesse sentido, Keil et al. (2021) conduziu um estudo clínico controlado e randomizado com sessenta e seis pacientes para observar a regeneração óssea pós extração dentária usando *Bio-oss (Bio-Oss® Collagen (BC; Geistlich Biomaterials, Baden-Baden, Alemanha))* e analisar as alterações angiogênicas e osteogênicas decorrentes dessa intervenção. A análise histomorfométrica de todas as amostras examinadas indicou que não houve diferença entre os alvéolos tratados e não tratados e que a inserção bem-sucedida dos implantes dentários em alvéolos de extração com o uso de colágeno/*Bio-Oss* é possível após oito semanas de consolidação óssea.

Dahlin et al. (2010) ao realizar um procedimento de aumento ósseo por regeneração óssea guiada em combinação de hidroxiapatita (xenógeno), osso autógeno com membranas de PTFE (Gore-Tex, W.L. Gore & Assoc.) e colágeno (BioGide®) em 20 pacientes que receberam 41 implantes em um período de 5 anos de análise, concluíram que a regeneração óssea auxiliada por ambas as membranas e o enxerto ósseo são tratamentos previsíveis para defeitos ósseos localizados em conjunto com os implantes dentários.

A quitosana, que é extraída da quitina de crustáceos, insetos, moluscos e da parede celular de fungos, é um biopolímero versátil e compatível com tecidos humanos (ROSENDO et al., 2020) que pode ser empregado na regeneração óssea. Nesse cenário, uma pesquisa realizada por Chen et al. (2015) demonstrou que o compósito vidro bioativo/quitosana/carboximetilcelulose desempenhou papel dominante na regeneração óssea, levando a reconstrução funcional de defeitos ósseos.

Paralelamente, estudos demonstram que a combinação colágeno/quitosana incorporada numa matriz inorgânica de nanopartículas de beta-fosfato-tricálcico (β -TCP) e quercetina empregada na fabricação de hidrogéis é biocompatível e não-citotóxica, fornecendo um ambiente propício de entrega de flavonoides naturais para a regeneração óssea (SAREETHAMMANUWAT, 2021).

A figura 1.1 ilustra o aumento no número de publicações ao longo dos anos referente aos biopolímeros selecionados nesta pesquisa para regeneração óssea (RO); nota-se, entretanto, que a quantidade de artigos publicados é bem maior do que na área Odontológica (RO/Odonto), mostrando um incremento durante esses anos. Vale ressaltar que no ano de 2021 a queda nas publicações provavelmente se dá pelo fato de esse número ter sido contabilizado até metade deste ano, bem como devido ao impacto na pesquisa científica causado pela pandemia da Covid-19.

No que diz respeito à relação entre quantidade de artigos científicos publicados e patentes depositadas nessa área, uma pesquisa dirigida por De Sousa et al. (2020) referente a um mapeamento tecnológico com as palavras-chave “*polyhydroxybutyrato*”, “*norbixin*”, “*biomaterial*”, “*tissue engineering*” e “*bone repair*” revela que o número de artigos científicos publicados nas bases *Web of Science*, *Scopus* e *Scielo* nos últimos 10 anos foi superior ao de patentes pesquisadas nas bases EPO, USPTO e INPI.

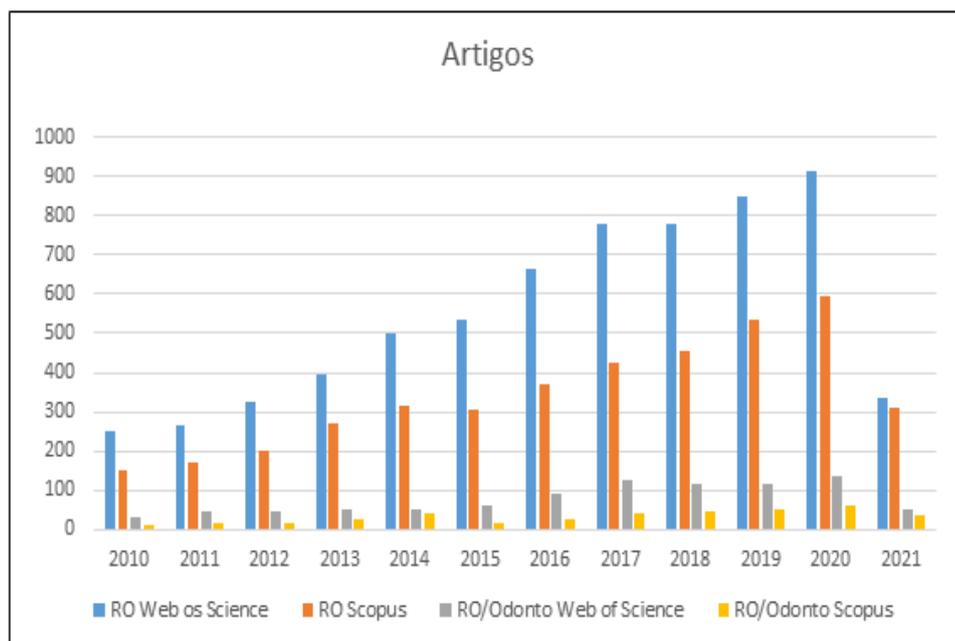


Figura 1.1 - Número de artigos científicos por ano de publicação na web os Science e Scopus (2010-2021). Abreviações: RO= Regeneração óssea. RO/Odonto= regeneração óssea na Odontologia.

A figura 1.2 mostra que houve um incremento significativo no número de patentes relacionadas aos biopolímeros selecionados para à regeneração óssea (RO) entre os anos de 2010 e 2012, sofrendo um moderado aumento nos anos 2017 e 2020, à exceção de um desvio no ano de 2013. Já as patentes relacionadas aos biopolímeros selecionados para regeneração óssea na área da odontologia (RO/Odonto) apresentaram uma quantidade significativamente menor em relação àquelas relacionadas a biopolímeros e regeneração óssea (RO). Entretanto, houve uma tendência de alta de patentes RO/Odonto no período compreendido entre 2013 e 2017, com leve diminuição de 2018 até meados de 2021.

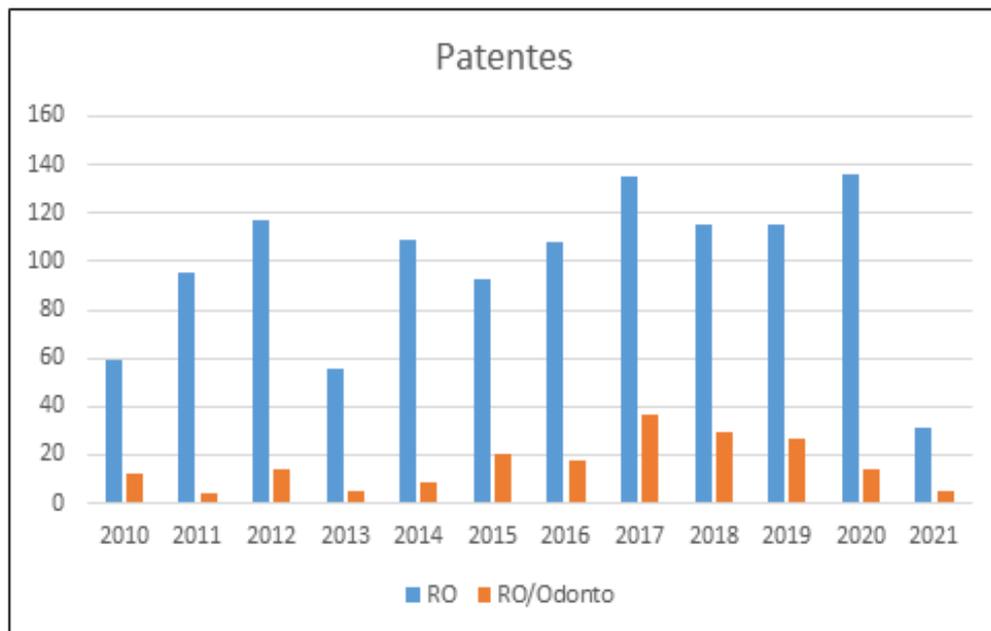


Figura 1.2. Número de patentes por ano dos biopolímeros selecionados (2010-2021). Abreviações: RO= Regeneração óssea. RO/Odonto= regeneração óssea na Odontologia.

Vale ressaltar que os avanços na área da implantodontia com técnicas para inserção de implantes dentários (PRIESNITZ et al., 2019) e a necessidade, muitas vezes, de volume suficiente de tecido ósseo na região a ser restaurada, nos leva a crer que houve um aumento nas pesquisas e no avanço tecnológico voltados para a regeneração do tecido ósseo.

Observa-se na figura 1.3 que a China ocupa o 1º lugar nas publicações acerca de biopolímeros associados à regeneração óssea (RO) com 1913 publicações de artigos na base *Web of Science*, seguida pelos EUA com 1187 publicações; o mesmo acontece na base *Scopus*, a qual conta com 1263 publicações lideradas pelos chineses e 715 publicações de grupos liderados pelos EUA. Nesse ranking, o Brasil encontra-se na 9º colocação. Nas pesquisas dos biopolímeros selecionados com a regeneração óssea na Odontologia (RO/Odonto) (figura 1.4) há uma inversão de posição entre os países líderes: os EUA parecem em 1º lugar nas duas bases de pesquisa, com 173 publicações na *Web of Science* e 70 na *Scopus*, enquanto a China conta com 143 na *Web of Science* e 69 na *Scopus*. Nesse cenário, o Brasil fica em 12º colocado. Cabe ressaltar, entretanto, conforme aponta Castro Silva et al. (2021), que a pesquisa odontológica brasileira tem sofrido gradativa evolução técnico-científica na área de biomateriais com aplicação na regeneração óssea guiada.

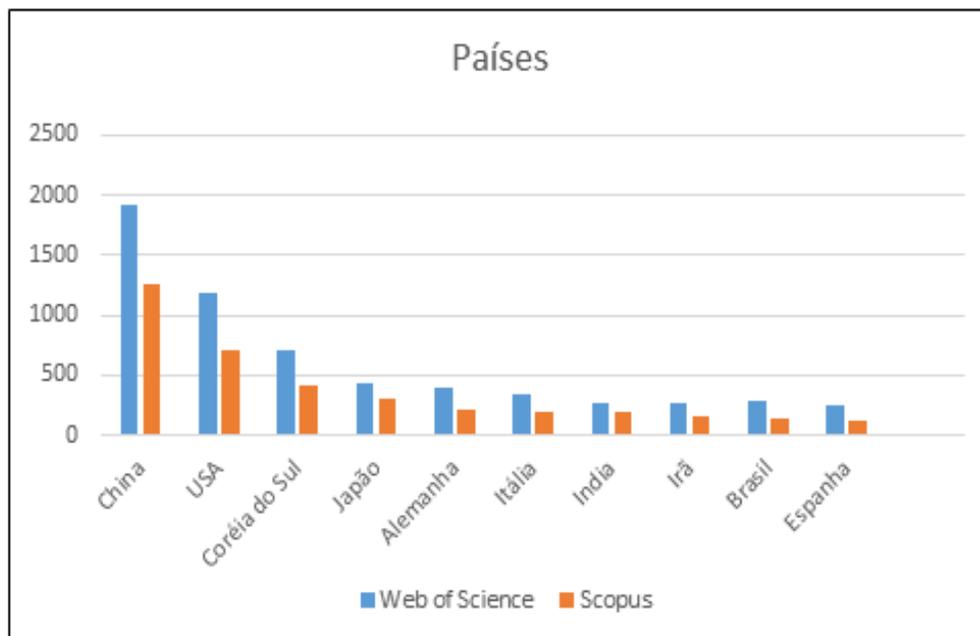


Figura 1.3 - Ranking dos países que mais publicaram artigos na Web of Science e Scopus dos biopolímeros associados à regeneração óssea (RO).

No que se refere à análise de depósito de patentes, conforme ilustram as figuras 1.5 e 1.6, a Organização Mundial de Propriedade Intelectual (WIPO) aparece em 1º lugar, com 692 patentes depositadas, e os EUA ocupa a 2ª posição, com 490 publicações nas pesquisas (RO). Essa mesma classificação no ranking é mantida nas

pesquisas (RO/Odonto), com 174 depósitos da WIPO e 104 dos EUA. Nesse ranking, o Brasil ocupa a 13ª colocação (RO) e 14ª patentes (RO/Odonto).

Conforme apontam De Souza et al. (2021) ao realizar uma prospecção tecnológica referente à celulose bacteriana na área médica, a China detém o pioneirismo tanto em publicações de artigos quanto em registro de patentes. Isso ocorre porque o país asiático tem tradição no desenvolvimento científico e tecnológico em diferentes áreas, como é o caso da área biomédica. O mesmo ocorre com os EUA que detêm muitos investimentos advindos da iniciativa privada que contribuem com os avanços tecnológicos do país.

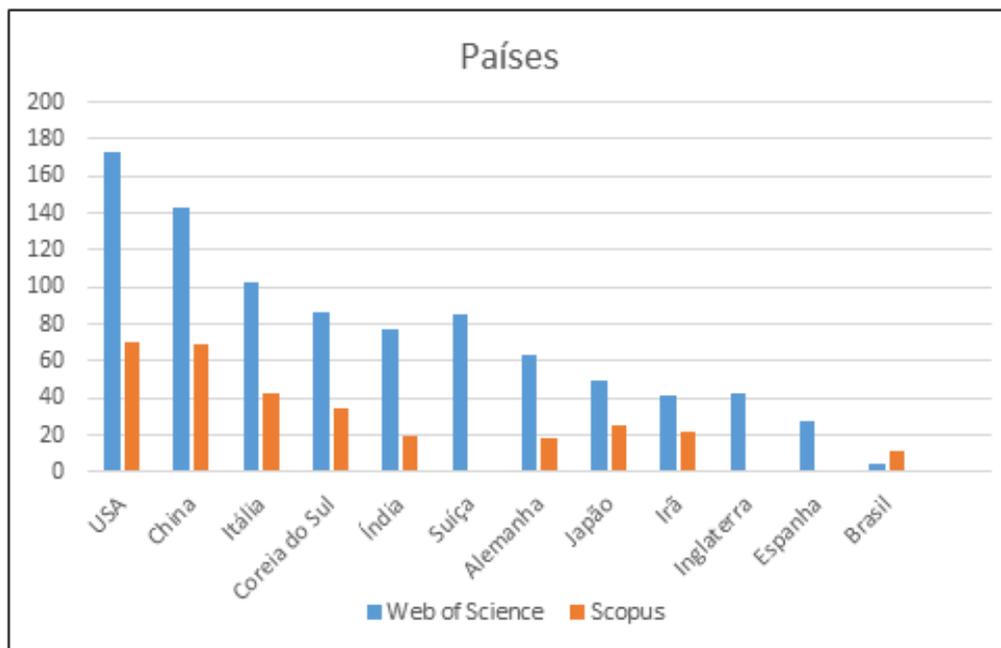


Figura 1.4 - Ranking dos países que mais publicaram artigos na *Web of Science* e *Scopus* dos biopolímeros associados à regeneração óssea na Odontologia (RO/Odonto).

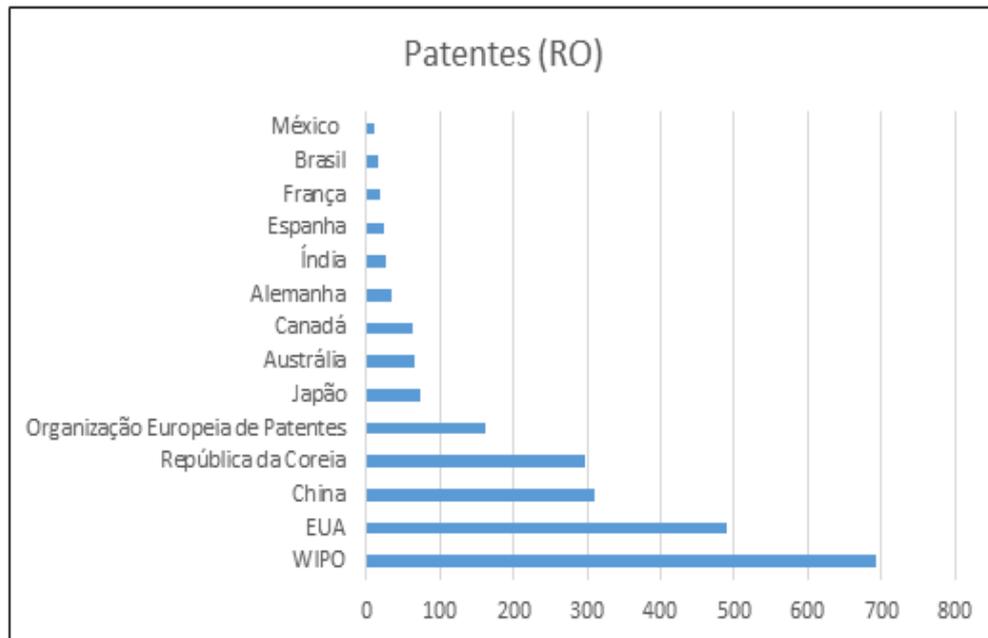


Figura 1.5 - *Ranking* dos países que mais publicaram patentes dos biopolímeros associados à regeneração óssea (RO).

Conforme apontam De Souza et al. (2021) ao realizar uma prospecção tecnológica à celulose bacteriana na área médica, a China detém o pioneirismo tanto em publicações de artigos quanto em registro de patentes. Isso ocorre porque o país asiático tem tradição no desenvolvimento científico e tecnológico em diferentes áreas, como é o caso da área biomédica. O mesmo ocorre com os EUA que detêm muitos investimentos advindos da iniciativa privada que contribuem com os avanços tecnológicos do país.

Castro Silva et al. (2012) adotaram uma pesquisa de campo aleatório de caráter exploratório e transversal na qual o público alvo foi cirurgiões-dentistas que atuaram na cidade de Niterói-RJ em maio de 2012. Através dessa pesquisa, que se deu por meio do emprego de um questionário anônimo, os autores concluíram que a compra de materiais importados para enxertos ósseos na odontologia (amplamente utilizados em regeneração óssea guiada) foi majoritariamente de origem estrangeira; mais precisamente, o dobro em relação aos produtos brasileiros. Embora o Brasil apresente boa perspectiva de evolução na área de enxertos ósseos, similar à China e Índia (ZAMANIAN, 2011), é necessário que a indústria brasileira se aprimore ainda mais a fim de conquistar a confiança de cirurgiões-dentistas que atuam no ramo.

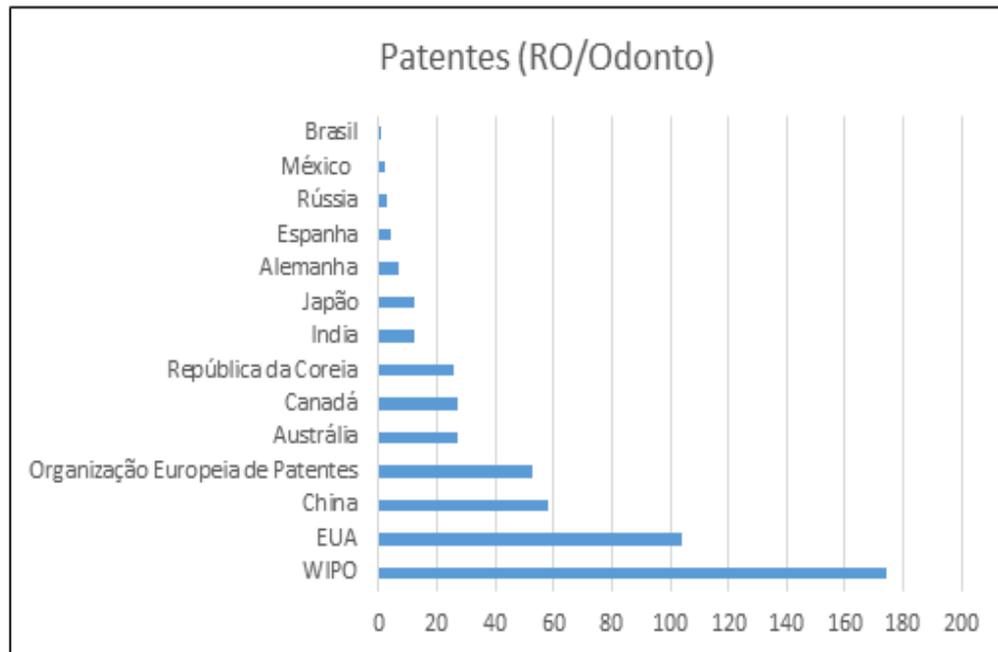


Figura 1.6 - Ranking dos países que mais publicaram patentes dos biopolímeros associada à regeneração óssea na Odontologia (RO/Odonto).

Com relação às áreas de conhecimento que publicaram nas bases *Web of Science* e *Scopus* os trabalhos referentes aos biopolímeros envolvidos nesta pesquisa, a figura 1.7 exhibe as áreas predominantes na pesquisa voltada para regeneração óssea (RO), enquanto a figura 1.8 exhibe as áreas do conhecimento dedicadas a publicações referentes à regeneração óssea na Odontologia (RO/Odonto) nas mesmas plataformas de busca.

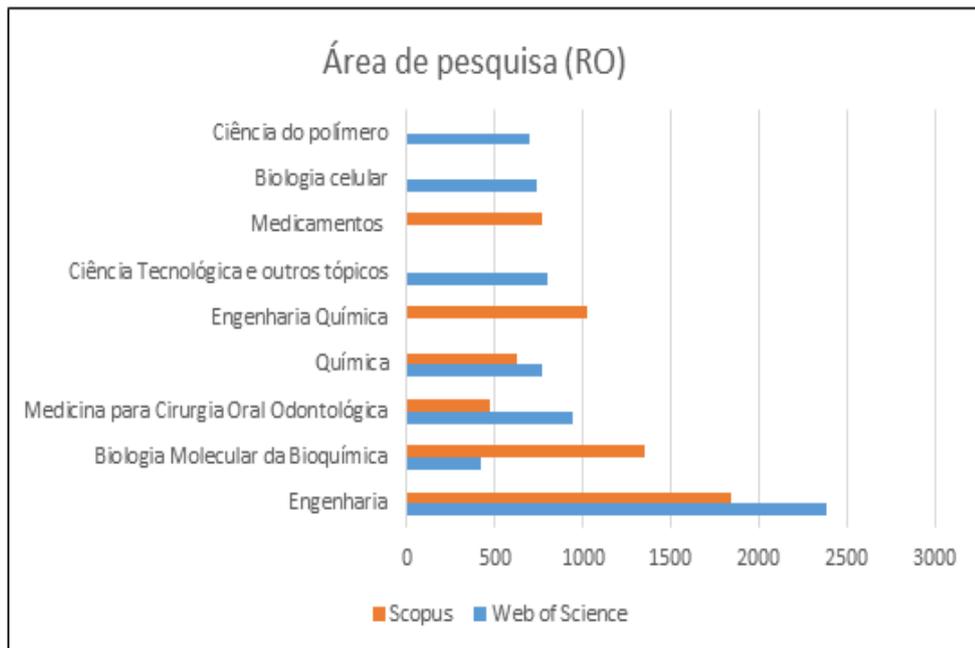


Figura 1.7 - Áreas de pesquisa predominantes nos artigos publicados na base Web of Science e na Scopus dos biopolímeros associados à regeneração óssea (RO).

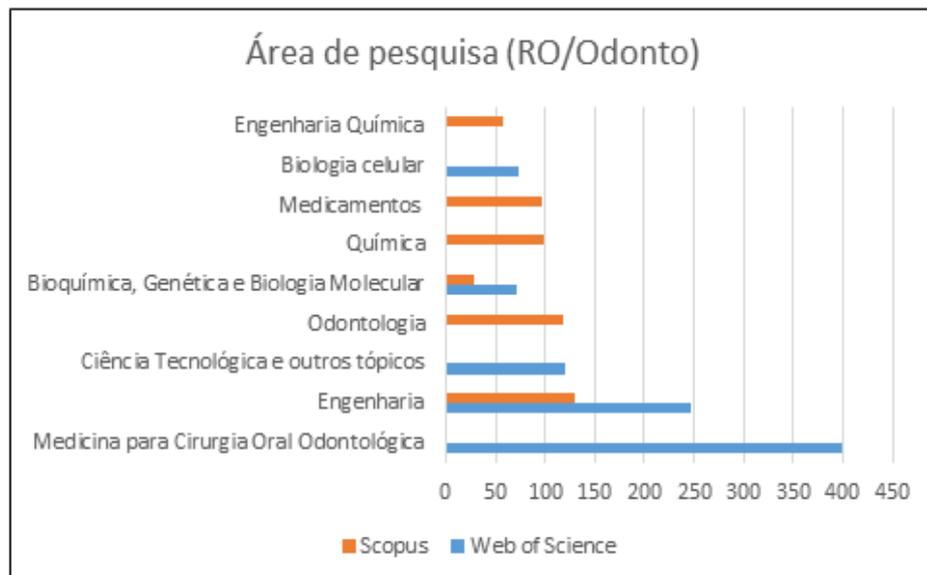


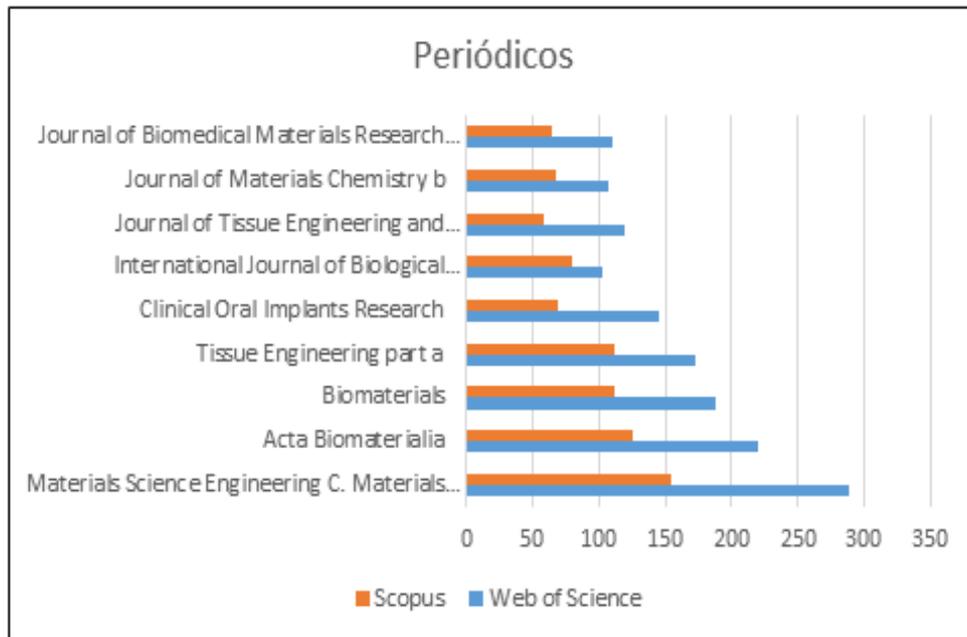
Figura 1.8 - Áreas de pesquisa predominantes nos artigos publicados na base Web of Science e na Scopus dos biopolímeros associados à regeneração óssea na Odontologia (RO/Odonto).

No que diz respeito as publicações dos biopolímeros selecionados referente a regeneração óssea (RO), a área de Engenharia foi predominante, com 2.385 artigos

na Web of Science e 1843 na Scopus, seguida pela Biologia Molecular e Bioquímica, com 425 artigos na Web of Science e 1.356 na Scopus. A área da Medicina para Cirurgia Oral Odontológica ocupou o 3º lugar, com 943 publicações na Web of Science e 476 na Scopus. Cabe destacar que a área de Engenharia inclui a Engenharia de Tecidos, que se relaciona com a proposta deste trabalho, bem como a área da Bioquímica, que envolve análises moleculares de toxicidade, caracterização de biomarcadores de toxicidade e investigação de potenciais agentes terapêuticos contra efeitos deletérios de xenobióticos. A área da Medicina Odontológica, por sua vez, possui especialidade voltada para regeneração óssea envolvendo implantes dentários. Ainda, os artigos envolvem outras áreas do conhecimento como Química, Ciência dos Polímeros e Biologia Celular.

No caso dos artigos relacionados aos biopolímeros envolvidos neste trabalho voltados para a regeneração óssea na Odontologia (RO/Odonto), a área com o maior número de publicação foi Medicina para Cirurgia Oral Odontológica, com 398 publicações na *Web of Science*. Embora a *Scopus*, não apresente essa área de pesquisa, a área da Odontologia ocupou a 4ª colocação, com 119 publicações nessa *mesma plataforma*. A área da Engenharia ficou na 2ª posição, com 246 artigos na *Web of Science* e 130 na *Scopus*. Por fim, Ciências Tecnológicas e tópicos relacionados ocupou o 3º lugar nesse ranking, com 120 publicações na *Web of Science*.

Outrossim, para os artigos publicados em periódicos na busca dos biopolímeros selecionados para regeneração óssea, o periódico *Materials Science Engineering C: Materials for Biological Applications* apareceu em 1º lugar com 289 publicações na *Web of Science* e 154 na *Scopus*, seguido pela revista *Acta Biomaterialia*, com 220 publicações na *Web of Science* e 126 na *Scopus* (Figura 1.9).



*

Figura 1.9 - Periódicos predominantes nos artigos publicados na base Web of Science e Scopus dos biopolímeros associados à regeneração óssea (RO).

Para os artigos publicados em periódicos na busca dos biopolímeros selecionados para regeneração óssea na Odontologia (RO/Odonto), o periódico *Clinical Oral Implants Research* aparece com 82 publicações na Web of Science e 14 na Scopus. A 2^a colocação é ocupada pelo periódico *Materials Science Engineering C Materials for Biological Applications*, com 29 publicações na *Web of Science* e 14 na *Scopus* (Figura 1.10).

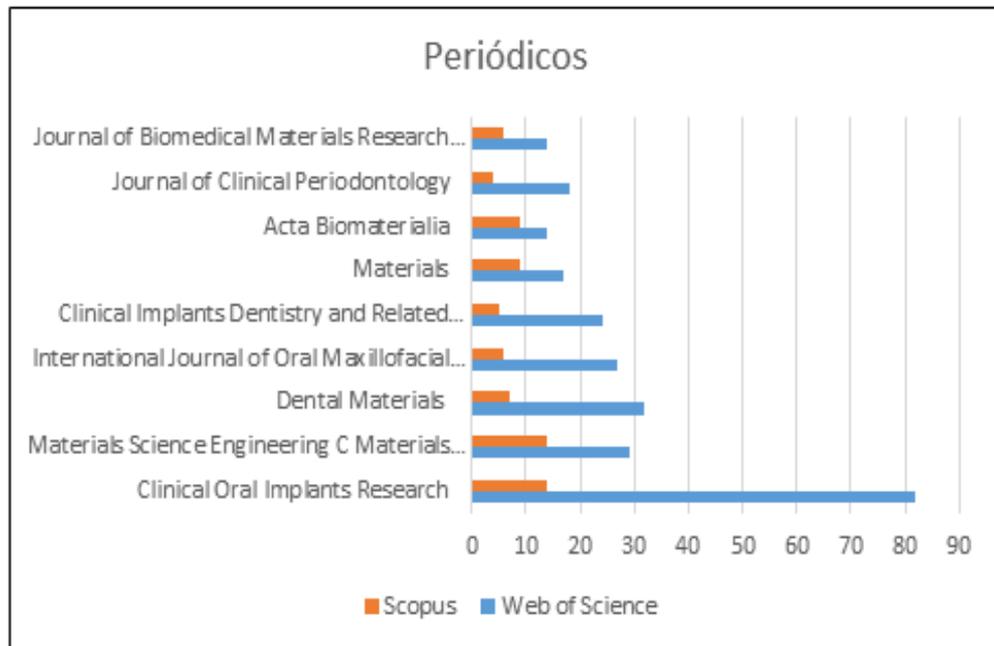


Figura 1.10 - Periódicos predominantes nos artigos publicados na base Web of Science Scopus dos biopolímeros associados à regeneração óssea na Odontologia (RO/Odonto).

Para os bancos de dados de patentes, as áreas de conhecimento são pesquisadas utilizando a Classificação Internacional de Patentes (IPC - *International Patent Classification*) criada no Acordo de Estrasburgo em 1971 (INPI, 2020). Convém destacar que a uma mesma patente são atribuídas, de maneira geral, várias classificações.

A classificação com maior número foi atribuída a A61L onde “A” corresponde a necessidades humanas, “A61” ciência médica e veterinária e “A61L” são os métodos ou aparelhos para esterilizar materiais ou objetos em geral; desinfecção, esterilização ou desodorização do ar; aspectos químicos de bandagens, curativos, almofadas absorventes ou artigos cirúrgicos; materiais para bandagens, curativos, almofadas absorventes ou artigos cirúrgicos. Outras classificações apareceram na pesquisa como A61K (fins médicos e dentários), mas foram selecionadas as 10 classificações mais citadas na somatória.

O IPC de número A61L-27/54 (figura 1.11) está relacionada às pesquisas de materiais biologicamente ativos e substâncias terapêuticas, como os biocompatíveis, biodegradáveis e sem citotoxicidade. O número A61L-27/56 se refere a materiais

porosos utilizados em *scaffolds*. A classificação A61L-27/58 é atribuída aos materiais ao menos parcialmente reabsorvíveis pelo corpo; neste caso as membranas reabsorvíveis usadas para regeneração óssea. Os outros são materiais classificados como enxertos ósseos, próteses dentárias, polissacarídeos, polipeptídeos e materiais caracterizados pela sua função ou propriedades físicas, composições injetáveis, materiais com memória de forma e materiais de superfície modificada. A classificação A61L 2/28 está relacionada a ossos.

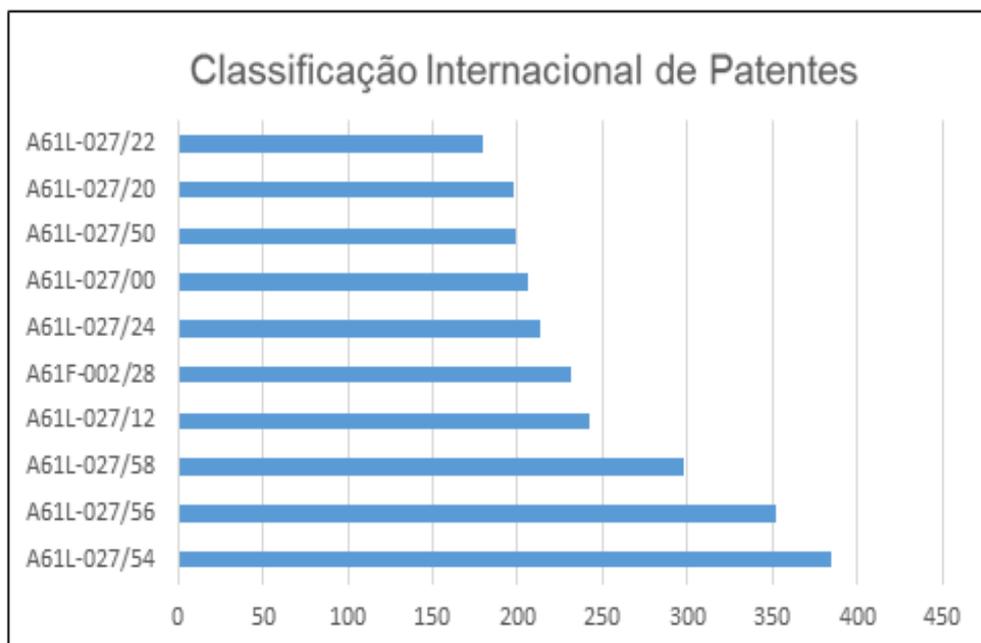


Figura 1.11 - Principais classificações atribuídas às patentes dos biopolímeros associados à regeneração óssea (RO).

Para a classificação de patentes de regeneração óssea na Odontologia, o código A61L- 27/58 (Figura 1.12) está em 1º lugar, mostrando ser patentes voltadas para criação de membranas reabsorvíveis muito utilizadas na Odontologia para regeneração óssea. Em vista disso, Ayub *et al.* (2011) analisando as técnicas para regeneração óssea guiada, concluíram que as membranas biodegradáveis se apresentam como a melhor escolha para esse procedimento. Além de não necessitarem de cirurgia para sua remoção, elas potencializam a cicatrização dos tecidos moles. Em algumas membranas ocorre incorporação pelos tecidos hospedeiros e reabsorção rápida em caso de exposição, diminuindo a probabilidade

de tomarem-se fatores retentivos que propiciam a contaminação bacteriana (LORENZONI et al., 1998).

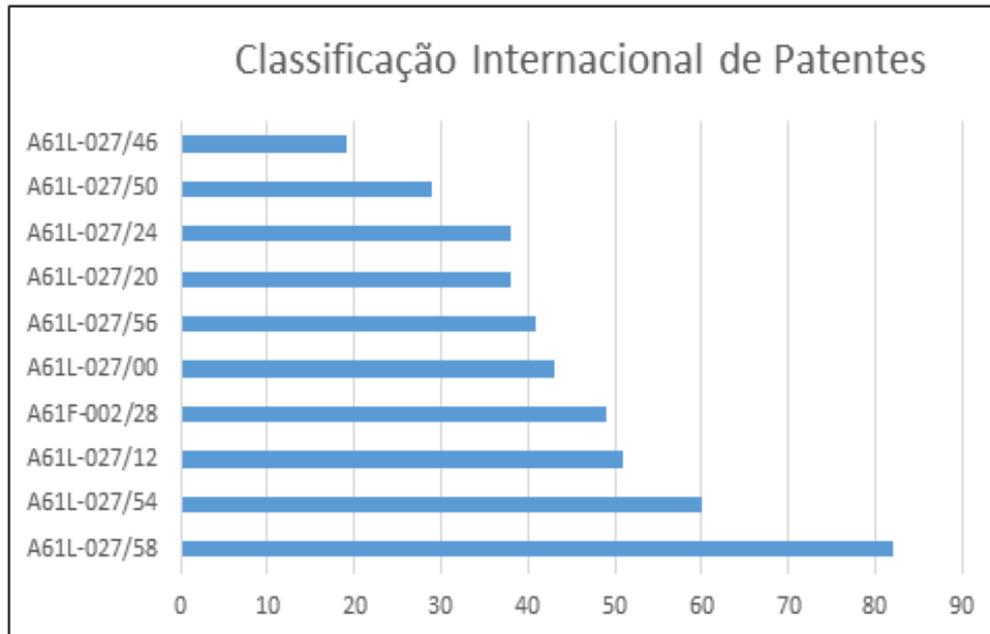


Figura 1.12- Principais classificações atribuídas às patentes dos biopolímeros associados à regeneração óssea na Odontologia (RO/Odonto).

4. CONCLUSÕES

Esta prospecção tecnológica mostrou as tendências científicas e tecnológicas acerca dos biopolímeros selecionados nesta pesquisa voltados para a regeneração óssea ocorridas entre 2010 e junho de 2021 através da exploração de dados referentes a publicações de artigos e patentes no referido período. Foi possível verificar, neste trabalho, que o colágeno foi o biopolímero mais utilizado para regeneração óssea. Inclusive foi observado um aumento significativo das publicações de artigos e patentes durante o período mapeado, embora as publicações na área odontológica tenham sido menores comparada com as publicações voltadas para a regeneração óssea no geral. Além do mais, o número de publicações de artigos verificado nesta pesquisa ao longo da última década sugere um avanço científico e tecnológico de materiais voltados a produtos naturais em uso médico e odontológico, ainda que o número de patentes seja significativamente menor dos que publicações de artigos. Diante disso, os biopolímeros usados na regeneração óssea voltados a Odontologia demonstram um caráter inovador e podem ser uma alternativa em terapias de regeneração óssea.

AGRADECIMENTOS

Hernane da Silva Barud agradece ao CNPq (Financiamento nº407822/2018-6; INCT-INFO) Fundação de amparo à pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) (Financiamento nº 2018/25512-8 e nº 2013/07793-6) e TA Instrumentos Brasil.

5. REFERÊNCIAS

- AHMED, S.; KANCHI, S.; KUMAR, G.; PUGAZHENDHI, A.; INDIRA, K.; MARY JACOB, J.; MUKESH, M.; KUMAR, G. In Handbook of Biopolymers; Jenny Stanford Publishing: Singapore, 2020; pp. 1-22.
- ARTZI, Z., KOZLOVSKY, A., NEMCOVSKY, CE, & WEINREB, M. A quantidade de osso recém-formado em procedimentos de enxerto de seio depende da profundidade do tecido, bem como do tipo e quantidade residual do material enxertado. **Journal of Clinical Periodontology**. 32 (2), 193-199. 2005.
- ASHMAN, O.; PHILLIPS, A. M. Treatment of non-unions with bone defects: which option and why?. **Injury**, v. 44, p. S43-S45, 2013.
- AYUB, L. G., JÚNIOR, A. B. N., GRISI, M. F. M., JÚNIOR, M. T., PALIOTO, D. B., & SOUZA, S. L. S. (2011). Regeneração óssea guiada e suas aplicações terapêuticas. **Braz J Periodontol**, 21(4), 24-31, 2011.
- AZEREDO, H. M., BARUD, H., FARINAS, C. S., VASCONCELLOS, V. M., & CLARO, A. M. Bacterial cellulose as a raw material for food and food packaging applications. **Frontiers in Sustainable Food Systems**, 3, 7. 2019.
- BORSCHIVER, Suzana; ALMEIDA, Luiz FM; ROITMAN, Tamar. Monitoramento tecnológico e mercadológico de biopolímeros. **Polímeros**, v. 18, n. 3, p. 256-261, 2008.
- CASTRO-SILVA, I. I. & Coutinho, L. A. C. R. Uso de enxertos ósseos na Odontologia: perfil de cirurgiões-dentistas de Niterói/RJ. **Revista Brasileira de Odontologia**, 69 (2), 154–158.2012.
- CASTRO-SILVA, I. I., ARAÚJO, L. K., DE SOUZA, F. F. P., PONTE, J. S., DE SOUSA, E. M., JIMÉNEZ, H. G. Q., ... & DE MELO, M. M. Pesquisa odontológica brasileira em regeneração óssea guiada: um estudo bibliométrico de quatro décadas. **Research, Society and Development**, 10(2), e25510212504-e25510212504. 2021.
- CHEN, C., Li, H., PAN, J., YAN, Z., YAO, Z., FAN, W., & GUO, C. Biodegradable composite scaffolds of bioactive glass/chitosan/carboxymethyl cellulose for hemostatic and bone regeneration. **Biotechnology letters**, 37, 457-465.2015.
- CHEN, I.-Hao; LEE, Tzer-Min; HUANG, Chih-Ling. Biopolymers Hybrid Particles Used in Dentistry. **Gels**, v. 7, n. 1, p. 31, 2021.
- COSTA, V. C., DE CARVALHO BIANCHI, C. M. P., GARGIONE, A. C., DE LOURDES CREPALDI, M., OLIVEIRA, B. L., AGUIAR, A. P., ... & Deps, T. D. Membranas para Barreira Utilizadas em Regeneração Óssea Guiada (ROG). **Revista Faipe**, 11(1), 48-57. 2021.
- DAHLIN, C.; SIMION, M.; HATANO, N. Long-term follow-up on soft and hard tissue levels following guided bone regeneration treatment in combination with a xenogeneic filling material: a 5-year prospective clinical study. **Clinical implant dentistry and related research**, v. 12, n. 4, p. 263-270, 2010.
- DE SOUSA, R. C., VIANA, V. G. F., CARVALHO, L. F. M., & VASCONCELOS, D. F. P. Uso de Poli-hidroxibutirato e Norbixina como Biomaterial para Regeneração Óssea: um mapeamento tecnológico. **Cadernos de Prospecção**, 13(3), 805-805.2020.

DE SOUSA, Ricardo Barbosa et al. Celulose Bacteriana para Aplicações Biomédicas: uma prospecção tecnológica. 2021 , p. 1-388–416.

FARDIN, Angélica Cristiane et al. Bone graft in dentistry: review of literature. **Innovations Implant Journal**, v. 5, n. 3, p. 48-52, 2010.

FERREIRA, A. M., GENTILE, P., CHIONO, V., & CIARDELLI, G. Collagen for bone tissue regeneration. **Acta biomaterialia**, 8(9), 3191-3200. 2012

FILLINGHAM, Yale A.; LENART, Brett A.; GITELIS, Steven. Function after injection of benign bone lesions with a bioceramic. **Clinical Orthopaedics and Related Research®**, v. 470, n. 7, p. 2014-2020, 2012.

GEORGE, Ashish et al. A comprehensive review on chemical properties and applications of biopolymers and their composites. **International journal of biological macromolecules**, v. 154, p. 329-338, 2020.

GREGORY, Paul et al. Introduction: biopolymers and biocomposites. **Physical Sciences Reviews**, 2021.

HARDWICK, R. et al. Parameters used in the membrane shape for guided bone regeneration of the alveolar crest. In: BUSER, D.; DAHLIN, C.; SCHENK, R. K. (Ed.). *Guided bone regeneration in implant dentistry*. São Paulo: **Quintessence**, 1996. p. 101-36.

INSTITUTO NACIONAL DE PROPRIEDADE INDUSTRIAL - INPI, Classificação de patentes. Disponível em: <<http://antigo.inpi.gov.br/menu-servicos/patente/classificacao-de-patentes>> Acesso em: 13 out. 2020.

KEIL, Christiane et al. Histological evaluation of extraction sites grafted with Bio-Oss Collagen: Randomized controlled trial. **Annals of Anatomy-Anatomischer Anzeiger**, v. 237, p. 151722, 2021

LORENZONI, M. et al. Treatment of peri-implantar defects with guided bone regeneration: a comparative clinical study with various membranes and bone grafts. **Int J. Oral Maxillfac. Implants**, v.13, p.639-646, 1998.

MACEDO, Nelson Luiz de et al. Guided bone regeneration with subperiosteal implants of PTFE and hydroxyapatite physical barriers in rats. **Brazilian dental journal**, v. 14, n. 2, p. 119-124, 2003.

MARTINS-JÚNIOR, P. A. et al. Carbon nanotubes: directions and perspectives in oral regenerative medicine. **Journal of dental research**, v. 92, n. 7, p. 575-583, 2013.

MATASSI, Fabrizio et al. New biomaterials for bone regeneration. **Clinical cases in mineral and bone metabolism**, v. 8, n. 1, p. 21, 2011.

MYEROFF, Chad; ARCHDEACON, Michael. Autogenous bone graft: donor sites and techniques. **JBJs**, v. 93, n. 23, p. 2227-2236, 2011.

NAZIRKAR, Girish et al. Effortless effort in bone regeneration: a review. *Journal of international oral health*: **JIOH**, v. 6, n. 3, p. 120, 2014.

PELTONIEMI, Hilikka et al. The use of bioabsorbable osteofixation devices in craniomaxillofacial surgery. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology**, v. 94, n. 1, p. 5-14, 2002.

PRIESNITZ, Mariane Camargo et al. Implantes dentários: uma prospecção tecnológica. In: V ENPI-Encontro Nacional de Propriedade Intelectual. 2019.

RAKHMATIA, Y. D. et al. Current barrier membranes: titanium mesh and other membranes for guided bone regeneration in dental applications. **J. Prosthodontic Res.**, Iowa City. v. 57, n. 1, p. 3-14, 2013.

ROCHA, Angela M.; QUINTELLA, Cristina M.; TORRES, Ednildo A. Prospecting for articles and patents on biocompatible polymers applied to Tissue Engineering and Regenerative Medicine. **Prospecting Notebooks**, v. 5, no. 2, p. 72, 2012.

RONDA, M. et al. Expanded vs. dense polytetrafluoroethylene Alan Dal'alba Pilger et al. 448 **Rev. Ciênc. Méd. Biol.**, Salvador, v. 19, n. 3, p. 441-448, set./dez., 2020

ROSENDO, Rosana Araujo et al. Estruturas de quitosana utilizadas para regeneração óssea in vivo: uma revisão de literatura. **Research, Society and Development**, v. 9, n. 7, p. e891974538-e891974538, 2020.

SAIMA, Syed et al. Bone grafts and bone substitutes in dentistry. **Journal of Oral Research and Review**, v. 8, n. 1, p. 36, 2016.

SAREETHAMMANUWAT, Maytha; BOONYUEN, Supakorn; ARPORNMAEKLONG, Premjit. Effects of beta-tricalcium phosphate nanoparticles on the properties of a thermosensitive chitosan/collagen hydrogel and controlled release of quercetin. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v. 109, n. 7, p. 1147-1159, 2021.

STEVENS, Molly M. Biomaterials for bone tissue engineering. *Materials today*, see 11, no. 5, p. 18-25, 2008.

TAMIMI, Faleh et al. Brushite–collagen composites for bone regeneration. **Acta biomaterialia**, v. 4, n. 5, p. 1315-1321, 2008.

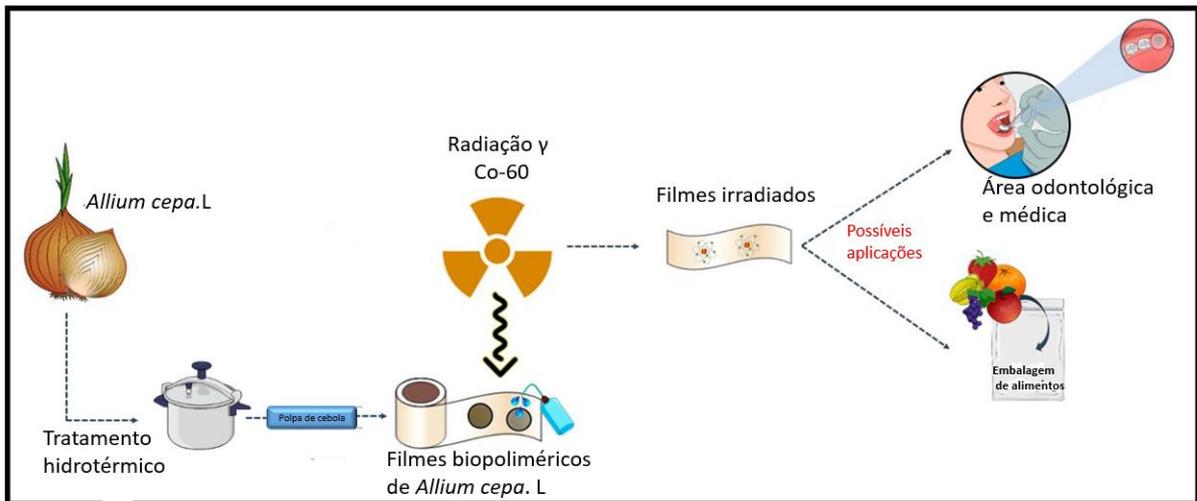
UDAYAKUMAR, Gowthama Prabu et al. Biopolímeros e compósitos: Propriedades, caracterização e suas aplicações nas indústrias alimentar, médica e farmacêutica. *Journal of Environmental Chemical Engineering* , v. 9, n. 4, pág. 105322, 2021.

VAN DE VELDE, Kathleen; KIEKENS, Paul. Biopolymers: overview of several properties and consequences on their applications. **Polymer testing**, v. 21, n. 4, p. 433-442, 2002.

ZAMANIAN, K., TENG, S. China, India, and Brazil expect extensive growth in dental implant, final abutments, and bone graft substitute markets [texto da Internet]. 2011

CAPÍTULO 2- FILMES AUTO-SUSTENTÁVEIS À BASE DE BULBO DE CEBOLA (*ALLIUM CEPA* L.): EFEITOS DA RADIAÇÃO GAMA EM DOSES ESTERILIZANTES

GRAPHICAL ABSTRACT



RESUMO

A esterilização consiste em uma etapa fundamental para a eliminação de microrganismos antes da aplicação de alguns produtos, principalmente nos âmbitos alimentício e médico. A irradiação γ é um dos métodos mais recomendados e eficazes usados para esterilização, mas seu efeito nas propriedades e no desempenho dos polímeros de base biológica é escasso. Assim, este trabalho teve como objetivo avaliar a influência da aplicação de doses de radiação γ de 5, 10, 15, 25, 30 e 40 kGy na morfologia, propriedades e desempenho de filmes produzidos a partir de bulbo de cebola (*Allium cepa* L.) usando um tratamento hidrotérmico. Esses procedimentos diferem em termos de lavagem da polpa antes da produção do filme, sendo denominados polpa tratada hidrotérmicamente não lavada (HTP) e polpa tratada hidrotérmicamente lavada (W-HTP). A análise morfológica indicou que as superfícies dos filmes tornaram-se progressivamente mais rugosas e irregulares para doses acima de 25 kGy, fator que contribuiu para um leve aumento em sua hidrofobicidade, principalmente para as amostras W-HTP. Além disso, os resultados de FTIR e DRX evidenciaram uma mudança nos grupos estruturais e químicos que constituem as amostras após a irradiação. Houve aumento do índice de cristalinidade e predominância da interação da radiação com os grupos hidroxila – mais suscetíveis ao efeito oxidativo – além da clivagem de ligações químicas em função da dose de radiação γ . A presença de carboidratos solúveis influenciou o comportamento mecânico das amostras, sendo o HTP mais dúctil que o W-HTP, mas a radiação γ não causou alteração nas propriedades mecânicas proporcionalmente à dose. Para os filmes W-HTP, foi evidenciada ausência de mutagenicidade e citotoxicidade – mesmo após irradiação γ com doses mais altas. Em conclusão, as propriedades e características dos filmes à base de cebola apresentaram variações significativas dependendo da dose de radiação γ . Eles também respondem de forma diferente à radiação devido à alteração na composição química proporcionada pela lavagem, fator que influencia seu potencial para serem aplicados como embalagens de alimentos ou dispositivos biomédicos.

Palavras-chave: filmes à base de cebola; fundição; efeito de lavagem; esterilização; radiação γ .

ABSTRACT:

Sterilization consists of a fundamental step for the elimination of microorganisms prior to the application of some products, especially on food and medical scopes. γ -irradiation is one of the most recommended and effective methods used for sterilization, but its effect on the properties and performance of bio-based polymers is scarce. Thus, this work aimed to evaluate the influence of the application of γ -radiation doses of 5, 10, 15, 25, 30, and 40 kGy on the morphology, properties, and performance of films produced from onion bulb (*Allium cepa* L.) using one hydrothermal treatment. These procedures differ in terms of washing the pulp prior to film production, being referred to as unwashed hydrothermally treated pulp (HTP) and washed hydrothermally treated pulp (W-HTP). The morphological analysis indicated that the film surfaces became progressively rougher and irregular for doses above 25 kGy, a factor that contributed to a slight increase in their hydrophobicity, especially for the W-HTP samples. In addition, the FTIR and XRD results evidenced a change in the structural and chemical groups constituting the samples after irradiation. There was an increase in the crystallinity index and a predominance of the interaction of radiation with the hydroxyl groups – more susceptible to the oxidative effect – besides the cleavage of chemical bonds depending on the dose of γ -radiation. The presence of soluble carbohydrates influenced the mechanical behavior of the samples, being the HTP more ductile than W-HTP, but γ -radiation did not cause a change in mechanical properties proportionally to the dose. For the W-HTP films, an absence of mutagenicity and cytotoxicity – even after γ -irradiated with higher doses – was evidenced. In conclusion, the properties and characteristics of the onion-based films presented significant variations depending on the dose of γ -radiation. They also respond differently to radiation due to the change in the chemical composition provided by washing, a factor that influences their potential to be applied as food packaging or biomedical devices.

Keywords: onion-based films; casting; effect of washing; sterilization; γ -radiation.

1- INTRODUÇÃO

A cebola (*Allium cepa* L.) é uma hortaliça amplamente cultivada e consumida. Fisiologicamente, a cebola é uma modificação subterrânea do caule denominado bulbo representado com raízes adventícias da face inferior e folhas carnosas (comestíveis) dispostas concêntricamente na face superior do caule reduzido. O bulbo é coberto por uma bainha de escamas membranosas secas chamada túnica (pele protetora externa seca colorida) (BREWSTER, 2008; BELL, 1991). A parede celular da cebola é composta de celulose, que protege as células e mantém sua forma (DOS SANTOS DIAS et al., 2020).

Os benefícios para a saúde da cebola são atribuídos principalmente a diversos componentes, e estudos demonstraram suas notáveis funções para a saúde (LEE et al., 2016; TSUBOKI et al., 2016; COLINA COLA et al., 2017; OUYANG et al., 2018; LOREDANA et al., 2019; JINI, 2020; JAKARIA, 2019). Ela é constituída de 90% de água, 1,5% de proteínas solúveis, 0,1% de gorduras e 8,7% de carboidratos estruturais e não estruturais (PEIRCE et al., 1987; BENKEBLIA AND SHIOMI, 2006; JAIME et al., 2001), flavonoides em baixa concentração (RHODES AND PRICE, 1996), antocianinas (GENNARO et al., 2002), compostos lacrimogêneos e saborosos como ácidos sulfônicos, amônios (JONES et al., 2004; ROSE et al., 2005; LIGUORI et al., 2017), metabólicos primários como sulfóxido de S-metil-cisteína (MCSO, metiina, sulfóxido de S-alil-cisteína, S-transprop-1-enil-cisteína sulfóxido) e sulfóxido de S-propilcisteína (UEDA, 1994; JONES et al., 2004) e presença de níveis altos de ácidos galacturônicos (GOLOVCHENKO, 2012; REDGWELL AND SELVENDRAN, 1986).

A necessidade de se utilizar materiais biocompatíveis, de fácil produção e de baixo custo tem sido foco de muitas pesquisas. O filme de cebola é produzido usando métodos de processamento inteiramente aquosos e, devido a uma interação favorável com as células, têm sido estudados como um suporte potencial para engenharia de tecidos e medicina regenerativa (GANGOPADHYAY et al., 2014; CHAKRABORTY et al., 2022) uma vez que o uso de produtos naturais tornou-se uma tendência no mundo científico, principalmente na formação de compósitos com a finalidade de uso terapêutico ou até mesmo em substituição de produtos de difícil degradação.

A cebola já é um produto pesquisado e usado em algumas formulações para tratamento tópico de cicatrização (FAVERET, 2015), como de embalagens para alimentos (OTONI et al., 2014) bem como um novo biopolímero obtido empregado para produzir substratos sustentáveis para diodos emissores de luz orgânicos flexíveis (FOLEDs). (FARACO et al., 2019) e também um estudo que verificou o perfil citotóxico e mutagênico de filmes poliméricos de *Allium cepa* L. obtidos pelo processo de casting para verificar sua segurança para fins comerciais (BARRETO et al., 2020) e Soares et al. (2021) pesquisaram efeito do filme de cebola comestível (*Allium cepa* L.) na qualidade, propriedades sensoriais e vida de prateleira de hambúrgueres bovinos

As técnicas de esterilização em filmes de cebola não foram estudadas extensivamente, especialmente as pesquisas sobre esterilização por radiação permanecem limitadas. No entanto, a radiação tornou-se uma técnica de esterilização comercial alternativa para eliminar ou reduzir organismos patogênicos e melhorar a qualidade do produto e a vida útil (IAEA, 2018). Além disso, tem benefícios potenciais em relação às técnicas tradicionais de esterilização, como produtos químicos e calor, devido à penetração profunda no material (IAEA, 2018; VAN CAUWENBERGH, 2022)

A radiação γ é o método mais utilizado de esterilização por radiação. Outros métodos de esterilização por radiação são a esterilização por feixe de elétrons ou raios-X. O cobalto-60 (Co-60) é comumente usado como fonte de radiação γ e foi autorizado pela Food and Drug Administration (FDA) dos EUA para ser usado em processos de esterilização de alimentos, produtos farmacêuticos e materiais de embalagem (FDA, 2001). As doses máximas de radiação, um fator importante para alcançar a esterilidade, são definidas para várias categorias de alimentos pela regulamentação da FDA sob 21 CFR179.26 (FDA, 2005; FOOD,2005). A dose de radiação de 25 kGy tem sido recomendada para esterilização de produtos de saúde (IAEA, 2008; SANT, 2022), no entanto, é importante investigar a efeitos da radiação nas propriedades físicas do material em doses em torno da dose de esterilização, a fim de obter informações sobre a resistência à radiação do material.

Materiais poliméricos submetidos à esterilização por radiação podem sofrer diversos danos em suas propriedades induzidos pelo processo de esterilização. Então, os efeitos pós-irradiação em materiais também são importantes para caracterizar. Desta forma, avaliar o efeito da irradiação para esterilizar os filmes de *Allium cepa* L é de suma importância para uso deste bioplástico como membranas

para regeneração óssea. As membranas derivadas de colágeno são constituídas de puro colágeno suíno tipo I e tipo III, extraído de porcos com certificado veterinário de cautelosa esterilização (para prevenir respostas antigênicas do paciente), sendo realizada por radiação gama.

Este estudo enfoca o efeito da radiação Co-60 γ sobre as propriedades físicas, químicas, térmicas, mecânicas e citotóxicas e mutagenicidade de filmes de cebola com diferentes níveis de dose de intensidade de radiação ionizante. Além disso, o efeito da radiação nos biomateriais foi comparado entre si, tendo os materiais não irradiados como controle.

2. OBJETIVO

Avaliar a influência da aplicação de doses de radiação γ de 5, 10, 15, 25, 30 e 40 kGy na morfologia, propriedades e desempenho de filmes produzidos a partir de bulbo de cebola (*Allium cepa* L.) lavados (W-HTP) e não lavados (HTP).

2.1 OBJETIVO ESPECÍFICOS

- Avaliar os filmes com tratamentos hidrotérmicos lavados e não lavados;
- Estudar os efeitos da irradiação dos filmes por radiação γ nas doses de 5, 10, 15, 25, 30 e 40 kGy;
- Caracterizar os filmes não irradiados e irradiados.

3- MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Produção de filmes à base de cebola

Os filmes de cebola foram produzidos utilizando a tecnologia pertencente à BioSmart Nanotechnology que foi desenvolvida pelo Dr. Diógenes projeto PIPE Fase I (N do processo: 2016/15504-2) (DOS SANTOS DIAS et al., 2020)

Após esses procedimentos, os filmes foram preparados por casting. Para isso, a suspensão aquosa contendo a polpa de cebola foi vertida em placas de Petri e seca a 40°C por 6 h em câmara de aquecimento (Quimis, 0314M272, Brasil). Em seguida os filmes foram lacrados com seladora num papel grau e identificados Fig 1.

3.2. Radiação Co-60 γ

Os filmes HTP e W-HTP foram irradiados com raios γ em diferentes doses – 5, 10, 15, 25, 30 e 40 kGy – no Laboratório de Radiação Gama (GAMALAB, Departamento de Energia Nuclear, Universidade Federal de Pernambuco – UFPE). Ele usou um irradiador Co-60 (Gammacell GC220, MDS Nordion, Canadá) com uma energia γ de c.a. 1,25 MeV, sob uma taxa de 1,44 kGy/h.

3.3 Caracterizações de filmes

3.3.1- Microscopia eletrônica de varredura por emissão de campo (FE-SEM)

A morfologia dos filmes HTP e W-HTP foi analisada por um microscópio FE-SEM (JSM-7500F, JEOL, Japão) no modo de elétron secundário. Foram aplicados 2 kV de tensão de aceleração, 10 μ A de corrente de emissão e uma distância de trabalho de c.a. 8 milímetros.

3.3.2 Termogravimetria (TG) e Termogravimetria derivada (DTG)

O comportamento térmico de amostras de filme de cebola também foi estudado via TG e DTG usando um módulo de análise térmica simultânea – equipamento SDT (Q 600, TA Instruments, EUA). A análise foi realizada em atmosfera inerte com taxa de 100 ml min⁻¹. Cerca de 5 mg dos filmes foram pesados em cadinho

de Al_2O_3 (precisão: 0,1 μg), e suas variações térmicas foram avaliadas desde a temperatura ambiente até 500 $^\circ\text{C}$ a 30 $^\circ\text{C min}^{-1}$.

3.3.3 Calorimetria exploratória diferencial (DSC)

As transições térmicas das amostras foram investigadas via DSC (DSC 1 STARe, Mettler Toledo, Brasil). As condições experimentais foram atmosfera de ar estático, massa de amostra em torno de 6 mg em cadinho de alumínio aberto e taxas de resfriamento ou aquecimento de 10 $^\circ\text{C min}^{-1}$. Primeiro aquecimento da temperatura ambiente até 140 $^\circ\text{C}$ para remover a umidade, depois o resfriamento até -50 $^\circ\text{C}$ e, finalmente, reaquecimento até 130 $^\circ\text{C}$.

3.3.4 Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

A composição química foi investigada qualitativamente por meio de FTIR usando o acessório de reflexão total atenuada (ATR) (Cary 630, Agilent Technologies, EUA). Os dados foram coletados em modo de transmitância para números de onda de 4000 a 400 cm^{-1} com resolução de 4 cm^{-1} . Para cada amostra, foram realizadas 32 varreduras.

3.3.5 Difração de raios X (DRX)

As estruturas dos filmes HTP e W-HTP foram analisadas por difração de raios X (DRX-6000, Shimadzu, Japão). Os difratogramas foram obtidos para ângulos de Bragg (2θ) entre 5 e 35 $^\circ$, com velocidade de varredura e resolução de 4 $^\circ \text{min}^{-1}$ e 0,02 $^\circ$, respectivamente. O difratômetro foi operado usando radiação $\text{CuK}\alpha$ a 40 kV e 30 mA. As curvas foram deconvolutas considerando uma Função Gaussiana, visando distinguir os picos cristalinos dos halos amorfos e então determinar o índice de cristalinidade (Crl) de acordo com a Equação (1), onde $I(200)$ e I_{am} representam a intensidade máxima do pico cristalino em relação ao plano (200) e a intensidade mínima entre os picos de (110) e (200) para $2\theta \approx 18^\circ$, nesta ordem (SEGAL et al., 1959)

Os bioplásticos foram analisados em difratômetro de raios X D8-Advance (Bruker). A análise foi em 2 intervalo entre 4 $^\circ$ e 80 $^\circ$ com um tamanho de passo de 0,02 $^\circ$ em um modo contínuo de 1 $^\circ/\text{min}$, uma fenda Soller de divergência de 2,5 $^\circ$ e Detector sensível à posição Lynxeye.

$$CrI (\%) = \frac{I_{(200)} - I_{am}}{I_{am}} \quad (1).$$

3.3.6 Propriedades mecânicas

As propriedades mecânicas dos filmes foram avaliadas por ensaio de tração uniaxial (DL-2000, Emic, Brasil). A configuração do teste envolveu o uso de uma célula de carga de 50 kgf, 10 mm de distância inicial e velocidade da cruzeta de 0,83 mm s⁻¹. A resistência à tração final, o alongamento na ruptura e o módulo de Young foram obtidos do software Tesc v3.04.

3.3.7 Medidas do ângulo de contato aparente

A molhabilidade do filme à base de cebola foi avaliada usando um goniômetro (260 F4, Ramé-Hart, EUA). O teste foi realizado em modo estático, utilizando água destilada como líquido da sonda. Os dados foram calculados automaticamente pelo software DROPimage Advanced V2.7 e foram expressos como uma média entre nove medições diferentes em intervalos de 0,001 s por medição após a deposição das gotas de água nas superfícies dos filmes.

3.3.8 Propriedades de barreira

O conjunto de análise para o estudo das propriedades de barreira dos filmes de cebola incluiu o coeficiente de permeabilidade (α), taxa de transmissão de vapor d'água (TPVA) e permeabilidade ao vapor d'água (PVA). Para os experimentos TPVA, 5 g de CaCl₂ anidro – previamente seco a 200 °C por 1 h – foram colocados dentro de frascos ($\emptyset = 30$ mm; altura = 75 mm) com roscas perfuradas. Os filmes HTP e W-HTP foram cortados em forma circular com diâmetro igual a 15 mm e foram colocados na superfície aberta dos frascos. Em seguida, os frascos foram inseridos em um reator contendo 100 ml de solução aquosa de NaCl e mantidos à temperatura de 30 ± 2 °C, e os frascos foram pesados a cada hora por 8 h. O TPVA foi determinado posteriormente através da Equação (2), em que α e A representam a massa de umidade permeada durante este tempo (g h⁻¹) e a área da amostra disponível para permeação (m²), respectivamente.

$$TPVA = \frac{\alpha}{A} \quad (2)$$

O PVA foi calculado de acordo com uma modificação da metodologia do copo gravimétrico descrita por McHugh et al. (1993), que é baseado no padrão ASTM E96M-16 (2016). Para esta propriedade, a espessura dos filmes (e) foi levada em consideração no cálculo, que foi feito pela Equação (3). RH e Pv são a umidade relativa (cerca de 75%) e a pressão de vapor (31,824 mmHg), nesta ordem.

$$PVA = \frac{100 \cdot TPVA \cdot e}{Pv \cdot RH} \quad (3).$$

3.3.9 Ensaios de mutagenicidade

Os ensaios de mutagenicidade foram conduzidos de acordo com a metodologia de pré-incubação desenvolvida por Maron et al. (1983), seguindo a norma ISO 10993-12 para preparo das amostras (ISO, 2021). Primeiramente, os filmes foram cortados em pedaços com área de 6 cm² e incubados com 1 ml de solução tampão a 37 °C por 72 h, para obtenção do eluato. Em seguida, 100 µl deste eluato foram avaliados na cepa de *Salmonella typhimurium* – TA98 e TA102 – Aos eluatos de filmes com diferentes doses de radiação foram adicionados 0,5 ml de tampão fosfato 0,2 M e 0,1 ml da cultura de *Salmonella typhimurium* preparada foram incubados a 37 °C por 20 a 30 min. Após esse período, 2 ml de ágar superior – suplementado com traços de L-histidina e D-biotina – foram adicionados à mistura e despejados em uma placa contendo ágar mínimo. Finalmente, as placas foram incubadas a 37 °C por 48 h, e o número de colônias revertentes em cada local foi determinado manualmente. Como controles positivos, foram utilizados 4-nitro-o-fenilenodiamina (10 µg/placa), para a cepa TA98, e mitomicina C, para a cepa TA102 (0,5 µg/placa). O controle negativo não teve tratamento e consistiu na taxa de reversão espontânea de cada cepa. Os resultados foram analisados estatisticamente usando o programa estatístico GraphPad Prism 7 (Graph-Pad Software Inc., San Diego, EUA), por análise de variância (ANOVA) de uma via, complementada pelo teste post hoc de Dunnett. Este teste foi realizado em comparação com o grupo controle (controle não tratado do ensaio), e o índice de mutagenicidade (IM) foi calculado de acordo com a Equação (4), com o número médio de revertentes por placa com o composto de teste dividido pela média número de revertentes por placa com o controle negativo. Uma amostra é considerada mutagênica se a variação da ANOVA for significativa, com $p < 0,05$ e o

número médio de revertentes aumentar da amostra um mínimo de duas vezes o encontrado no controle não tratado ($MI > 2$) (ISO, 2021; MORTELMANS, 2000).

$$IM = \frac{\text{número de revertentes}}{\text{placa}} \quad (4)$$

3.3.10 Ensaios de citotoxicidade

Foi utilizado cloridrato de resazurina (Sigma-Aldrich) como substância reveladora, que possui potencial redox (oxide-reduction), com alteração colorimétrica e indicador de fluorescência em resposta ao metabolismo celular, conforme protocolo de Page et al. (1993). A linhagem celular de queratinócitos humanos (HaCat) foi mantida em monocamada em frascos de cultura de 25 ou 75 cm² (Corning) a 37°C em uma atmosfera de 5% de dióxido de carbono (CO₂) e 95% de ar sob umidade saturada e cultivada em meio DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino. Em seguida, as células HaCaT foram semeadas em microplacas de 96 poços a uma densidade de 1,0 x 10⁴ células/poço, seguidas de incubação por 24 horas para adesão celular. Para o tratamento, os eluatos foram previamente preparados em meio de cultura e adicionados em placa de 96 poços com as células cultivadas em monocamadas. Posteriormente, foi realizada diluição seriada ao longo da placa, obtendo-se assim concentrações de 100, 50, 25, 12,5, 6,25 e 3,125% de eluato. Controles negativos (sem tratamento) e positivos (dimetilsulfóxido, 50% DMSO) também foram incluídos. Após os tratamentos, as células foram incubadas por 24 horas. Em seguida, o meio de cultura foi removido e 50 µL de cloridrato de resazurina 0,01% (m/v) foram adicionados e incubados por 4 horas. A fluorescência foi lida em um espectrofluorímetro (Cary Eclipse, Agilent Technologies, EUA) em comprimentos de excitação e emissão de 560 e 590 nm, respectivamente. Os resultados obtidos foram expressos em porcentagem do controle negativo que foi considerado 100% de viabilidade celular. Os dados foram verificados quanto à normalidade pelo teste K-S (teste de Kolmogorov-Smirnov) e submetidos à análise de variância (ANOVA) seguida do pós-teste de comparação de Dunnett, tendo como referência o controle negativo. A análise estatística e os gráficos foram realizados no programa GraphPad Prism 9 para Windows 10 (Intuitive Software for Science, San Diego, CA, EUA).

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1. Morfologia do filme - Microscopia eletrônica de varredura por emissão de campo (FE-SEM)

O efeito da lavagem da polpa e da aplicação de diferentes doses de radiação γ na morfologia de filmes à base de cebola foram avaliados via FE-SEM (Figura 2.1). Primeiramente, para os materiais não irradiados, observa-se que as amostras não lavadas HTP apresentam uma superfície mais densa, homogênea, uniforme e lisa em relação ao filme W-HTP. Estes últimos apresentam várias irregularidades de superfície que resultam em aumento da rugosidade, mas não existem trincas nem vazios. Dos Santos Dias et al. (2020) analisaram previamente a seção transversal desses materiais, e os resultados indicaram uma superfície de fratura mais coesa para os filmes HTP. A lavagem levou a morfologias distintas no estrato superior e inferior em que foram visualizadas irregularidades e a presença de algumas fissuras, respectivamente (DOS SANTOS DIAS et al., 2020). Essa mudança na morfologia é atribuída à presença de carboidratos solúveis e ácidos na composição química dos filmes HTP, que atuam como plastificantes (DOS SANTOS DIAS et al., 2020; VIEIRA et al., 2011). Como já estudado, esses compostos consistem principalmente em glicose, galactose, arabinose e frutose, além de ácidos fórmico, galacturônico e acético (DOS SANTOS DIAS et al., 2020). Além disso, os plastificantes aumentam a distância e a mobilidade relativa entre as macromoléculas, proporcionando maior trabalhabilidade e processabilidade aos biopolímeros, entre outras características e propriedades (VIEIRA et al., 2011; ISOTTON, 2015).

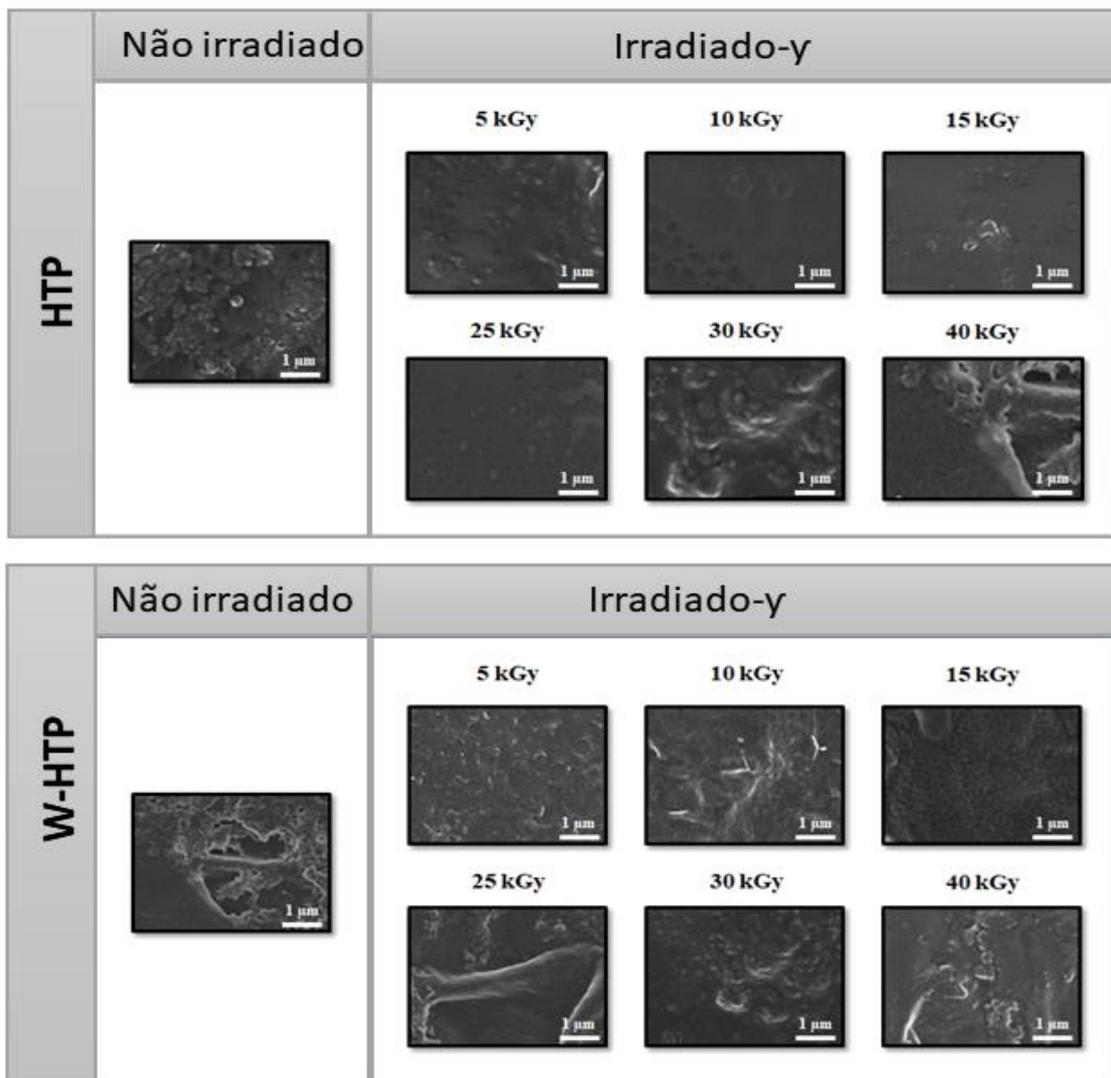


Figura 2.1 Micrografias obtidas via FE-SEM de filmes não irradiados à base de cebola HTP e filmes irradiados W-HTP com doses entre 5 e 40 kGy de radiação γ (Ampliação: 25.000 x).

Em relação ao efeito da radiação do filme, dois comportamentos distintos são observados de acordo com a dose aplicada. Primeiramente, em comparação com amostras não irradiadas, após a incidência de radiação γ , as superfícies dos filmes tornaram-se mais homogêneas e menos rugosas para doses até 15 kGy, com menor presença de relevos acentuados. Por outro lado, doses iguais ou superiores a 25 kGy proporcionaram um aumento na rugosidade superficial, que é mais pronunciado para as amostras lavadas. Para as amostras W-HTP, a radiação causou a formação de alguns aglomerados, cuja proporção aumentou de acordo com a dose irradiada, sendo mais evidente acima de 25 kGy. Em consonância com esses resultados, aglomerados

também foram observados para os filmes HTP, mas estão mais dispersos ao longo da superfície, restando algumas regiões uniformes e homogêneas. Achados semelhantes foram descritos na literatura para outros biopolímeros, como quitosana (SHAHBAZI, 2017) fibroína de seda (SIONKOWSKA, 2013) e zeína (SOLIMAN, 2009).

Em geral, a radiação ionizante – como a radiação γ – tem a capacidade de penetrar nos materiais e produzir radicais livres que podem levar à modificação ou quebra das moléculas que os compõem (YANG et al., 2012; HUR, 2011). Além disso, esses radicais livres podem reagir com o oxigênio presente em alguns grupos químicos, causando a oxidação da superfície do filme (WANG, 2020; GORNA, 2003). Por exemplo, para casca de cebola, Yang et al. (2012) demonstraram um aumento significativo no rendimento de quercetina e compostos fenólicos após a incidência de 10 kGy de radiação γ . No entanto, doses menores foram insuficientes para quebrar ligações físicas e químicas ou para complexar compostos fenólicos com outros compostos (YANG et al., 2012). Assim, devido a essa oxidação, há alteração em várias propriedades da superfície, como rugosidade, composição química e ângulo de contato, que serão analisadas na sequência.

4.2 Termogravimetria (TG/DTG)

Além do DSC, o comportamento térmico dos filmes HTP e W-HTP foi avaliado por termogravimetria (Figura 2.2). As amostras HTP apresentaram três etapas distintas de perda de massa, localizadas nas seguintes faixas de temperatura: 120 – 165 °C, 120 – 250 °C e 250 – 400 °C (Figura 2.2a e b). As perdas de massa em temperaturas abaixo de 120 °C, observadas para a amostra não irradiadas, podem ser atribuídas à volatilização da água e outros compostos voláteis (Figura 2.2b1) (DOS SANTOS DIAS et al., 2020; AÇIKALIN, 2012). A segunda etapa começa com a decomposição dos componentes orgânicos da cebola que apresentam menor estabilidade térmica, principalmente a hemicelulose (Figura 2.2b2) (AÇIKALIN, 2021; AÇICACLIN, 2012). A Terceira etapa, por sua vez, está associada à decomposição de carboidratos e celulose, macromolécula que apresenta maior estabilidade térmica em relação à hemicelulose (Figura 2.2b3) (AÇIKALIN, 2021; AÇIKALIN, 2012). Acima de 400 °C, a massa relativa diminui progressivamente, comportamento relacionado à

decomposição térmica da lignina (Figura 2.2b4). Ressalta-se que os compostos citados são os principais componentes sujeitos à decomposição nessas faixas de temperatura, mas outros carboidratos estruturais - como a pectina - e não estruturais - frutose livre, glicose livre, sacarose e frutanos -, além dos flavonóides, também se decompõem em tais intervalos (DOS SANTOS DIAS et al., 2020; ZHANG et al., 2016; DARBYSHIRE, 1979; JAIME et al., 2001; O'DONOGHUE et al., 2004).

Em relação ao efeito da aplicação da radiação γ , não foram observadas alterações significativas nos intervalos em que houve maior perda de massa. Para a primeira etapa, os filmes tenderam a ter duas perdas de massa máximas, de modo que a primeira se moveu para temperaturas mais baixas à medida que a dose de radiação γ foi aumentada. O comportamento oposto ocorreu para o segundo valor máximo. Como exemplo, o HTP tratado sob 5 kGy apresentou máximos a 133 e 144 °C, valores que se deslocaram para 128 e 148 °C para 30 kGy. Além disso, nesta etapa, todas as amostras irradiadas apresentaram maiores perdas de massa em relação à amostra não irradiada. No entanto, nas demais etapas, não foram observadas diferenças relevantes, pois todas as amostras exibiram perdas de massa semelhantes às obtidas para HTP não estéril, mas com uma ligeira mudança na temperatura da perda de massa máxima para valores progressivamente menores conforme a dose de γ -a radiação aumentou. Resultados semelhantes foram obtidos para os filmes W-HTP, que apresentaram uma etapa adicional de perda de massa para temperaturas entre 50 e 130 °C (Figura 2.2c,d). Esta etapa está relacionada à eliminação de compostos voláteis e umidade residual presentes nas amostras, esta última derivada do procedimento de lavagem (Figura 2.2d1). A segunda etapa é encontrada a 150 – 250 °C e é mais pronunciada para amostras irradiadas em doses mais altas, especificamente 30 e 40 kGy. Para essas doses, a 200 °C houve uma perda de 16 e 12% em relação à massa inicial, respectivamente (Figura 2.2d2). Diferenças significativas associadas à dose de radiação aplicada são observadas para as duas etapas subsequentes, nas temperaturas de 250 – 400 °C (Figura 2.2d3) e 420 – 600 °C (Figura 2.2d4).

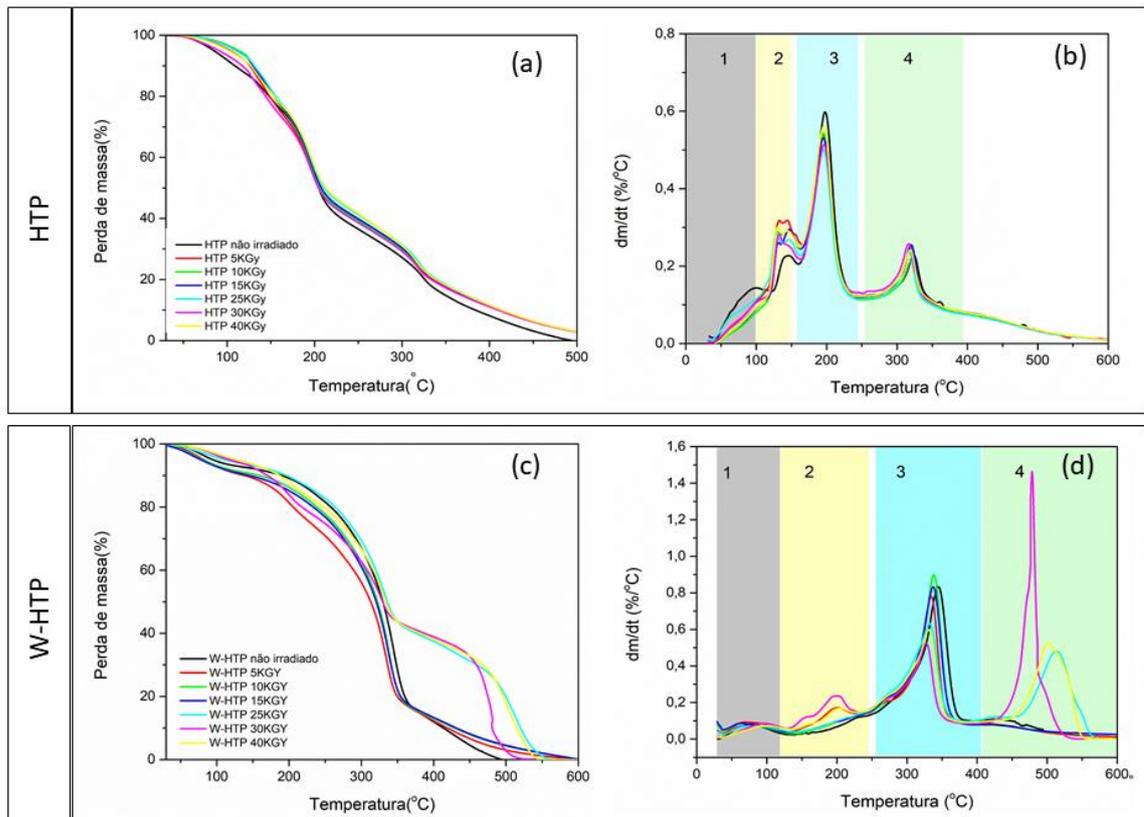


Figura 2.2. Curvas termogravimétricas (TG) e derivadas (DTG) de filmes de cebola HTP (a, b) e W-HTP (c, d) esterilizados sob diferentes doses de radiação γ .

No primeiro, as amostras não irradiadas e irradiadas com doses de até 15 kGy apresentam uma perda de massa mais pronunciada em relação às demais. Comportamento contrário ao último intervalo, em que a perda de filmes tratados com radiação superior a 15 kGy é significativamente mais intenso, aumentando de acordo com a dose e movendo-se para temperaturas mais baixas. Achados semelhantes foram observados por Nascimento et al. (2022) e Ito et al. (2018) para membranas de celulose bacteriana e farinha de arroz preto, respectivamente, nas quais houve um pequeno aumento na temperatura máxima de decomposição para maiores doses de radiação γ .

Desta forma, infere-se que os filmes W-HTP - mesmo possuindo um estágio adicional de perda de massa - apresentam maior estabilidade térmica em relação às amostras não lavadas; ou seja, para a mesma temperatura, a massa relativa é maior que a HTP. No entanto, essa estabilidade tende a ser melhorada à medida que a dose de radiação γ aumenta para ambos os materiais, principalmente em altas temperaturas. Resultados semelhantes foram avaliados com uso de filmes de celulose

bacteriana com extrato de própolis promissor como produto para a pele e esterilizados por radiação γ com dosagem de 25kGy e revelaram que a irradiação gama dos sistemas poliméricos resultaram em maior estabilidade térmica (AMORIM et al., 2022).

4.3 Calorimetria de varredura diferencial (DSC)

As transições térmicas dos filmes à base de cebola foram avaliadas por DSC, sendo enfatizadas a variação de temperatura em resposta à lavagem e dose de radiação γ . Na faixa de temperatura analisada, é possível notar diferenças quanto à influência da lavagem dos filmes, principalmente no T_{desid} . Como pode ser observado (Figura 2.3a), as amostras de HTP apresentam pico de desidratação na faixa de temperatura entre 100 e 200 °C, ao contrário dos filmes W-HTP (Figura 2.3b), em que o pico, referente a esta reação, é claro. Além disso, a variação de entalpia envolvida nesta reação tende a aumentar com a dose de radiação aplicada, exceto para 40 kGy (Tabela 2). A desidratação nessa faixa de temperatura pode ser atribuída à retirada de água – principal componente dos bulbos de cebola – e também está associada à presença de carboidratos solúveis nas amostras de HTP. Alguns deles são compostos cristalinos – como glicose e frutose – e, portanto, perdem sua estrutura cristalina durante o aquecimento em temperaturas mais baixas, que é a principal diferença entre os dois filmes (LEE, 2011).

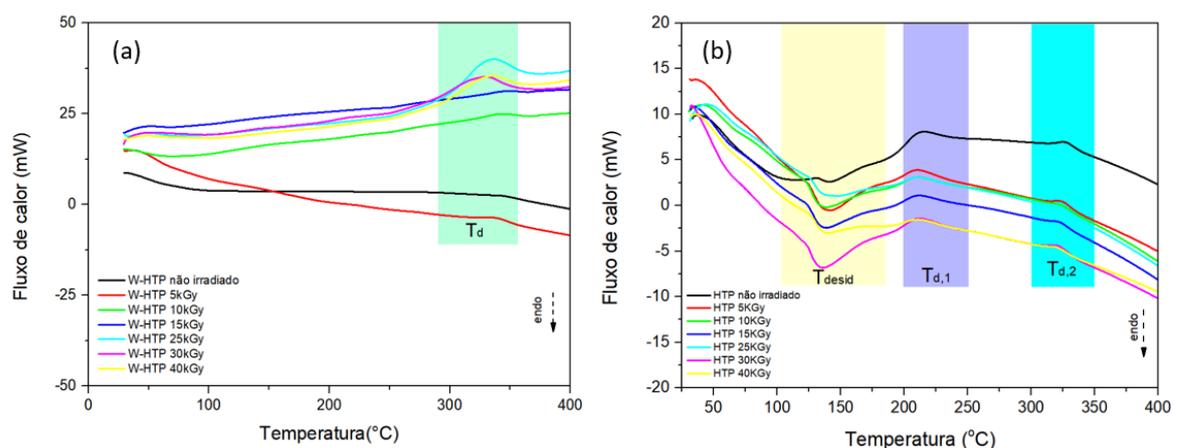


Figura 2.3 Curvas DSC mostrando as principais transições térmicas dos filmes à base de cebola: (a) HTP; (b) W-HTP.

Além disso, contêm picos exotérmicos em temperaturas entre 188 – 229 °C e 300 – 371 °C. O primeiro evento está associado à degradação da estrutura amorfa da

hemicelulose, produzindo resíduos de carvão (KABIR et al., 2013). O segundo pico, por sua vez, está relacionado principalmente à lignina, com uma contribuição menor da celulose. A lignina contém anéis aromáticos com diversas ramificações que permitem o estabelecimento de ligações químicas suscetíveis ao efeito oxidativo promovido pela radiação γ (KABIR et al., 2021). Para os filmes W-HTP, apenas a segunda transição exotérmica é visualizada e fica mais evidente com intensidades de radiação maiores, começando em temperaturas mais baixas e envolvendo maior variação de entalpia. Portanto, indica-se que a radiação γ favorece a degradação desses componentes lignocelulósicos, resultado também obtido em outros estudos (HENNIGES et al., 2012; KUCHARSKA et al., 2018). Em contrapartida, para as amostras HTP, não há grandes mudanças nos resultados, pois a entalpia e a temperatura de pico permanecem semelhantes para todas as doses.

Amostra	Dose de radiação (kGy)	T_{desid}			T_a		
		$T_{desid, onset}^*$	$T_{desid, endset}^*$	ΔH_{desid}^{**}	$T_{d, onset}^*$	$T_{d, endset}^*$	ΔH_d^{**}
HTP	Não irradiado	132	154	8	229/342	188/318	-53/-9
	5	121	173	124	228/336	195/310	-18/-9
	10	121	169	97	225/338	192/317	-17/-5
	15	122	166	79	224/333	197/312	-16/-7
	25	119	159	78	225/335	195/315	-13/-7
	30	120	179	85	222/334	193/313	-24/-10
	40	118	171	42	227/332	193/312	-12/-6
	Non-irradiado	-	-	-	357	326	-5
W-HTP	5	-	-	-	354	320	-14
	10	-	-	-	368	324	-15
	15	-	-	-	369	300	-190
	25	-	-	-	371	317	-230
	30	-	-	-	356	302	-171
	40	-	-	-	359	316	-158

Unidades: * T_g , T_m e T_d (Tonset, Tendset) in °C; ** ΔH_m and ΔH_d in J/g.

Tabela 2.1 Valores das temperaturas de desidratação (T_{desid}) e de cristalização (T_c), – incluindo as temperaturas inicial (T_{onset}) e final (T_{endset}) dessas transições – para os filmes HTP e W-HTP irradiados com doses entre 5 e 40 kGy de radiação γ

4.4 Espectroscopia infravermelha de transformada de Fourier (FTIR)

Informações qualitativas sobre a composição química dos filmes de cebola foram obtidas via FTIR para números de onda entre 4000 – 2000 cm^{-1} (Figura 2.4a e c) e 2000 – 800 cm^{-1} (Figura 2.4b e d). Esta análise forneceu mudanças importantes na resposta à lavagem e dose de radiação γ . As principais vibrações identificadas por esta análise referem-se aos grupos constituintes de celulose, pectina e xilanas, além

de mono, di e polissacarídeos (WIERCIGROCH et al., 2017). Esses dados já foram resumidos na literatura (DOS SANTOS DIAS et al., 2020).

Nos espectros de $4000 - 2000 \text{ cm}^{-1}$, todas as bandas identificadas nos filmes HTP foram deslocadas para números de onda mais baixos após a lavagem da polpa (Figura 2.4a). As diferenças mais significativas na resposta à lavagem são encontradas em $3289 - 3269 \text{ cm}^{-1}$ e $2922 - 2896 \text{ cm}^{-1}$ para as amostras W-HTP (Figura 2.4c), que se originam de diferentes tipos de (OH) – como OH livre, ligação H intra e intermolecular OH, e ligação de hidrogênio OH-H próxima à ligação β -glicosídica da celulose – e, (CH) principalmente de grupos carboxilato, respectivamente (DOS SANTOS DIAS et al., 2020; SAGAR et al., 2021; POPESCU et al., 2007). A intensidade da primeira banda também tende a aumentar para doses acima de 25 kGy. As duas bandas mais fracas próximas a 2365 cm^{-1} estão associadas ao CO_2 atmosférico e estão praticamente ausentes para doses de 5, 15 e 40 kGy (SAGAR et al., 2021).

Para números de onda menores, mudanças mais pronunciadas podem ser distinguidas. Em relação ao efeito da lavagem em amostras não irradiadas, a alteração mais aparente está localizada em $1737 - 1733 \text{ cm}^{-1}$ (Figura 2.4d). Esta banda é observada apenas em amostras W-HTP e é atribuída à vibração (C=O) do ácido poligalacturônico presente na pectina (Figura 2.4d) (CZAMARA et al., 2015; MONSOOR, 2001). Para tais filmes há também o desaparecimento da banda em $924 - 917 \text{ cm}^{-1}$, referente ao anel $\beta(\text{CCH})$, $\nu(\text{CO})$ e $\nu(\text{CC})$ de alguns mono e dissacarídeos que foram removidos por lavagem do polpa. Vibrações subsequentes relativas ao $\nu(\text{CC})$ e $\beta(\text{CCH})$ de certos mono e dissacarídeos (867 cm^{-1}), além do $\nu(\text{CC})$ da ligação α -glicosídica do trissacarídeo (820 cm^{-1}), exibem uma intensidade diminuída como resultado da lavagem (WIERCIGROCH et al., 2017).

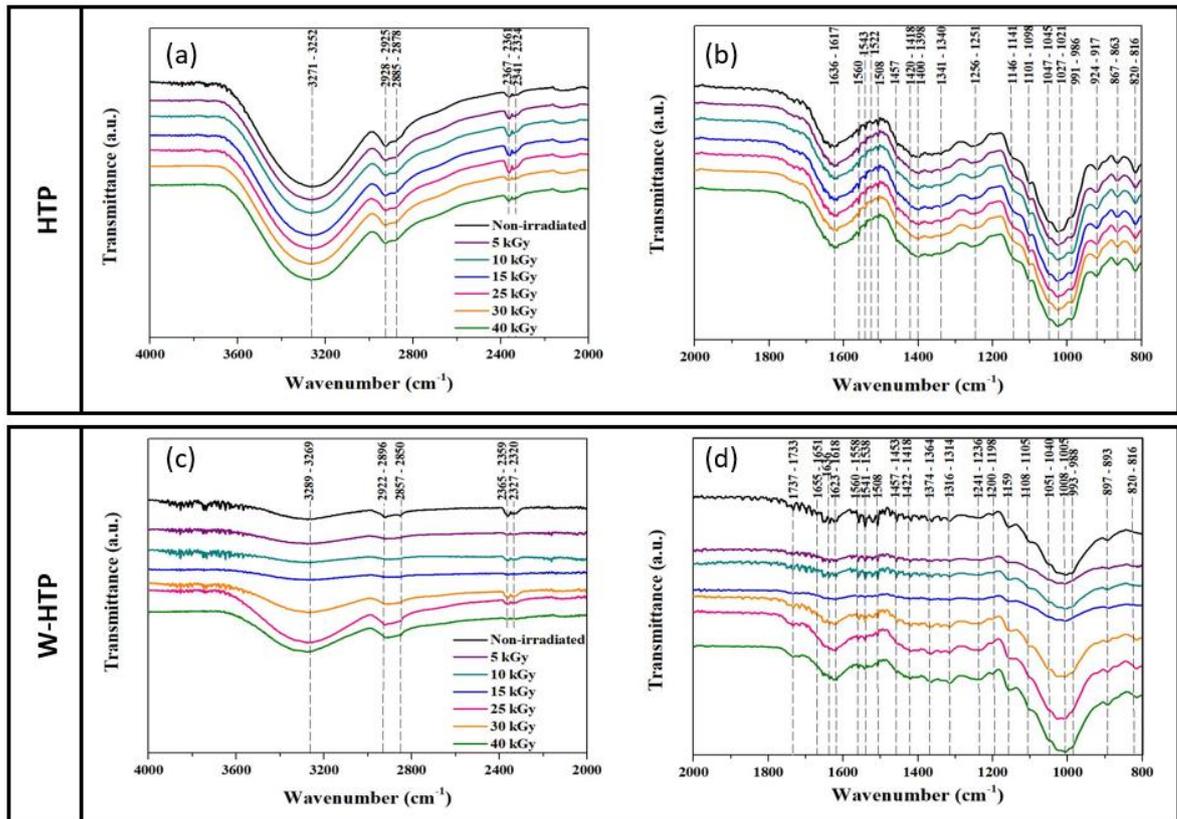


Figura 2.4 Espectro FTIR de filmes à base de cebola para números de onda de 4000 – 2000 cm⁻¹ (a, c) e 2000 – 800 cm⁻¹ (b, d).

Uma influência muito pequena na composição química foi notada após a irradiação dos filmes, sendo estas principalmente relacionadas ao deslocamento das bandas. Para as amostras W-HTP, há uma redução na intensidade das bandas em 2992 e 2857 cm⁻¹, que permanecem praticamente indistinguíveis para doses de 5, 10 e 15 kGy. Como mencionado anteriormente, essas bandas estão relacionadas a algumas vibrações $\nu(\text{OH})$ e $\nu(\text{CH}_2)$ simétricas de lipídios e ácidos graxos, nesta ordem (CARRILLO et al., 2004; TSIAGANIS, 2006). Assim, baixas doses de radiação podem ter causado sua quebra, embora o mesmo efeito não tenha sido observado para doses superiores a 25 kGy. O filme HTP mostrou um deslocamento na banda associada com (HOH) de água absorvida em pectina e celulose – inicialmente em 1636 cm⁻¹ para valores decrescentes à medida que a dose de radiação aumentou, até atingir 1617 cm⁻¹ para 40 kGy (WILSON et al., 2000). A radiação γ leva à formação de espécies radicais que atuam como potentes agentes oxidantes, sendo esses radicais derivados principalmente de hidroxilas (ZAOUAK et al., 2022). Como consequência disso, as alterações associadas a este grupo são mais evidentes nos espectros de FTIR.

4.5 Difração de raios X (DRX)

De acordo com os difratogramas de DRX (Figura 2.5); mostrado apenas para 5 e 40 kGy), ambos os filmes à base de cebola são caracterizados como semicristalinos e, portanto, apresentam regiões cristalinas e amorfas. Após a deconvolução, identifica-se um halo amorfo entre $9,6$ e $9,8^\circ$ referente à hemicelulose. Para valores maiores de 2Θ , há dois picos cristalinos em $14,8 - 16,3^\circ$ e $20,3 - 22,1^\circ$, que são atribuídos à fase cristalina da celulose, especificamente aos planos cristalográficos (110) e (200), respectivamente (SIVASANGAR et al., 2013; FARACO et al., 2019). O primeiro intervalo de 2Θ sugere a ocorrência de sobreposição entre células unitárias triclinicas e monoclinicas na celulose I, enquanto o segundo se refere à distância entre as ligações de hidrogênio nesta unidade (SIVASANGAR et al., 2013). Para ambos os filmes, não foi possível diferenciar os amplos halos amorfos relacionados à lignina e hemicelulose para $10 < 2\Theta < 15^\circ$ (MOHTAR et al., 2017).

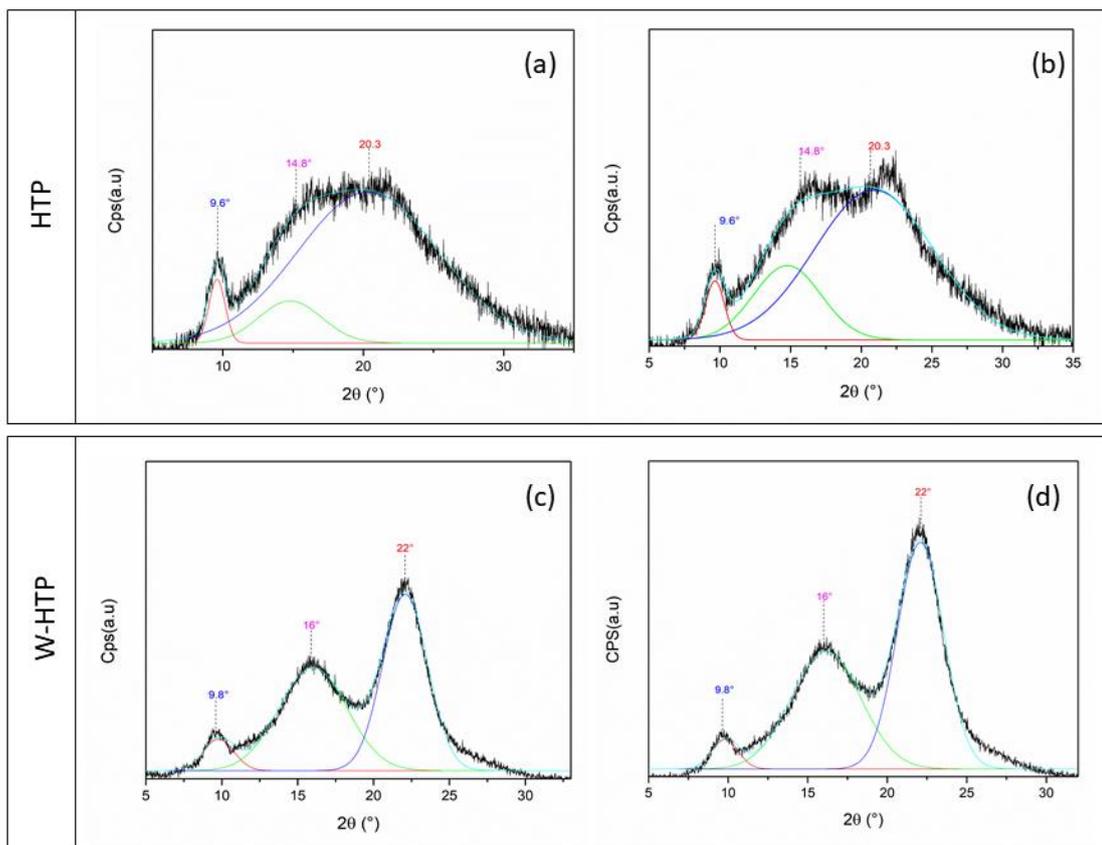


Figura 2.5 Difratogramas de raios X (DRX) de filmes HTP e W-HTP esterilizados com doses de 5 (a, c) e 40 kGy (b, d) de radiação γ .

Após a irradiação das amostras, os picos cristalinos tornam-se mais intensos e estreitos, mas não são observadas alterações no halo amorfo. Para elucidar essa diferença, foi determinado o CrI dos filmes (Tabela 2.2). Os resultados indicaram que as amostras W-HTP apresentaram um índice de cristalinidade maior do que as HTP devido ao aumento da rigidez das fibras de celulose que constituem esses filmes (DOS SANTOS DIAS et al., 2020). Há elevação do grau de cristalinidade à medida que a dose de radiação γ foi aumentada – exceto para doses intermediárias como 15, 25 e 30 kGy –, atingindo um valor máximo de 54,4% a 40 kGy. Efeito semelhante foi observado para as amostras de HTP para doses maiores, pois o índice de cristalinidade também diminuiu para 15 a 30 kGy, variando entre 4,8 e 6,7% para essas doses, nesta ordem. Em consonância com os resultados obtidos por FTIR, a irradiação pode levar à clivagem de cadeias poliméricas e ligações químicas. No entanto, essas cadeias podem posteriormente se rearranjar com maior grau de organização, resultando em um aumento nas regiões cristalinas e uma diminuição nas amorfas (DE CASSAN, 2019). É mais provável que ocorra com cadeias mais curtas, pois apresentam menos restrições de mobilidade e rearranjo (ZHAO et al., 2021; LEE, 2011).

Inclusive, Paula et al. (2021) investigaram os efeitos da radiação γ em filmes nanocompósitos (filmes NC) formados por PCL (policaprolactona) com nanopartículas MCM-48 (PCL/MCM-48) e PCL com MCM-48 NPs modificados com (3-aminopropil) trietoxissilano (APTES) (PCL/MCM-48-NH₂) obtidos pelo método casting. Concluíram que após exposição à radiação γ de 25 kGy houve uma preservação da estrutura cristalina do polímero.

Tabela 2.2 Intensidade dos picos cristalinos – denominados I(200) e lam – e índice de cristalinidade (CrI) dos filmes HTP e W-HTP irradiados com doses entre 5 e 40 kGy.

Amostras	Dose de radiação- γ (kGy)	lam/ (18°)	I002 (22°)	CrI (%)
W-HTP	5	1084	2138	49.0
	10	826	1696	51.2
	15	972	1656	41.3
	25	964	1636	41.7
	30	902	1760	48.7
	40	1236	2712	54.4
HTP	5	914	966	5.38
	10	988	1068	7.40
	15	866	910	4.80
	25	890	926	4,00
	30	946	1014	6.70
	40	966	1074	10.0

4.6. Propriedades mecânicas

As propriedades mecânicas – especificamente a resistência à tração, módulo de Young e alongamento à ruptura – foram avaliadas em função da dose de radiação γ usando o teste de tração uniaxial (Figura 2.6). A resistência à tração foi significativamente maior para filmes W-HTP em comparação com filmes HTP (Figura 2.6a). Os filmes HTP mostraram menor resistência a tração, mas foram mais flexíveis, pois esse comportamento se dá pela presença dos açúcares que se acredita desempenhar papel plastificante aumentando desta forma, seu alongamento e diminuindo sua rigidez. (DOS SANTOS DIAS et al., 2020). Como resultado, as cadeias poliméricas são mais suscetíveis ao alinhamento na direção da tensão aplicada, de modo que um pequeno nível de tensão é capaz de levar à ruptura dos corpos de prova (HUANG, 2022; ZAO et al., 2018). A radiação γ , independente da dose, resultou em aumento dessa propriedade para todas as amostras em relação aos materiais não irradiados, mas esse aumento não ocorre proporcionalmente à dose aplicada. A resistência máxima à tração foi observada nas doses de 5 e 25 kGy para as amostras

HTP e W-HTP, respectivamente. O grau de cristalinidade das amostras, dependente da dose de radiação γ , também influencia nas propriedades mecânicas dos filmes. Em geral, a resistência à tração tende a aumentar para altos graus de cristalinidade, mas isso não foi observado nas amostras (SONG, 2016; MULLER, 2009). Para filmes W-HTP, por exemplo, a máxima resistência à tração ocorre em 5 kGy, amostra que não possui o maior grau de cristalinidade.

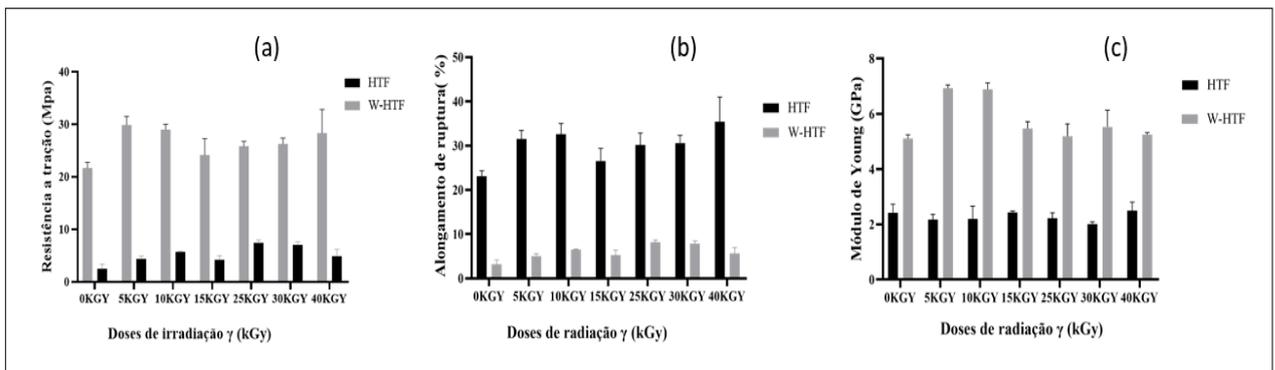


Figure 2.6. Propriedades mecânicas dos filmes HTP e W-HTP: (a) resistência à tração; (b) alongamento na ruptura; (c) Módulo de Young.

Como esperado dos resultados de resistência à tração, valores significativamente mais altos de alongamento na ruptura foram determinados para as amostras HTP (Figura 2.6b). Esse aumento também se deve ao efeito plastificante de alguns componentes dos filmes, que aumentam sua flexibilidade, distensibilidade e extensibilidade (SUDERMAN, 2018). Além disso, esta propriedade tendeu a aumentar de acordo com a dose de radiação γ para ambas as amostras. No entanto, para 40 kGy observou-se apenas a maximização do alongamento na ruptura para os filmes HTP, com variações de 12 e 9% em relação ao alongamento determinado nas doses de 5 e 10 kGy, respectivamente.

Ao contrário do alongamento à ruptura, os filmes de W-HTP foram mais rígidos do que as amostras não lavadas (Figura 2.6c), suportando maiores tensões, mas com menor alongamento no regime de deformação elástica. No entanto, de acordo com as demais propriedades, embora a aplicação de radiação tenha aumentado o módulo de Young das amostras W-HTP, principalmente para 5 e 10 kGy, o mesmo comportamento não é observado para as amostras HTP. Para estes, a rigidez foi

semelhante à do filme à base de cebola não irradiado, com variação máxima de apenas 3% observada para 40 kGy. Assim, diferenças significativas nas propriedades mecânicas estão mais relacionadas à lavagem, o que leva ao comportamento quebradiço dos filmes, com menor efeito da dose de radiação γ .

Para realizar a regeneração óssea, a rigidez das membranas é importante para suportar as pressões exercidas por forças externas como a mastigação, enquanto a maleabilidade fornece a geometria específica necessária para a reconstrução funcional (HEINZE, 2004).

4.7 Medida de ângulo de contato aparente

A molhabilidade – ou seja, a natureza hidrofílica ou hidrofóbica – das superfícies HTP e W-HTP foi avaliada em resposta às diferentes doses de radiação γ aplicadas durante o processo de esterilização (Figura 2.7). De acordo com o modelo de Young-Laplace, todos os filmes apresentaram superfícies hidrofílicas, pois o ângulo de contato aparente após a deposição de uma gota de água deionizada era menor que 90° (ERBIL, 2020; HIMMA et al., 2019). Este resultado foi observado independentemente do processo de lavagem e da intensidade da radiação. No entanto, um aumento significativo no ângulo de contato é evidenciado pela comparação dos valores determinados entre as amostras HTP e W-HTP para a mesma dose de radiação γ . Vale mencionar que, considerando uma dose de 5 kGy, o ângulo de contato muda de 29 ± 4 para $44 \pm 5^\circ$ após a lavagem, um aumento de aproximadamente 52%. Essa diferença é maximizada para 40 kGy, a maior intensidade de radiação γ utilizada neste estudo, uma variação de 90%.

A distinção entre os resultados de ângulo de contato estático pode ser atribuída ao efeito da lavagem na composição química e morfologia dos filmes de cebola, ambas características que influenciam diretamente nas propriedades superficiais. Devido à presença de carboidratos solúveis – frequentemente compostos hidrofílicos – na estrutura química dos filmes HTP, eles tendem a interagir com a gota de água e absorvê-la parcialmente (DOS SANTOS DIAS et al., 2020). Além disso, tais carboidratos solúveis, principalmente os açúcares, comportam-se como plastificantes naturais para os filmes e, portanto, aumentam a mobilidade das cadeias poliméricas (VANDERSMAN, 2020). Esse comportamento, entre outros fatores, depende

principalmente da presença de grupos OH disponíveis para as ligações de hidrogênio intermoleculares (VANDERSMAN, 2020). Assim, a permanência de carboidratos solúveis implica em um maior número de grupos hidroxila na superfície do filme para interagir com a gota de água e, portanto, permitir sua difusão da superfície para o interior dos materiais produzidos (DOS SANTOS DIAS et al., 2020). Conseqüentemente, há um aumento na hidrofiliçidade das amostras HTP, resultando em ângulos de contato menores em comparação com W-HTP.

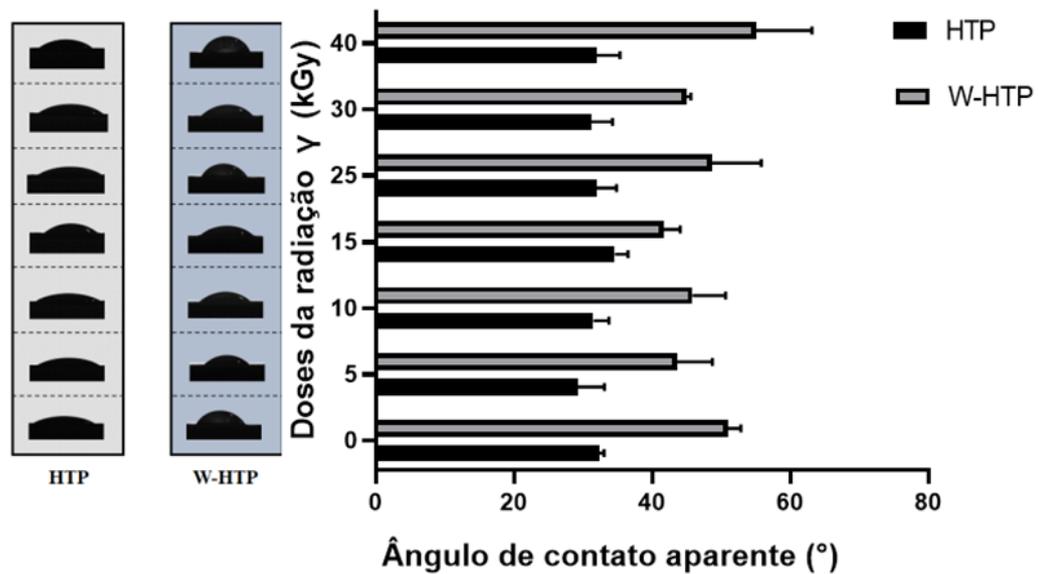


Figura 2.7 Ângulo de contato aparente das superfícies dos filmes de cebola irradiados com HTP e W-HTP γ sob diferentes doses e imagens das gotas de água 0,001 s após sua deposição.

Avaliando a influência de diferentes doses de radiação γ no ângulo de contato, não se observa tendência de variação deste conforme o aumento da dose aplicada para ambas as amostras. Para os filmes HTP, o aumento da dose de 5 para 15 kGy tornou a superfície do filme ligeiramente mais hidrofóbica, aumentando o ângulo de contato de 29 ± 4 para $35 \pm 2^\circ$, respectivamente. Este valor é reduzido novamente para doses acima de 25 kGy, permanecendo semelhante ao obtido para a dose de 5 kGy e praticamente inalterado à medida que a dose é aumentada até 40 kGy, correspondendo a $32 \pm 3^\circ$. Independentemente da dose, a incidência de radiação γ tornou as superfícies dos filmes de cebola mais hidrofílicas do que as superfícies não irradiadas.

Em geral, a incidência de radiação γ em materiais poliméricos – sintéticos ou naturais – induz a oxidação de suas superfícies, fazendo com que sejam enriquecidos com grupos químicos que contêm oxigênio, como hidroxilas, carbonilas e carboxilas (PARPARITA et al., 2015; TAYEL et al., 2015). Como resultado, há um aumento da hidrofiliabilidade – ou redução do ângulo de contato aparente – principalmente para altas doses de radiação, neste caso, superiores a 25 kGy. A ausência de tendência para o ângulo de contato também foi obtida para as amostras lavadas. O ângulo de contato foi maior apenas quando a dose de radiação γ aumentou de 5 para 10 kGy e de 25 para 40 kGy, com elevações de 5 e 12% para esses intervalos. Comparando, concluiu-se que apesar de maiores doses de radiação induzirem oxidação superficial e alteração na rugosidade dos filmes – um dos fatores com maior influência no ângulo de contato –, não foi suficiente para reduzir o ângulo de contato do W-HTP amostras ao nível apresentado por HTP (ERBIL, 2020; CHENAB, 2019).

Valente et al. (2016) utilizando de métodos de esterilização em membranas de fibras de poli (ácido láctico) (PLA) observaram que houve um aumento do ângulo de contato após a esterilização por radiação γ com dose de 25kGy, alegando que este comportamento provavelmente está relacionado às alterações químicas e de rugosidade da superfície que ocorrem durante os procedimentos de esterilização.

No estudo de Augustine et al. (2015) avaliaram a esterilização de membranas de policaprolactona eletrofiadas com radiação γ e de doses 15, 25, 35 and 65 kGy e encontraram resultados com ângulo de contato maiores para os filmes não irradiados comparados com os irradiados, sendo que a dosagem de 35kGy foi 18% menos em relação ao filme não irradiado e que o menor ângulo de contato foi para o filme de 65kGy. O ângulo dos filmes W-HTP desta pesquisa apresentaram valores maiores em relação ao aumento da dosagem de radiação sendo mais evidente na dose de 40kGy.

4.8. Propriedades da barreira

Além das alterações morfológicas, químicas, estruturais e de comportamento térmico, também é importante avaliar a variação das propriedades de barreira em relação à dose de radiação γ (Figura 2.8). Nota-se que α e TPVA foram maiores para os filmes de cebola lavados em relação aos demais, independente da intensidade da

radiação γ (Figura 2.8a e b). Além disso, essas duas propriedades de barreira apresentaram elevação em seus valores em relação às amostras não irradiadas e alterações semelhantes em relação à dose de radiação γ , mas diferentes para as amostras HTP e W-HTP. Para os filmes HTP, com exceção das amostras tratadas a 10 kGy e 30 kGy, observou-se um aumento progressivo das propriedades para doses iguais ou superiores a 15 kGy. Apesar dessa elevação, mesmo em altas doses de radiação γ , as propriedades permanecem um pouco maiores do que as do filme não tratado. Alternativamente, o comportamento oposto foi observado para os filmes W-HTP. Após um aumento inicial de 70% para ambas propriedades, os valores de α e TPVA mostraram uma pequena diferença até 15 kGy. No entanto, diminuem para 25 e 30 kGy e voltam a subir para 40 kGy, atingindo valores de $0,0027 \pm 0,0001 \text{ g h}^{-1}$ e $28,42 \pm 1,05 \text{ g h}^{-1} \text{ m}^{-2}$, respectivamente.

Em relação ao PVA, foi observado efeito contrário em relação às demais propriedades de barreira (Figura 2.8c). Primeiramente, os valores de PVA foram maiores para os filmes HTP e, em geral, apresentaram aumento após a aplicação de 5 e 40 kGy em relação à amostra de referência não irradiada. No entanto, esse aumento não foi proporcional à dose, pois foi reduzido para doses entre 10 e 30 kGy, o menor valor observado para a segunda, correspondendo a $0,0654 \pm 0,0003 \text{ g mm mmHg h}^{-1} \text{ m}^{-2}$. Para os filmes W-HTP esta propriedade foi reduzida em resposta à intensidade da radiação γ , principalmente para doses superiores a 25 kGy. Em suma, as alterações nas propriedades de barreira foram mais pronunciadas para amostras irradiadas com doses superiores a 15 kGy, sendo os filmes W-HTP os mais afetados pela incidência de radiação γ .

Uehara (2017) pesquisando filmes a base de fécula de mandioca e proteína isolada de soja tratadas e irradiadas com doses de 20 e 40 kGy concluíram que os filmes tornaram-se menos permeáveis com o aumento da dose aplicada sendo filme de 40kGy foi o menos permeável, porém os filmes não eram muito homogêneos, conforme observado na microscopia eletrônica de varredura. Em nossa pesquisa os filmes apresentaram mais homogêneo e mais densos (HTP).

Salari et al. (2021) com o objetivo de investigar a influência de diferentes dosagens de raios γ (5, 10 e 15 kGy) nas propriedades estruturais, mecânicas, superficiais de filmes nanocompósitos à base de quitosana avaliaram que as amostras dos filmes diminuíram

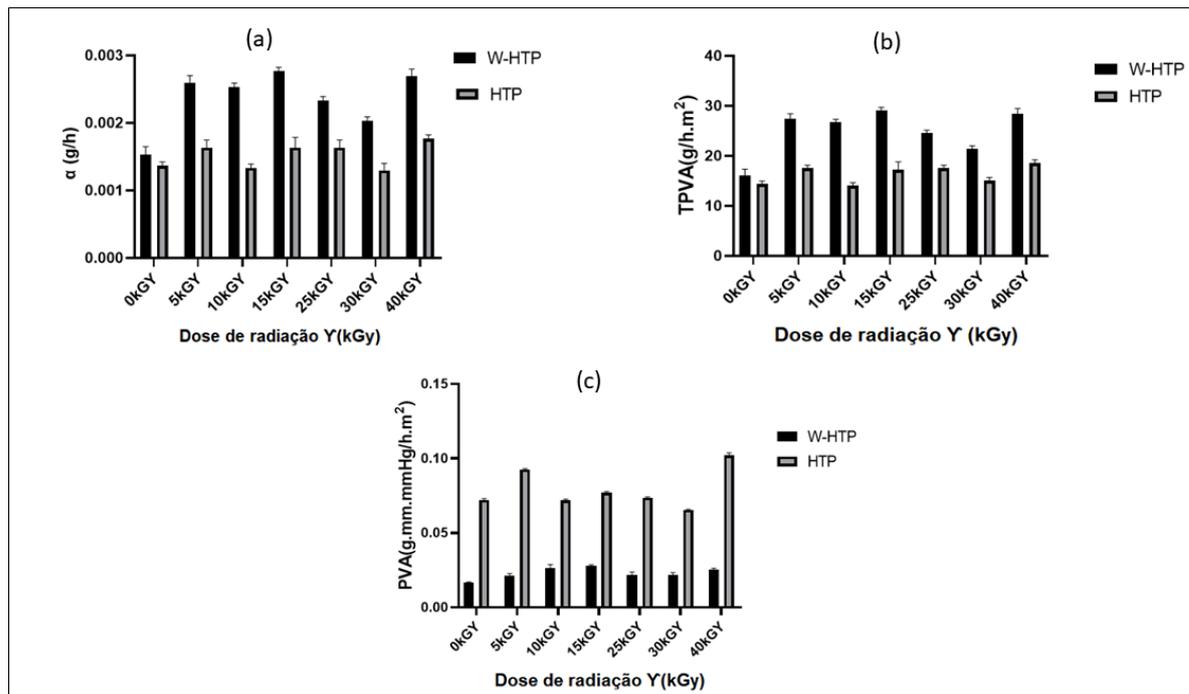


Figura 2.8 Propriedades de barreira dos filmes de cebola HTP e W-HTP sob diferentes doses de radiação: (a) coeficiente de permeabilidade – α ; (b) taxa de transmissão de vapor d'água – TPVA; (c) permeação de vapor de água – PVA.

com o aumento da dosagem de irradiação γ até 10 kGy, embora essa mudança não tenha sido significativa para filmes de quitosana pura e que esta diminuição da PVA pode estar relacionada ao efeito dos radicais livres gerados após a irradiação, que criam ligações cruzadas entre as cadeias de biopolímeros e formam a estrutura mais compacta e densa, mas na dosagem de 15 kGy o PVA do filme aumentou. Pode ser que o PVA seja influenciado pela preparação dos filmes e do tipo de polímero.

4.9. Ensaaios de mutagenicidade

Os resultados da avaliação do potencial mutagênico dos filmes irradiados nas cepas geneticamente modificadas de *S. Typhimurium* TA98 e TA102 são apresentados na Tabela 2.3. Os resultados foram validados utilizando os controles não tratados e positivos.

O sistema de teste escolhido neste estudo é um ensaio projetado especificamente para detectar uma ampla gama de substâncias químicas que podem produzir danos genéticos que levam a mutações genéticas. As cepas de Salmonella

são dependentes de histidina e carregam diferentes mutações em vários genes no operon histidina, que atuam como pontos quentes para mutagênicos que causam danos ao DNA por meio de diferentes mecanismos (FOODS, 2018). A cepa TA98 detecta mutações frameshift e TA102 normalmente é usado para detectar mutagênicos que causam danos oxidativos e mutações de substituição de pares de bases (AT) (WOO, 1988).

Este estudo mostra que os filmes de cebola HTP e W-HTP não são mutagênicos após a aplicação de diferentes doses de radiação. Os tratamentos não induziram aumento estatisticamente significativo no número de revertentes quando comparados ao controle negativo, e o IM foi menor que 2,0, demonstrando a ausência de atividade mutagênica nas condições utilizadas neste estudo. Além disso, nenhuma das amostras avaliadas apresentou efeito bactericida tóxico, pois não foi observada redução estatisticamente significativa no número de colônias em relação à taxa espontânea de reversão bacteriana (controle negativo).

Barreto et al. (2020) avaliando efeito mutagênico de filmes de *Allium cepa* L. obtidos pelo processo de casting constataram que não foram capazes de aumentar estatisticamente as frequências dos biomarcadores para dano cromossômico (teste do micronúcleo) em concentrações testadas. No entanto, os filmes HTP mostraram sinais de mutagenicidade no teste de Ames (mutações genéticas) sugerindo cautela em seu uso.

Tabela 2.3. Atividade mutagênica expressa como média e desvio padrão do número de revertentes/placa e índice de mutagenicidade nas cepas TA98 e TA102 de Salmonella.

Número de revertentes (M ± SD)/placas IM				
Amostras	C-	TA98	TA102	
	C+	23 ± 2	245 ± 49	862 ± 64 ^{a*}
Dose de radiação-γ (kGy)				
HTP 100 µL/placa	5	23 ± 7 (1,00)	244 ± 23 (1,00)	
	10	22 ± 0 (0,96)	249 ± 30 (1,02)	
	15	22 ± 3 (0,96)	230 ± 14 (0,94)	
	25	25 ± 4 (1,09)	265 ± 44 (1,08)	
	30	31 ± 1 (1,35)	284 ± 12 (1,16)	
	40	25 ± 4 (1,09)	260 ± 28 (1,06)	
W-HTP 100 µL/placa	5	30 ± 1 (1,28)	266 ± 23 (1,08)	
	10	25 ± 1 (1,09)	236 ± 18 (0,96)	
	15	24 ± 6 (1,04)	252 ± 40 (1,03)	
	25	27 ± 4 (1,17)	257 ± 26 (1,05)	
	30	26 ± 6 (1,13)	234 ± 37 (0,96)	
	40	24 ± 6 (1,04)	230 ± 14 (0,94)	

* $p < 0,05$ (ANOVA); M DP = média e desvio padrão; IM = índice de mutagenicidade (valores entre parênteses); Controle negativo (C-): sem tratamento (taxa espontânea de reversão bacteriana); Controles positivos (C+): ^a 4-nitro-o-fenilenodiamina (10,0 g/placa) e ^b mitomicina C (0,5 g/placa).

4.10. Ensaio de citotoxicidade

Os resultados de viabilidade celular mostraram que, após 24 horas, os filmes HTP (Figura 2.9a) eram mais citotóxicos do que os filmes W-HTP (Figura 2.9). Os filmes HTP mostram uma redução estatisticamente significativa na porcentagem de viabilidade celular das células HaCat em comparação com o controle negativo (sem qualquer tratamento) nas concentrações de 25, 50 e 100%. Os filmes W-HTP não induziram uma redução estatisticamente significativa na viabilidade celular em comparação com o controle negativo (Figura 2.9b). Os Filmes HTP mostraram se dose

dependente, enquanto os filmes W-HTP não apresentaram citotoxicidade. Da mesma forma, Barreto et al. (2020) trabalhando com eluatos de filmes poliméricos de *Allium cepa* L. obtidos pelo processo de casting e verificar sua segurança para fins comerciais, também demonstraram que a análise da viabilidade celular foi mais citotóxica para polpa tratada hidrotermicamente (HTP) não lavada do que para filmes de pasta lavada tratada hidrotermicamente (W-HTP), porém não foram amostras irradiadas por radiação γ .

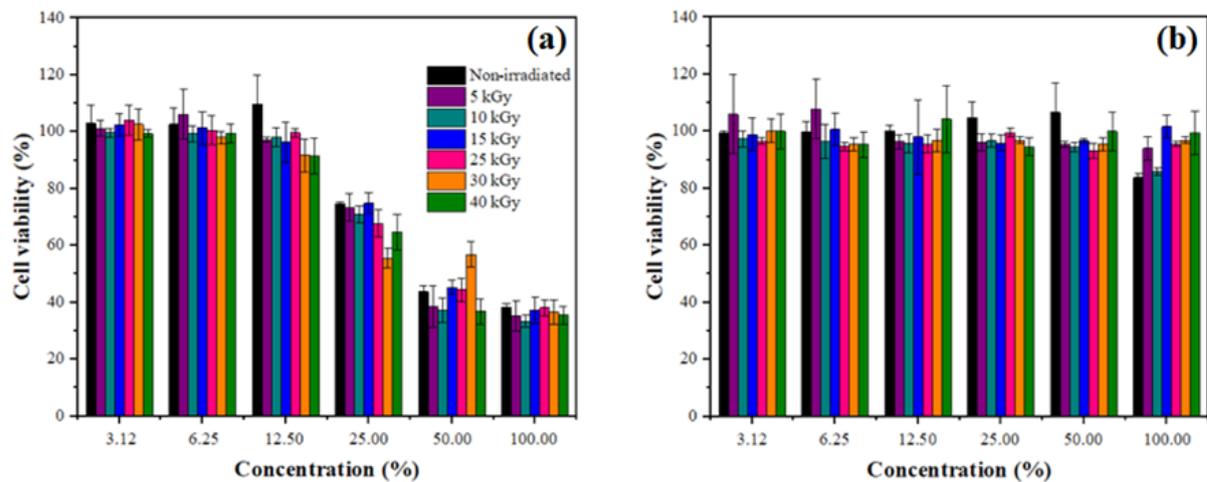


Figura 2.9 Análise da viabilidade de células em HaCat expostas a diferentes concentrações de filmes de cebola HTP por 24 horas a partir de três experimentos independentes para as amostras HTP (a) e W-HTP (b)

Importante acrescentar que pelos resultados encontrados para os filmes W-HTP onde não foram citotóxico e nem mutagênico torna-se mais um fator positivo como opção para ser usado no future como membranas para regeneração óssea.

5. CONCLUSÕES

Neste trabalho, filmes à base de cebola (*Allium cepa* L.) foram produzidos a partir do tratamento hidrotérmico, com o objetivo de avaliar a influência da irradiação γ em suas morfologias, propriedades e desempenho. A irradiação foi realizada para esterilizar os filmes, sendo o conhecimento da dose do efeito da radiação γ essencial para a previsão de seu comportamento antes de sua aplicação. Os resultados indicaram uma mudança mais pronunciada nas propriedades dos filmes em função da lavagem da polpa do que da dose de radiação aplicada. Altas doses como 40 kGy proporcionaram redução na uniformidade e homogeneidade na superfície dos filmes, juntamente com aumento da rugosidade e hidrofobicidade. Tais mudanças ocorreram devido ao efeito oxidativo promovido pela radiação γ , que também foi indicado pela quebra de algumas ligações químicas, mudanças no índice de cristalinidade, comportamentos térmicos e mecânicos. Embora ambas as amostras tenham apresentado ausência de citotoxicidade, os filmes de HTP apresentaram diminuição da viabilidade celular para concentrações de eluato superiores a 25%, diferente dos resultados obtidos para o W-HTP, em que não foi observada essa diminuição. Em resumo, os resultados obtidos mostraram que as propriedades do W-HTP foram mais significativamente afetadas pela incidência de radiação γ do que as dos filmes HTP, especialmente em doses superiores a 15 kGy, e o desempenho dos filmes à base de cebola é altamente dependente na dose aplicada. E a ausência de citotoxicidade e mutagenicidade dos filmes irradiados são resultados importantes para uso de filmes obtidos de *Allium cepa* L para área alimentícia, bem como médica.

6 REFERÊNCIAS

- AÇIKALIN, Korkut; GÖZKE, Gözde. Thermogravimetric pyrolysis of onion skins: Determination of kinetic and thermodynamic parameters for devolatilization stages using the combinations of isoconversional and master plot methods. **Bioresource Technology**, v. 342, p. 125936, 2021.
- AÇIKALIN, Korkut. Pyrolytic characteristics and kinetics of pistachio shell by thermogravimetric analysis. **Journal of thermal analysis and calorimetry**, v. 109, n. 1, p. 227-235, 2012.
- AMORIM, Júlia DP et al. Obtainment of bacterial cellulose with added propolis extract for cosmetic applications. **Polymer Engineering & Science**, v. 62, n. 2, p. 565-575, 2022.
- ASTM. E96/E96M-16. Standard test methods for water vapor transmission of materials. Annual Book of ASTM Standards; American Society for Testing and Materials: West Conshohocken, PA, USA, p. 719-725, 2016.
- AUGUSTINE, Robin et al. Dose-dependent effects of gamma irradiation on the materials properties and cell proliferation of electrospun polycaprolactone tissue engineering scaffolds. **International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials**, v. 64, n. 10, p. 526-533, 2015.
- BARRETO, Mariana Rodrigues et al. Genotoxicological safety assessment of puree-only edible films from onion bulb (*Allium cepa* L.) for use in food packaging-related applications. **Journal of food science**, v. 85, n. 1, p. 201-208, 2020.
- BELL, Adrian D.; BRYAN, Alan. Plant form: an illustrated guide to flowering plant morphology. **Timber Press**, 2008.
- BENKEBLIA, Noureddine; SHIOMI, Norio. Hydrolysis kinetic parameters of DP 6, 7, 8, and 9– 12 fructooligosaccharides (FOS) of onion bulb tissues. Effect of temperature and storage time. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 54, n. 7, p. 2587-2592, 2006.
- BREWSTER, James L. Onions and other vegetable alliums. CABI, 2008.
- CANEVAROLO, Sebastião V. Polymer science: a textbook for engineers and technologists. Carl Hanser Verlag GmbH Co KG, 2019.
- CARRILLO, F. et al. Structural FTIR analysis and thermal characterisation of lyocell and viscose-type fibres. **European Polymer Journal**, v. 40, n. 9, p. 2229-2234, 2004.
- CHAKRABORTY, Arka Jyoti et al. *Allium cepa*: A Treasure of Bioactive Phytochemicals with Prospective Health Benefits. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2022, 2022.
- CHENAB, Karim Khanmohammadi; SOHRABI, Beheshteh; RAHMANZADEH, Atyeh. Superhydrophobicity: advanced biological and biomedical applications. **Biomaterials science**, v. 7, n. 8, p. 3110-3137, 2019.
- COLINA-COCA, Clara et al. Dietary onion ameliorates antioxidant defence, inflammatory response, and cardiovascular risk biomarkers in hypercholesterolemic Wistar rats. **Journal of Functional Foods**, v. 36, p. 300-309, 2017.
- CZAMARA, Krzysztof et al. Raman spectroscopy of lipids: a review. **Journal of Raman Spectroscopy**, v. 46, n. 1, p. 4-20, 2015.

DARBYSHIRE, Ben; HENRY, Robert J. The association of fructans with high percentage dry weight in onion cultivars suitable for dehydrating. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 30, n. 11, p. 1035-1038, 1979.

DE CASSAN, Dominik et al. Impact of sterilization by electron beam, gamma radiation and X-rays on electrospun poly-(ϵ -caprolactone) fiber mats. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 30, n. 4, p. 1-11, 2019.

DO NASCIMENTO, Helenise Almeida et al. Influence of gamma irradiation on the properties of bacterial cellulose produced with concord grape and red cabbage extracts. **Current Research in Biotechnology**, v. 4, p. 119-128, 2022.

DOS SANTOS DIAS, Diogenes et al. Large scale manufacturing of puree-only edible films from onion bulb (*Allium cepa* L.): Probing production and structure–processing–property correlations. **Industrial crops and products**, v. 145, p. 111847, 2020.

ERBIL, H. Yildirim. Practical applications of superhydrophobic materials and coatings: problems and perspectives. **Langmuir**, v. 36, n. 10, p. 2493-2509, 2020.

FARACO, Thales A. et al. Biosubstratos ecológicos obtidos de polpa de cebola (*Allium cepa* L.) para diodos emissores de luz orgânicos flexíveis. **Materiais e interfaces aplicados ACS**, v. 11, n. 45, pág. 42420-42428, 2019.

FAVERET, Pedro Leonardo Sanches; CUNHA, Karin Soares Gonçalves. Conduas atuais na prevenção da hipertrofia cicatricial pós-operatória. **Rev. bras. cir. plást**, p. 638-648, 2015.

FDA. Radiation in the production, processing, and handling of food. Fed. Regist. Final Rule, 2001, 7, 10574.

FDA. Radiation in food production, processing, and handling. Fed. Regist. Final Rule, 2005, 48057.

Foods, I. Subpart B - Radiation and Part 179 - Irradiation in the production, processing and handling of food, 2018, 469–473.

GANGOPADHYAY, Karuna Sagar et al. Pharmacological evaluation and chemical standardization of an ayurvedic formulation for wound healing activity. **The International Journal of lower extremity wounds**, v. 13, n. 1, p. 41-49, 2014.

GENNARO, Laura et al. Flavonoid and carbohydrate contents in Tropea red onions: effects of homelike peeling and storage. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 7, p. 1904-1910, 2002.

GOLOVCHENKO, Victoria V. et al. Structure of pectic polysaccharides isolated from onion *Allium cepa* L. using a simulated gastric medium and their effect on intestinal absorption. *Food chemistry*, v. 134, n. 4, p. 1813-1822, 2012.

GORNA, Katarzyna; GOGOLEWSKI, Sylwester. The effect of gamma radiation on molecular stability and mechanical properties of biodegradable polyurethanes for medical applications. **Polymer degradation and stability**, v. 79, n. 3, p. 465-474, 2003.

HEINZE, J. A space-maintaining resorbable membrane for guided tissue regeneration. In: Annual conference of the International Association of Dental Research. Honolulu. 2004.

HENNIGES, Ute et al. Irradiation of cellulosic pulps: understanding its impact on cellulose oxidation. **Biomacromolecules**, v. 13, n. 12, p. 4171-4178, 2012.

HIMMA, Nurul F. et al. Superhydrophobic membrane: progress in preparation and its separation properties. **Reviews in Chemical Engineering**, v. 35, n. 2, p. 211-238, 2019.

HINTERSTOISSER, Barbara; SALMÉN, Lennart. Application of dynamic 2D FTIR to cellulose. **Vibrational Spectroscopy**, v. 22, n. 1-2, p. 111-118, 2000.

HUANG, Qian. When Polymer Chains Are Highly Aligned: A Perspective on Extensional Rheology. **Macromolecules**, v. 55, n. 3, p. 715-727, 2022.

INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY (IAEA). Trends in Sterilization of Health Care Products. October, 2008, 119.

HUR, Jung-Mu; KIM, Dong-Ho. The Ethanol Extract of Red Ginseng Enhances Anti-Tumor Effects Using Co 60 Gamma Irradiation. **Journal of Applied Biological Chemistry**, v. 54, n. 1, p. 15-20, 2011.

ISO- International Organization for Standardization. 10993-12:2021 - Biological evaluation of medical devices - Part 12: Sample preparation and reference materials, 2021.

ITO, Vivian Cristina et al. Effects of gamma radiation on the thermoanalytical, structural and pasting properties of black rice (*Oryza sativa* L.) flour. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 133, n. 1, p. 529-537, 2018.

JAIME, Laura et al. Study of total fructan and fructooligosaccharide content in different onion tissues. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 81, n. 2, p. 177-182, 2001.

JAKARIA, Md et al. The methanol extract of *Allium cepa* L. protects inflammatory markers in LPS-induced BV-2 microglial cells and upregulates the antiapoptotic gene and antioxidant enzymes in N27-A cells. **Antioxidants**, v. 8, n. 9, p. 348, 2019.

JINI, D.; SHARMILA, S. Green synthesis of silver nanoparticles from *Allium cepa* and its in vitro antidiabetic activity. **Materials Today: Proceedings**, v. 22, p. 432-438, 2020.

JONES, Meriel G. et al. Biosynthesis of the flavour precursors of onion and garlic. **Journal of Experimental Botany**, v. 55, n. 404, p. 1903-1918, 2004.

KABIR, M. M. et al. Effects of chemical treatments on hemp fibre structure. **Applied Surface Science**, v. 276, p. 13-23, 2013.

KABIR, Mohammad Mazedul et al. Effect of Hemp Fibre Surface Treatment on the Fibre-Matrix Interface and the Influence of Cellulose, Hemicellulose, and Lignin Contents on Composite Strength Properties. **Advances in Materials Science and Engineering**, v. 2021, 2021.

KUCHARSKA, Karolina et al. Pretreatment of lignocellulosic materials as substrates for fermentation processes. **Molecules**, v. 23, n. 11, p. 2937, 2018.

LEE, Joo Won; THOMAS, Leonard C.; SCHMIDT, Shelly J. Investigation of the heating rate dependency associated with the loss of crystalline structure in sucrose, glucose,

and fructose using a thermal analysis approach (part I). **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 59, n. 2, p. 684-701, 2011.

LEE, Ji-Sook et al. Onion peel extract reduces the percentage of body fat in overweight and obese subjects: a 12-week, randomized, double-blind, placebo-controlled study. **Nutrition Research and Practice**, v. 10, n. 2, p. 175-181, 2016.

LIGUORI, Loredana et al. Chemical composition and antioxidant properties of five white onion (*Allium cepa* L.) landraces. *Journal of Food Quality*, v. 2017, 2017.

LOREDANA, Liguori et al. Biochemical, antioxidant properties and antimicrobial activity of different onion varieties in the Mediterranean area. **Journal of Food Measurement and Characterization**, v. 13, n. 2, p. 1232-1241, 2019.

MARON, Dorothy M.; AMES, Bruce N. Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. **Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects**, v. 113, n. 3-4, p. 173-215, 1983.

MCHUGH, T. Habig; AVENA-BUSTILLOS, R.; KROCHTA, J. M. Hydrophilic edible films: modified procedure for water vapor permeability and explanation of thickness effects. **Journal of food science**, v. 58, n. 4, p. 899-903, 1993.

MIHOUBI, Wafa et al. FTIR spectroscopy of whole cells for the monitoring of yeast apoptosis mediated by p53 over-expression and its suppression by *Nigella sativa* extracts. **PLoS One**, v. 12, n. 7, p. e0180680, 2017.

MOHTAR, Safia Syazana et al. An ionic liquid treatment and fractionation of cellulose, hemicellulose and lignin from oil palm empty fruit bunch. **Carbohydrate polymers**, v. 166, p. 291-299, 2017.

MONSOOR, M. A.; KALAPATHY, U.; PROCTOR, A. Determination of polygalacturonic acid content in pectin extracts by diffuse reflectance Fourier transform infrared spectroscopy. **Food Chemistry**, v. 74, n. 2, p. 233-238, 2001.

MORTELMANS, Kristien; ZEIGER, Errol. The Ames Salmonella/microsome mutagenicity assay. **Mutation research/fundamental and molecular mechanisms of mutagenesis**, v. 455, n. 1-2, p. 29-60, 2000.

MÜLLER, Carmen MO; LAURINDO, João Borges; YAMASHITA, Fabio. Effect of cellulose fibers on the crystallinity and mechanical properties of starch-based films at different relative humidity values. **Carbohydrate Polymers**, v. 77, n. 2, p. 293-299, 2009.

O'DONOGHUE, Erin M. et al. Evaluation of carbohydrates in Pukekohe Longkeeper and Grano cultivars of *Allium cepa*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, n. 17, p. 5383-5390, 2004.

OTONI, Caio G. et al. Antimicrobial and physical-mechanical properties of pectin/papaya puree/cinnamaldehyde nanoemulsion edible composite films. **Food Hydrocolloids**, v. 41, p. 188-194, 2014.

OUYANG, Hui et al. Antioxidant and xanthine oxidase inhibitory activities of total polyphenols from onion. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 25, n. 7, p. 1509-1513, 2018.

- PAGE, Brigitte; PAGE, MICHEL; NOEL, CHRISTIANE. A new fluorometric assay for cytotoxicity measurements in-vitro. **International journal of oncology**, v. 3, n. 3, p. 473-476, 1993.
- PARPARITA, Elena et al. Biomass effect on γ -irradiation behavior of some polypropylene biocomposites. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 54, n. 8, p. 2404-2413, 2015.
- PAULA, Marcos Vinícius et al. Effects of gamma radiation on nanocomposite films of polycaprolactone with modified MCM-48. **Polímeros**, v. 31, 2021.
- PEIRCE, Lincoln C. et al. Vegetables. Characteristics, production, and marketing. **John Wiley and sons**, 1987.
- POPESCU, Carmen-Mihaela et al. Spectral characterization of eucalyptus wood. **Applied spectroscopy**, v. 61, n. 11, p. 1168-1177, 2007.
- REDGWELL, Robert J.; SELVENDRAN, Robert R. Structural features of cell-wall polysaccharides of onion *Allium cepa*. **Carbohydrate Research**, v. 157, p. 183-199, 1986.
- RHODES, Michael JC; PRICE, Keith R. Analytical problems in the study of flavonoid compounds in onions. **Food Chemistry**, v. 57, n. 1, p. 113-117, 1996.
- ROSE, Peter et al. Bioactive S-alk(en)yl cysteine sulfoxide metabolites in the genus *Allium*: the chemistry of potential therapeutic agents. **Natural product reports**, v. 22, n. 3, p. 351-368, 2005.
- SAGAR, Narashans Alok et al. Physicochemical and thermal characteristics of onion skin from fifteen Indian cultivars for possible food applications. **Journal of Food Quality**, v. 2021, 2021.
- SALARI, Mahdiah et al. Use of gamma irradiation technology for modification of bacterial cellulose nanocrystals/chitosan nanocomposite film. **Carbohydrate polymers**, v. 253, p. 117144, 2021.
- SANT, Nicholas J.; PROFFEN, Benedikt L.; MURRAY, Martha M. Effects of radiation dose and nitrogen purge on collagen scaffold properties. **Journal of Biomaterials Applications**, v. 36, n. 6, p. 1011-1018, 2022.
- SEGAL, LGJMA et al. An empirical method for estimating the degree of crystallinity of native cellulose using the X-ray diffractometer. **Textile research journal**, v. 29, n. 10, p. 786-794, 1959.
- SHAHBAZI, Mahdiyar; RAJABZADEH, Ghadir; AHMADI, Seyed Javad. Characterization of nanocomposite film based on chitosan intercalated in clay platelets by electron beam irradiation. **Carbohydrate Polymers**, v. 157, p. 226-235, 2017.
- SIONKOWSKA, Alina; PŁANECKA, Anna. Surface properties of thin films based on the mixtures of chitosan and silk fibroin. **Journal of Molecular Liquids**, v. 186, p. 157-162, 2013.
- SIVASANGAR, S. et al. Thermal behavior of lignocellulosic materials under aerobic/anaerobic environments. **International journal of hydrogen energy**, v. 38, n. 36, p. 16011-16019, 2013.

SOARES, Kallyne Sousa et al. Effect of Edible Onion (*Allium cepa* L.) Film on Quality, Sensory Properties and Shelf Life of Beef Burger Patties. **Molecules**, v. 26, n. 23, p. 7202, 2021.

SOLIMAN, Emad A.; MOHY ELDIN, Mohamed S.; FURUTA, Masakazu. Biodegradable zein-based films: Influence of γ -irradiation on structural and functional properties. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, n. 6, p. 2529-2535, 2009.

SONG, Fuzhi; WANG, Qihua; WANG, Tingmei. The effects of crystallinity on the mechanical properties and the limiting PV (pressure \times velocity) value of PTFE. **Tribology International**, v. 93, p. 1-10, 2016.

SUDERMAN, N.; ISA, M. I. N.; SARBON, N. M. The effect of plasticizers on the functional properties of biodegradable gelatin-based film: A review. **Food bioscience**, v. 24, p. 111-119, 2018.

TAYEL, A. et al. Modifications induced by gamma irradiation to Makrofol polymer nuclear track detector. **Journal of Advanced Research**, v. 6, n. 2, p. 219-224, 2015.

TSIAGANIS, Michael C.; LASKARI, Katerina; MELISSARI, Efi. Fatty acid composition of *Allium* species lipids. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 19, n. 6-7, p. 620-627, 2006.

TSUBOKI, Junko et al. Onionin A inhibits ovarian cancer progression by suppressing cancer cell proliferation and the protumour function of macrophages. **Scientific reports**, v. 6, n. 1, p. 1-11, 2016.

UEDA, Yoichi; TSUBUKU, Takako; MIYAJIMA, Ryuichi. Composition of sulfur-containing components in onion and their flavor characters. **Bioscience, biotechnology, and biochemistry**, v. 58, n. 1, p. 108-110, 1994.

UEHARA, Vanessa Bernardo. Efeito da radiação ionizante de feixe de elétrons em propriedades de biopolímeros comestíveis a base de proteína isolada de soja e fécula de mandioca. 2017. **Tese de Doutorado**. Universidade de São Paulo.

VALENTE, T. A. M. et al. Effect of sterilization methods on electrospun poly (lactic acid)(PLA) fiber alignment for biomedical applications. **ACS applied materials & interfaces**, v. 8, n. 5, p. 3241-3249, 2016.

VAN DER SMAN, R. G. M.; VAN DEN HOEK, I. A. F.; RENZETTI, S. Sugar replacement with zwitterionic plasticizers like amino acids. **Food Hydrocolloids**, v. 109, p. 106113, 2020.

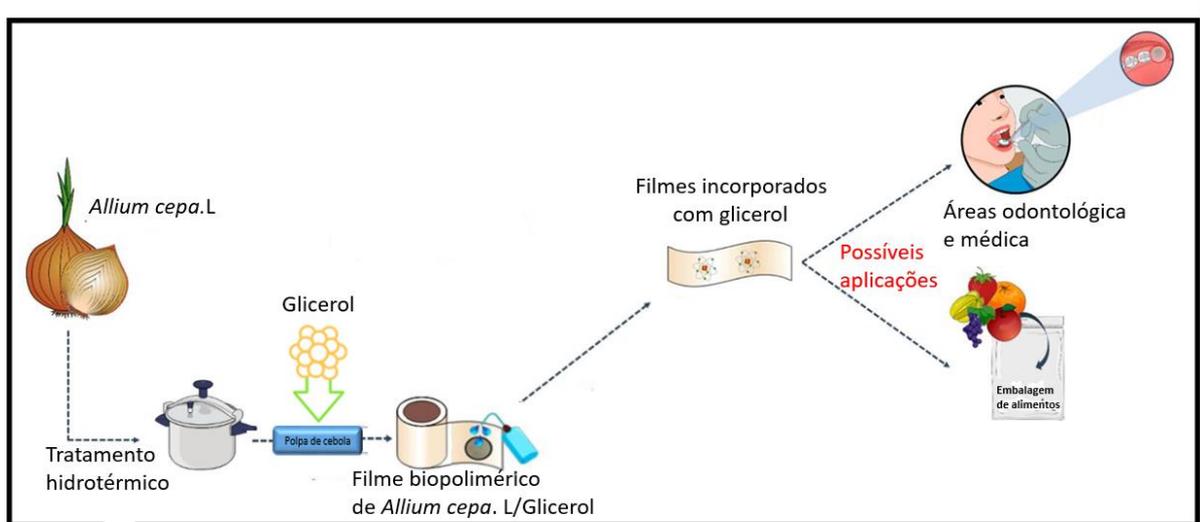
VIEIRA, Melissa Gurgel Adeodato et al. Natural-based plasticizers and biopolymer films: A review. **European polymer journal**, v. 47, n. 3, p. 254-263, 2011.

WANG, Jianlong; WANG, Shizong. Reactive species in advanced oxidation processes: Formation, identification and reaction mechanism. **Chemical Engineering Journal**, v. 401, p. 126158, 2020.

- WIERCIGROCH, Ewelina et al. Raman and infrared spectroscopy of carbohydrates: A review. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 185, p. 317-335, 2017.
- WILSON, Reginald H. et al. The mechanical properties and molecular dynamics of plant cell wall polysaccharides studied by Fourier-transform infrared spectroscopy. **Plant Physiology**, v. 124, n. 1, p. 397-406, 2000.
- WOO, C. H. Theory of irradiation deformation in non-cubic metals: effects of anisotropic diffusion. *Journal of Nuclear Materials*, 159, 237-256. 1988.
- YANG, Eun In et al. The role of gamma irradiation on the extraction of phenolic compounds in onion (*Allium cepa* L.). **Radiation Physics and Chemistry**, v. 81, n. 8, p. 1025-1028, 2012.
- ZAOUAK, A. et al. Impact of gamma-irradiation on the degradation and mineralization of hydroxychloroquine aqueous solutions. **International Journal of Environmental Science and Technology**, p. 1-10, 2022.
- ZHANG, Shi-lin et al. Quantification and analysis of anthocyanin and flavonoids compositions, and antioxidant activities in onions with three different colors. **Journal of Integrative Agriculture**, v. 15, n. 9, p. 2175-2181, 2016.
- ZHAO, Xue et al. Bioinspired ultra-stretchable and anti-freezing conductive hydrogel fibers with ordered and reversible polymer chain alignment. **Nature communications**, v. 9, n. 1, p. 1-8, 2018.
- ZHAO, Xin-Xin et al. Recent advances in bioactive compounds, health functions, and safety concerns of onion (*Allium cepa* L.). **Frontiers in Nutrition**, v. 8, 2021.

CAPÍTULO 3- ESTUDO DA INFLUÊNCIA DO GLICEROL INCORPORADAS AOS FILMES DE *ALLIUM CEPA*.

RESUMO GRÁFICO



RESUMO

Um polímero de fonte renovável e de origem natural é o *Allium cepa* ou cebola, que é biocompatível, não tóxico e possui capacidade de incorporar novos princípios ativos com baixo custo x benefício e de fácil acesso. O glicerol é um composto normalmente utilizado como plastificante, com a finalidade de melhorar a flexibilidade e a qualidade de filmes hidrofílicos. Estudos recentes com o uso de glicerol como plastificante demonstrou eficácia, tornando os filmes mais hidrofílicos (por aumentar a sua capacidade de interação com a água) e mais flexíveis. O objetivo deste trabalho foi desenvolver filmes de *Allium cepa* incorporado com glicerol nas concentrações de 5%, 10%, 15% e 20%. Os filmes se apresentaram transparentes, mais flexíveis e com pequeno aumento da espessura. Na composição química os resultados significativos foram atribuídos ao grupo OH que sofreram aumento de intensidade nas bandas à medida que foi incorporado o glicerol. Na análise térmica os filmes apresentaram eventos significativos, o primeiro foi a perda de água entre 30° C e 125°C. Mas não houve nenhum evento no intervalo de 133°C e 190°C para o filme W-HTP sem glicerol, mas os filmes W-HTPG 15% e W-HTPG 20% foi observado perda de massa devido evaporação do glicerol livre e o terceiro evento foi a decomposição deste filmes. Todos os filmes se apresentaram semicristalinos com um pequeno aumento na cristalinidade a medida que aumentou a concentração de glicerol. Houve alteração na resistência mecânica dos filmes com glicerol comparados com o filme sem glicerol sendo a ação plastificante observada nos filmes W-HTPG 15% e W-HTPG 20. A permeabilidade do vapor de água, bem como a solubilidade e erosão sofreram aumento com a presença do glicerol, mas a porcentagem de intumescimento diminuiu com acréscimo de glicerol. E os filmes com glicerol não apresentaram efeito citotóxico. Portanto, dadas as propriedades mostradas, a maioria dos filmes incorporados com glicerol são particularmente adequados para uso na área médica.

Palavras- chave: Biopolímeros, *Allium cepa*, glicerol.

ABSTRACT

A polymer from a renewable source and of natural origin is *Allium cepa* or onion, which is biocompatible, non-toxic and has the capacity to incorporate new active principles with low cost x benefit and easy access. Glycerol is a compound normally used as a plasticizer, in order to improve the flexibility and quality of hydrophilic films. Recent studies using glycerol as a plasticizer have demonstrated its effectiveness, making the films more hydrophilic (by increasing their ability to interact with water) and more flexible. The objective of this work was to develop *Allium cepa* films incorporated with glycerol at concentrations of 5%, 10%, 15% and 20%. The films were transparent, more flexible and with a small increase in thickness. In the chemical composition, the significant results were attributed to the OH group, which suffered an increase in intensity in the bands as glycerol was incorporated. In the thermal analysis the films presented three significant events, the first was the loss of water between 30°C and 125°C. But there was no event in the range of 133°C and 190°C for the W-HTP film without glycerol, but the W-HTPG 15% and W-HTPG 20% films showed mass loss due to evaporation of free glycerol and the third event was the decomposition of these films. All films were semicrystalline with a small increase in crystallinity as the glycerol concentration increased. There was a change in the mechanical resistance of the films with glycerol compared to the film without glycerol, with the plasticizing action observed in the films W-HTPG 15% and W-HTPG 20. The permeability of water vapor, as well as the solubility and erosion increased with the presence of glycerol, but the percentage of swelling decreased with the addition of glycerol. Therefore, given the properties shown, most films incorporated with glycerol are particularly suitable for use in the medical field.

Keywords: Biopolymers, *Allium cepa*, glycerol

1 INTRODUÇÃO

Atualmente há um grande interesse pela obtenção de biofilmes produzidos por materiais biológicos com propriedades degradáveis de fácil solubilização e com capacidade de acréscimo de aditivos (filmogênicos) (GONTARD et al., 1992; CUQ et al., 1996; HENRIQUE, 2008). Dentre as pesquisas na busca de recursos naturais destaque-se os polímeros renováveis derivados, principalmente da celulose (LAROTONDA et al., 2005)

O *Allium cepa* é um vegetal perene com parede celular composta de celulose (DOS SANTOS DIAS et al., 2020) conhecido mundialmente como cebola (KUMAR et al., 2010) cultivada principalmente para fins alimentícios, mas também utilizada na medicina (CAMPOS, 2005; KUMAR et al., 2010). Seus benefícios são devido a seus diversos componentes, como proteínas, água, gorduras, carboidratos estruturais e não estruturais (JAIME et al., 2001, PEIRCE et al., 1987), componentes minerais, como cálcio, magnésio, sódio, potássio, selênio e fósforo (KUMAR et al., 2010) tiosulfatos (o qual possui ação antiplaquetária nas artérias coronárias), frutanos (carboidrato solúvel que atua na prevenção do câncer de cólon) e flavonóides (REDESCHI, 2006). Por ser um polímero de fonte renovável de origem natural, pesquisas recentes vêm obtendo biofilmes de *Allium cepa* na utilização como biomaterial, pois além de apresentar característica biocompatível, apresenta ausência de mutagenicidade e citotoxicidade (BARRETO et al., 2020; FARACO et al., 2019)

Filmes de cebola já foram produzidos através de tratamento hidrotérmico e secos através do método casting sem aditivos funcionais para reforço mecânico e que se apresentaram com diferentes comportamentos nas suas caracterizações (DO SANTOS DIAS et al., 2020). Uma alternativa para melhorar as propriedades físicas, mecânicas, de barreira e solubilidade de alguns destes filmes, uma vez que o filme lavado com água destilada se mostrou mais rígido e quebradiço, é uso de substâncias com potencial plastificante.

O glicerol é uma das mais versáteis e valiosas substâncias químicas conhecidas para o homem. Comercialmente, o glicerol recebe, frequentemente, o nome de glicerina (BEATRIZ, 2011) A presença de três grupos hidroxila na estrutura do glicerol é responsável pela solubilidade em água e sua natureza higroscópica. É uma molécula altamente flexível formando ligações de hidrogênio tanto intra como intermoleculares (BEATRIZ, 2010; BEN, 2022).

O composto hidrofílico glicerol faz parte do grupo de compostos pólios, no qual temos também sorbitol e polietileno glicol. Esses compostos normalmente são utilizados como plastificante, onde buscam melhorar a flexibilidade e a qualidade de filmes hidrofílicos. Estudos recentes com o uso de glicerol como plastificante demonstrou eficácia, tornando os filmes mais hidrofílicos (por aumentar a sua capacidade de interação com a água) e mais flexíveis (SHIMAZU, 2007). Entre os três plastificantes, o glicerol é o que possui mais grupos –OH por carbono, seguido pelo propilenoglicol; o polietilenoglicol 400 possui apenas um –OH para uma cadeia com 9 carbonos, sendo o menos hidroxilado.

Plastificantes são aditivos muito empregados em materiais poliméricos para melhorar a processabilidade e aumentar a flexibilidade com diminuição de possíveis descontinuidades e zonas quebradiças devido a facilidade dessas moléculas de se acoplarem entre as cadeias dos polissacarídeos por quebra das pontes de hidrogênio (SILVA, 2017). São substâncias com massa molecular menor em relação ao polímero e formam com ele um material aparentemente homogêneo, mais macio, mais flexível (SCHLEMMER, 2010). Quando adicionado à solução filmogênica, o plastificante modifica a organização molecular da rede amilácea aumentando o volume livre na molécula, causando alterações como o aumento de flexibilidade, extensibilidade, diminuição na resistência mecânica, temperatura de transição vítrea e barreira a gases e vapor de água (PASCHOALICK et al., 2003). A compatibilidade entre o plastificante e o polímero é essencial para uma plastificação eficaz e vários parâmetros podem indicar essa característica, incluindo polaridade, ligação de hidrogênio (CHOI, 2004).

Os plastificantes são geralmente adicionados na proporção de 10 a 60 g/100g matéria seca, dependendo do grau de rigidez do material (GONTARD; GUILBERT; CUQ, 1993).

De acordo como artigo publicado por Dos Santos Dias et al. (2020) os filmes lavados apresentam propriedades mais promissoras, maior pureza (ausência de açúcares naturais) e transparência superior. Nesse projeto optamos em trabalhar apenas com o filme lavado, tendo em vista a aplicação para área médica.

Este estudo tem como objetivo avaliar os efeitos sobre as propriedades físicas, químicas, térmicas, mecânicas e citotóxicas de filmes de *Allium cepa* obtidos pelo métodos de lavagem com lavados com água destilada e incorporados com glicerol

nas concentrações de 5%, 10%, 15% e 20%. Além disso, os filmes produzidos foram comparados entre si, tendo os materiais sem glicerol como controle.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliação dos filmes de *Allium cepa* L. incorporados com glicerol.

2.2 Objetivos específicos

Estudar os filmes de *Allium cepa* lavados e incorporadas com glicerol nas proporções de 5%, 10%, 15% e 20% com suas caracterizações térmicas, estruturais, morfológicas, mecânicas e citotóxicas dos filmes incorporados com glicerol.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Produção dos filmes baseados em *Allium cepa*.

Os filmes de cebola foram produzidos utilizando a tecnologia pertencente à BioSmart Nanotechnology que foi desenvolvida pelo Dr. Diógenes projeto PIPE Fase I (N do processo: 2016/15504-2) (DOS SANTOS DIAS et al., 2020)

Após esses procedimentos, os filmes foram preparados por casting. Para isso, a suspensão aquosa contendo a polpa de cebola foi vertida em placas de Petri e seca a 40°C por 6 h em câmara de aquecimento (Quimis, 0314M272, Brasil).

3.2 Obtenção de polpa de *Allium cepa* com glicerol

Glicerol foi adicionado à solução filmogênica obtidos pelo método acima citado formada em diferentes concentrações 5%, 10%, 15% e 20% (p/v) (SHIMAZU; 2007, GONÇALVES et al.,2019). Foi utilizada 1% de massa seca. As polpas lavadas foram misturadas com glicerol na quantidade de 0,05g de glicerol (5%) em 100g de polpa, 0,10g de glicerol (10%) em 100g de polpa de cebola, 0,15g de glicerol (15%) em 100g de polpa e 0,20g de glicerol (20%) em 100g de polpa.. Foram vertidas em placas de petri de plásticos polietileno com diâmetro 90mm. As placas de petri foram levadas para estufa em uma temperatura de 50° C por um tempo de aproximadamente 6 horas. Foi obtido filmes de cebola lavados com glicerol: (W-HTPG 5%), (W-HTPG 10%), (W-HTPG 15%), (W-HTPG 20%). Então foram produzidos filmes sem glicerol (W-HTP) e com glicerol (W-HTPG)

3.3 Caracterizações

3.3.1 Espessura dos filmes

A espessura dos filmes foi determinada utilizando um micrômetro externo digital 0-25mm precisão 0.001mm Shahe, A espessura final foi a média aritmética de 5 medidas aleatórias sobre a área do filme.

3.3.2 Transparência e opacidade

A transparência e a opacidade dos filmes foram medidas usando um espectrofotômetro Lambda 365 UV-Vis. Amostras retangulares de 1 cm x 4 cm foram colocadas no espectrofotômetro. O espectro de transmitância entre 200 e 800 nm foi registrado. Os resultados de transparência e opacidade foram calculados usando as seguintes fórmulas:

$$\text{Transparência (\%)} = \text{Abs600}/L$$

$$\text{Opacidade} = \text{Abs600} \times L$$

onde Abs600 é o valor de absorvância espectrofotométrica no comprimento de onda de 600 nm, e L é a espessura do filme comestível em mm.

3.3.3 Microscopia eletrônica de varredura por emissão de campo (MEV)

A análise morfológica foi realizada por microscópio eletrônico de varredura (JEOL JSM-6510) com tensão de aceleração de 5 kV. Antes da observação por microscopia eletrônica, as superfícies fraturadas foram revestidas com liga de Au com um dispositivo de revestimento SEM (SEM BALTEC MED 020). O revestimento fornece a toda a superfície da amostra uma camada homogênea do metal de 9 nm.

3.3.4 Espectroscopia infravermelha de transformada de Fourier (FTIR)

O espectro de FTIR e a presença de grupos funcionais das amostras foram analisados usando um Cary 630 FTIR Spectrometer Agilent. Um total de 32 varreduras com resolução de 4 cm^{-1} variando de (4000 a 800 cm^{-1}) foram registrados.

3.3.5 Análise termogravimétrica (TGA)

A estabilidade térmica das amostras de filme foi feita usando TA Instruments (Q600 SDT). O teste foi realizado utilizando 10 mg do filme que foi colocado e aquecido na bandeja de alumínio de 30 a 500 °C sob uma faixa de aquecimento constante de 30 °C/min em atmosfera de nitrogênio. A redução de peso versus temperatura foi ilustrada na análise de TGA.

3.3.6 Análise de difração de raios X (DRX)

Os bioplásticos W-HTP e W-HTFG foram analisados em um difratômetro de raios X (BRUKER, D8 Advance, EUA). A análise foi em 2 intervalos entre 5° e 35° com um tamanho de passo de 0,02° em um modo contínuo de 4°/min, uma fenda de Soller de divergência de 2,5° e um Detector sensível à posição Lynxeye. O difratômetro foi operado usando radiação $\text{CuK}\alpha$ a 40 kV e 40 mA. Primeiramente, as curvas foram deconvoluídas considerando uma Função Gaussiana (MUKOYAMA, 2017), visando distinguir os picos cristalinos dos halos amorfos e então determinar o índice percentual de cristalinidade (CrI (%)) conforme a Equação (1), onde $I(200)$ e I_{am} representam a

intensidade máxima do pico cristalino em relação ao plano (200) e a intensidade mínima entre os picos de (110) e (200) (SEGAL et al., 1959).

$$\text{Crl (\%)} = \frac{I(200) - I_{am}}{I_{am}} \quad (1)$$

3.3.7 Propriedades mecânicas

As propriedades mecânicas foram avaliadas utilizando o ASTM DL-2000. As amostras de filme foram mantidas nas condições ambientais. Na análise das propriedades mecânicas das amostras de filmes, foi utilizada uma célula de carga de 50 kgf. Inicialmente, as amostras de filme foram cortadas em pedaços retangulares com escala de (80x20mm) e o comprimento padrão das amostras foi fixado em 10 mm. Os corpos de prova foram mantidos com velocidade de 0,83 mm/s⁻¹ da cruzeta para retirada dos corpos de prova. A deformação (mm) e a força (N) do corpo de prova foram então registradas. A avaliação das propriedades mecânicas foi realizada utilizando o valor médio das medições.

Para a análise do ângulo de contato, foram utilizadas amostras de filmes nas dimensões de 3 x 1 cm². A molhabilidade da superfície dos filmes foi baseada no método da gota séssil empregando um goniômetro de ângulo de contato (Ramé-hart modelo 260 série F4) e o software DROPimage Advanced. O ângulo de contato foi relatado através da média de 5 medidas em cada filme.

3.3.8 Teste de intumescimento

Recortes de 2cm² de cada filme foram pesados obtendo-se a massa seca (Ms) e em seguida transferidos para frascos Erlenmeyer de 50 mL de capacidade com 25 mL de água destilada e mantidos à 4°C em geladeira. As pesagens foram realizadas a cada 15 minutos até peso constante obtendo-se a massa úmida (Mu). A taxa de intumescimento (Ti) foi calculada pela seguinte equação:

$$Ti = \frac{Mu - Ms}{Mu} \times 100$$

Em que Mu é a massa úmida do recorte da membrana e Ms é a massa seca da mesma.

3.3.9 Propriedade de barreira (PVA)

O conjunto de análise para o estudo das propriedades de barreira dos filmes de cebola incluiu o coeficiente de permeabilidade (α), taxa de transmissão de vapor d'água (TPVA) e permeabilidade ao vapor d'água (PVA). Para os experimentos, 5 g de CaCl_2 anidro – previamente seco a 200 °C por 1 h – foram colocados dentro de frascos ($\varnothing = 30$ mm; altura = 75 mm) com roscas perfuradas. Os filmes W-HTP e W-HTPG foram cortados em forma circular com diâmetro igual a 15 mm e foram colocados na superfície aberta dos frascos. Em seguida, os frascos foram inseridos em um reator contendo 100 ml de solução aquosa de NaCl e mantidos à temperatura de $30 \pm 2^\circ\text{C}$, e os frascos foram pesados a cada hora por 8 h. O WVTR foi determinado posteriormente através da Equação (2), em que α e A representam a massa de umidade permeada durante este tempo (g h^{-1}) e a área da amostra disponível para permeação (m^2), respectivamente.

$$TPVA = \frac{\alpha}{A} \quad (2)$$

O PVA foi calculado de acordo com uma modificação da metodologia do copo gravimétrico descrita por McHugh et al. (1993), que é baseada na norma ASTM E96M-16. Para esta propriedade, a espessura dos filmes (e) foi levada em consideração no cálculo, que foi feito pela Equação (3). RH e P_v são a umidade relativa (cerca de 75%) e a pressão de vapor (31,824 mmHg), nesta ordem.

$$PVA = \frac{xTPVA.e}{P_v.RH} \times 100 \quad (3)$$

3.3.10 Avaliação da solubilidade dos filmes em água

A solubilidade em água foi determinada com corpos de prova de 2 cm^2 . A massa seca inicial foi pesada, após secagem a $50 \pm 2^\circ\text{C}$ por 2 horas. Os corpos de prova foram imersos em recipiente contendo 50 mL de água destilada e colocados sob agitação de 50 rpm, durante 24h, em temperatura de ambiente. A suspensão resultante foi filtrada e o resíduo foi seco à temperatura de 105 °C por 24 horas. Após pesagem, foi determinada a quantidade de matéria seca não solubilizada. A solubilidade do filme foi expressa em porcentagem de massa solubilizada em relação à massa inicial (GONTARD et al., 1994).

$$S = \frac{M_i - M_f}{M_i} \times 100$$

3.3.11 Ensaio de Erosão

Para o teste de erosão, os FOD foram cortados e pesados com precisão e depois colocados no fundo de frascos contendo solução de saliva artificial a 37 ° C com 50 rpm de agitação durante 30 minutos. Após o tempo de imersão, os filmes foram removidos, secos na estufa a 60° C até peso constante e pesados novamente. A erosão foi calculada gravimetricamente.

3.3.12 Ensaio de Citotoxicidade

Os testes de citocompatibilidade in vitro foram conduzidos em Gibco™ Human Dermal Fibroblasts, adulto (HDFa), de acordo com o I.S. EN International Organization for Standardization (ISO, 2009) 10993-5, usando o método de contato indireto. Avaliamos a viabilidade celular usando o ensaio quantitativo MTT. O ensaio MTT é uma reação colorimétrica que mede a atividade metabólica celular. Este ensaio baseia-se na capacidade de succinato desidrogenases mitocondriais de células viáveis para reduzir o corante tetrazólio brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio (MTT) a cristais de formazano insolúveis roxos. Resumidamente, as células foram semeadas em placas de cultura de 96 poços em Meio Essencial Mínimo de Dulbecco (DMEM) suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS) e 1% de antibióticos (penicilina, estreptomicina e neomicina) a uma densidade celular de 2×10^4 células/bem, e mantidos a 37°C em atmosfera umidificada com 5% de CO₂ por 24 h para permitir a adesão celular. O W-HTP e o W-HTPG foram cortados em discos de 5 mm de diâmetro e esterilizados sob luz ultravioleta por 40 min. Assim, as amostras foram adicionadas aos frascos cônicos contendo 3 mL de meio DMEM no agitador por 24 h. Em seguida, o extrato médio derivado de cada amostra foi adicionado aos poços e as células foram incubadas por 24 h. Após esse período, o meio de cultura foi substituído por solução de MTT 1 mg/mL e as placas foram incubadas por 3 h a 37 °C. Em seguida, os cristais insolúveis de formazan formados foram dissolvidos com isopropanol por agitação suave por 5 min à temperatura ambiente e a absorbância foi medida a 570 nm usando um leitor de microplacas SoftMax Pro 5. Células não tratadas foram usadas como controle negativo. Os resultados foram calculados usando a seguinte equação:

$$\text{Viabilidade(\%)} = \frac{\text{absorção da amostra} - \text{absorvância em branco}}{\text{Controle de absorvância negativa} - \text{absorvância em branco}} \times 100$$

O controle negativo foi considerado 100% viável. Todas as amostras foram testadas em triplicata em três ensaios independentes e os dados foram calculados como valores médios \pm DP (n = 9).

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 Características dos filmes

A primeira caracterização foi avaliar o aspecto visual dos filmes. Os filmes obtidos com glicerol se mostraram contínuos, sem fraturas ou rupturas após a secagem (figura 3.1 a); já o filme sem glicerol se mostrou mais rígido e quebradiço (figura 3.1 b) e no geral, todos os filmes apresentaram-se transparentes e com bom aspecto. Os filmes com glicerol foram mais fáceis de manipular devido suas características de flexibilidade, mas o filme puro necessitava mais cuidado por ser mais rígido.

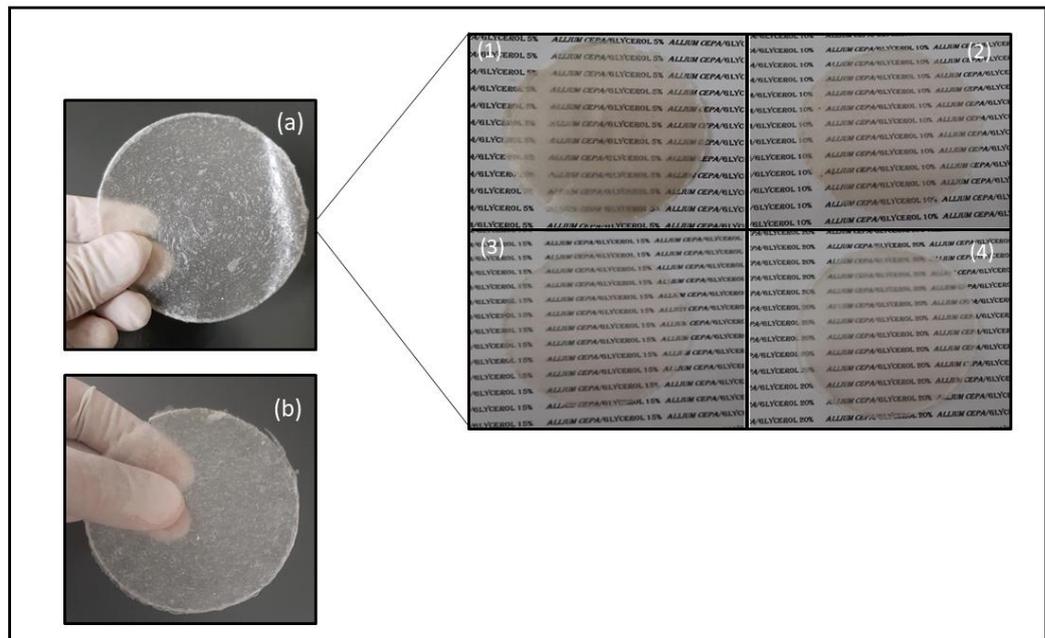


Figura 3.1 Imagens dos filmes de *Allium cepa* obtidos com glicerol nas concentrações de 5% (a1), 10% (a2), 15% (a3) e 20% (a4) e filme sem glicerol (b).

Com relação a opacidade os filmes apresentaram aspectos de transparência. Os filmes com glicerol apresentaram mais transparentes do que o filme sem glicerol, sendo o filme de 20% foi o mais transparente sendo a opacidade uma grandeza inversamente proporcional à passagem de luz e a transparência diretamente proporcional (Marques, 2018). (figura 3.2).

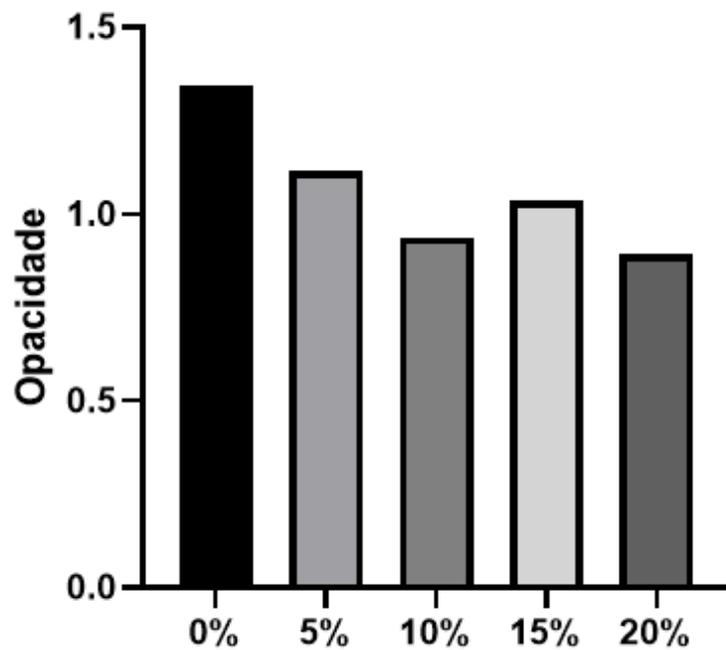


Figura 3.2 Opacidade dos filmes de Allium cepa obtidos com glicerol nas concentrações de 5%, 10%, 15% e 20% e filme sem glicerol (0%).

4.2 Espessura dos filmes

Os filmes W-HTPG, W-HTPG 5%, W-HTPG 10%, W-HTPG 15% e W-HTPG 20% apresentaram espessura média de $0,0670 \pm 0,001$, $0,0677 \pm 0,003$, $0,0720 \pm 0,002$, $0,0728 \pm 0,002$ e $0,0730 \pm 0,006$, respectivamente. Os resultados mostraram que as concentrações de glicerol afetaram diretamente a espessura do filme biodegradável produzido (Figura 3.3). Ao realizar essas análises, é possível observar a variação na espessura desses filmes, pois sua espessura final varia de acordo com a evaporação do solvente que depende do microambiente, ainda mais quando são incorporados aditivos em sua composição (BORGES MF ,2018).

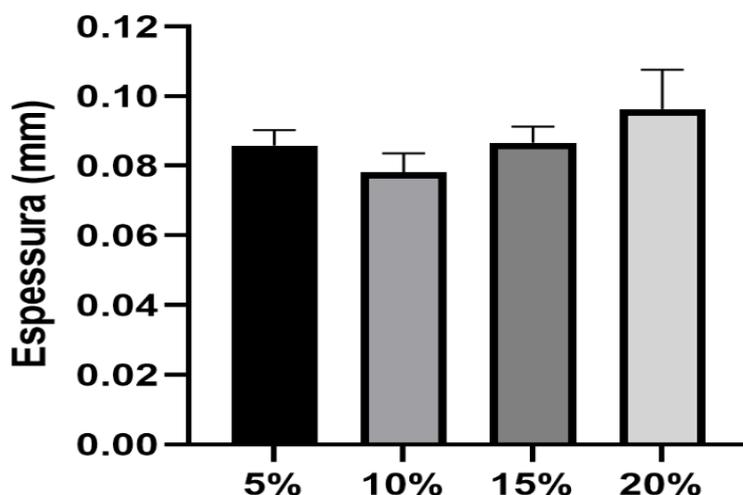


Figura 3.3 Espessura dos filmes de *Allium cepa* obtidos com glicerol nas concentrações de 5%, 10%, 15% e 20% e filme sem glicerol (0%).

Shimazu 2007 estudando os efeitos plastificante e antiplastificante do glicerol de filmes de amido de mandioca produzidos por casting em diferentes concentrações de glicerol (0, 5, 10, 15, 30 e 40 g/100 g de amido) constataram que a espessura dos filmes variou à medida que o teor de plastificante aumentou. Também Gonçalves et al 2019 verificaram que filmes de acetato de celulose (CA) incorporando 5, 10, 20, 30 e 50% (p/v) de glicerol adicionado contribuiu para aumentar a espessura dos filmes.

4.3 Microscopia eletrônica de varredura por emissão de campo (MEV)

Pode-se observar que a superfície do filme não plastificado (W-HTP) é nítida e áspera, enquanto os filmes plastificados exibiam uma textura de superfície mais lisa. Esses resultados indicam que a adição de glicerol melhora consideravelmente a homogeneidade dos filmes indicando compatibilidade com a estrutura da cebola (celulose), uma vez que o glicerol é formado por três grupos hidroxila capazes de interagir com os grupos oxigênio e hidroxila da celulose. No entanto, quando o teor de glicerol foi superior a 15% em peso, a superfície de fratura mostrou traços do que parecia ser uma fase líquida devido à separação de fases (figura. 3.4).

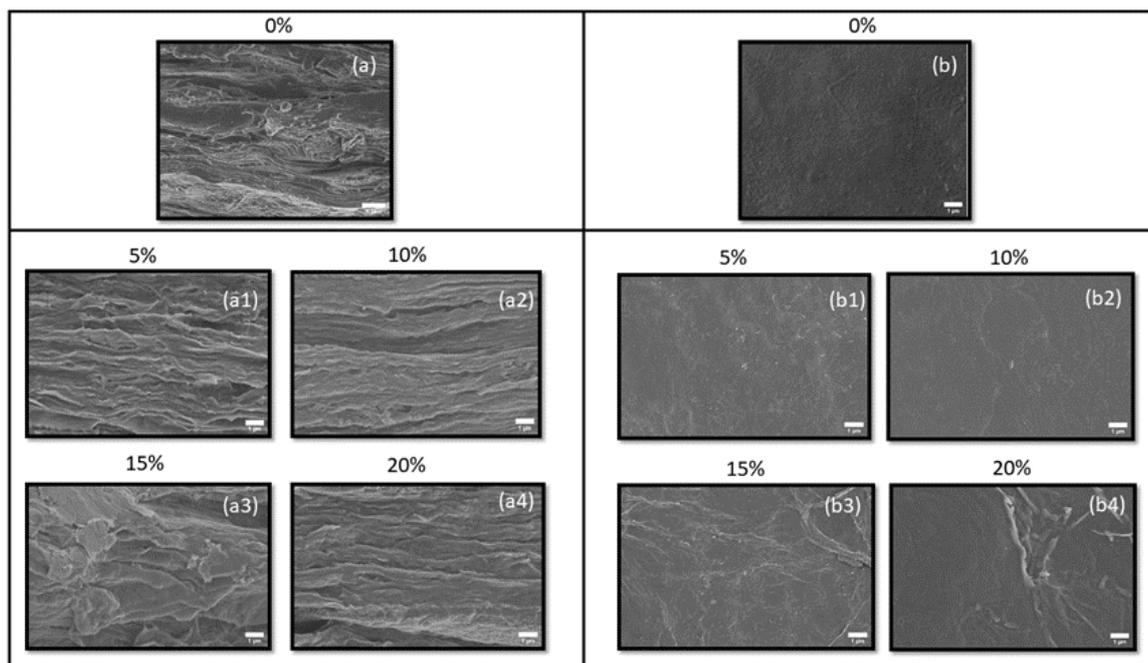


Figura 3.4 Imagem MEV dos filmes de *Allium cepa* obtidos com glicerol nas concentrações de 5%, 10%, 15% e 20% e filme sem glicerol (0%).

Em se tratando de membranas para regeneração óssea na odontologia uma característica muito importante é que estas membranas precisam apresentar uma superfície adjacente ao tecido gengival (retalho) lisa para impedir a invasão do tecido fibroso e outra superfície mais porosa adjacente ao osso para favorecer a invasão dos osteoblastos. (SCHLEGEL et al., 1997)

4.4 Espectroscopia infravermelha de transformada de Fourier (FTIR)

Os espectros FTIR de todos os filmes, W-HTPG, W-HTPG 5%, W-HTPG 10%, W-HTPG 15% e W-HTPG 20% são apresentados na Figura 3.5.

Com base na Figura 3.5, todos os filmes apresentaram espectros semelhantes ao filme de cebola como demonstrado por Dias et al. (2020). As bandas entre 3000 a 3600 cm^{-1} foram observadas em todos os filmes, que se referem à vibração de estiramento de grupos O-H principalmente de água, carboidratos, pectinas e glicerol. Porém, para os filmes com maior concentração de glicerol, W-HTPG 15% e W-HTPG 20%, é possível observar que esta banda se divide em 2 picos em 3326 e em 3273 cm^{-1} . Além disso, as vibrações de estiramento C-H dividem-se em picos em 2923 cm^{-1} e em 2883 cm^{-1} para os filmes W-HTPG 15% e W-HTPG 20% (NGUYEN et al. 2022).

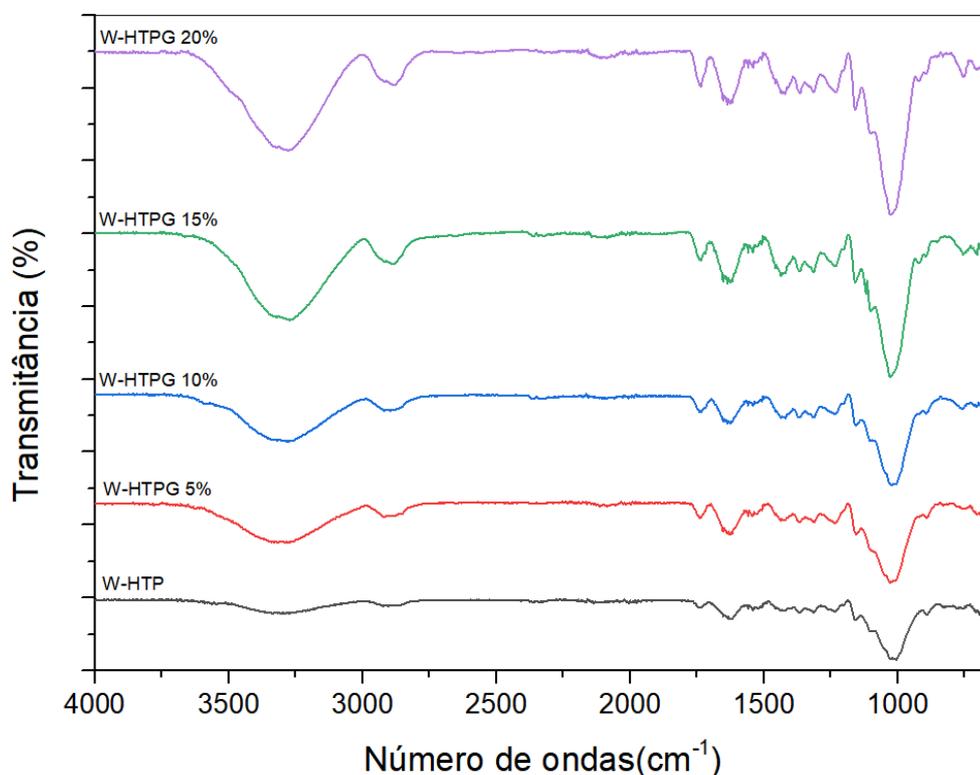


Figura 3.5 Espectro de Infravermelho (4000- 800 cm^{-1}) dos filmes de *Allium cepa* incorporados com glicerol nas concentrações de 5%, 10%, 15% e 20%.

Resultados semelhantes foram encontrados em testes com filmes de acetato de celulose (CA) obtidos pelo método casting e incorporados com 5, 10, 20, 30 e 50% (p/v) de glicerol. Este trabalho teve como objetivo de avaliar as possíveis alterações causadas pelo plastificante nas propriedades funcionais da embalagem observaram que a adição de glicerol causou um aumento nas bandas 2936 cm^{-1} referente ao alongamento CH e na banda 3478 cm^{-1} do alongamento OH e que esta banda proeminente, que pode ser observada nos filmes W-HTPG 15% e 20% pode estar relacionada à maior quantidade de OH presente no filme resultante da adição de glicerol (GONÇALVES et al., 2019). Isso indica que a adição de glicerol nos filmes interrompeu as pontes de hidrogênio, espalhando as cadeias e aumentando a flexibilidade dos compostos (AL-MASRY et al., 2021).

O pico em 1735 cm^{-1} refere-se às vibrações de estiramento C=O do ácido poligalacturônico (PGA) na pectina presente nos filmes de cebola (DOS SANTOS DIAS et al., 2020; SAGAR et al., 2021; DE OLIVEIRA, 2020). Os grupos de vibração de estiramento O-H do glicerol foram observados na faixa de $1634\text{-}1625\text{ cm}^{-1}$. Esse pico de absorção também pode ser atribuído ao grupo OH da água absorvida nos filmes de cebola (SAPUAN & KHALINA, 2021). A vibração de flexão C-O-H foi atribuída pelo pico em 1422 cm^{-1} . Grupos funcionais incluindo C–O–C e C–OH foram observados pelos picos de absorção de 1150 cm^{-1} e 1105 cm^{-1} , respectivamente. A banda mais alta na faixa de $1085\text{-}940\text{ cm}^{-1}$ foi associada à vibração de estiramento C-O de álcool primário e secundário pertencente ao glicerol e compostos polissacarídeos presentes em filmes de cebola (DOS SANTOS DIAS et al., 2020; NGUYEN et al., 2022 ; TARIQUE, SAPUAN & KHALINA, 2021; BASIAK, LENART & DEBEAUFORT, 2018). Portanto, a análise FTIR revelou que os filmes são estáveis após a adição de glicerol porque nenhuma reação química ocorreu entre o plastificante e os compostos no filme de cebola.

4.5 Termogravimetria TG DTG.

O comportamento térmico dos filmes W-HTP e W-HTPG foram avaliados por termogravimetria (Figura 3.6). As amostras apresentaram três etapas distintas de perda de massa, localizadas nas seguintes faixas de temperatura (Figura 3.6 a,b). A figura 3.6 (b1) mostra que a curva do filme W-HTP sem glicerol apresentou perda de massa entre 30° C a 125° C atribuída a umidade ou presença de água estrutural no filme. No intervalo entre 133° C a 190° C não é observado nenhum evento para os filmes W-HTP sem glicerol e com W-HTPG 5% e W-HTPG 10 % (figura 3.6b2), porém no filme W-HTPG 15% e W-HTPG 20% é observado perda de massa provavelmente devido vaporização do glicerol livre. O 3º evento com pico máximo de em 342°C é atribuída a decomposição do filme W-HTP sem glicerol e dos filmes W-TPG com ligação de ponte de hidrogênio(figura 3.6 b3)

No filme W-HTP sem glicerol não há evento, não apresenta evaporação, mas provavelmente há evaporação de glicerol livre com picos endotérmicos mais acentuados nos filmes W-HTPG 15% e W-HTPG 20% (figura 3.6b2). O glicerol reduziu a estabilidade térmica dos filmes (GAO et al., 2021).

Resultados similares foram encontrados com alginate processado com glicerol nas concentrações de 10, 20, 30, 40 e 50% em que alginate incorporado com glicerol apresentou perda de peso abaixo de 200 °C foi progressiva com o aumento da temperatura devido à perda contínua de ambos os plastificantes, água e glicerol. Em seguida, o pico correspondente nas curvas DTG apareceu em temperatura mais alta e aumentou com o incremento no teor de glicerol por causa da temperatura de evaporação mais alta do glicerol. O alginate plastificado demonstrou uma diminuição da temperatura de degradação térmica que mudou para uma temperatura mais baixa conforme o teor de glicerol aumentou, indicando que a adição de glicerol diminuiu a estabilidade térmica (GAO, 2018).

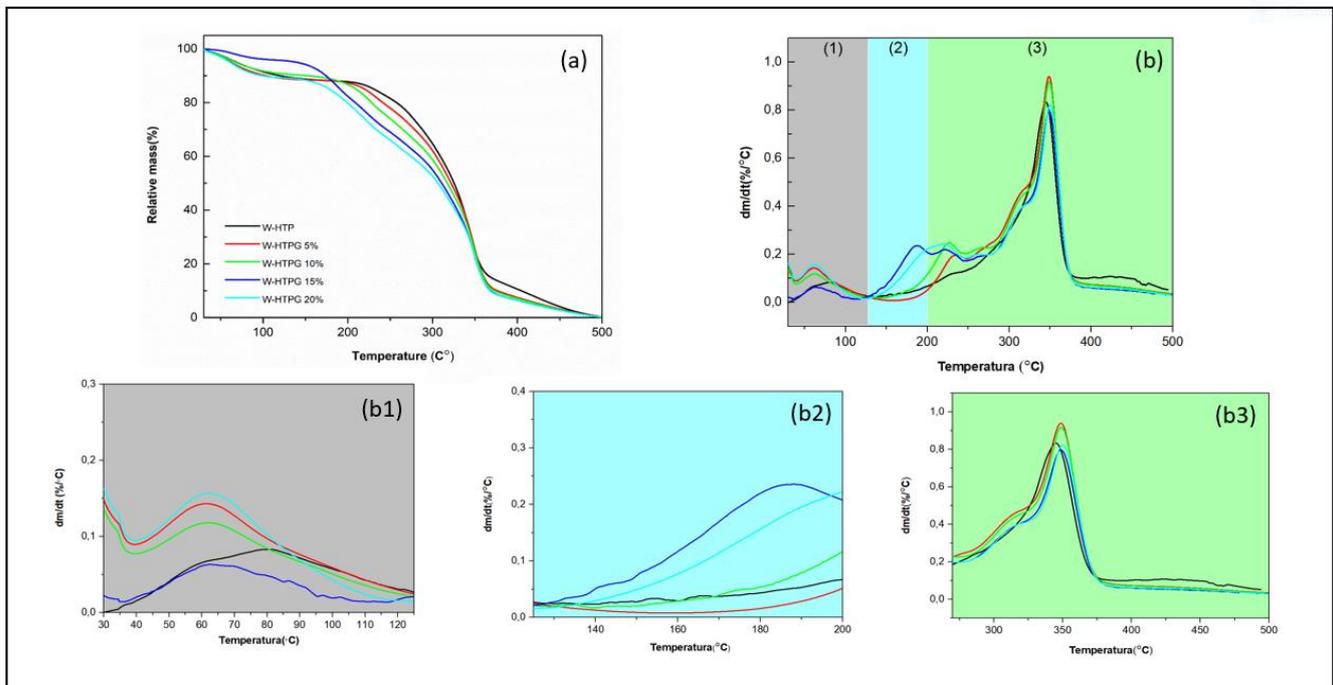


Figura 3.6 Curvas TG e DTG e DSC dos filmes W-HTP sem glicerol e W-HTPG nas concentrações de 5%, 10%, 15% e 20%.

4.6 Difração de raio x (DRX)

O DRX pode fornecer a razão entre a parte cristalina, a fração mais ordenada, e a quantidade amorfa, a fração menos ordenada, em materiais contendo celulose. Após a deconvolução, o DRX apresentou picos (Δc) em 16,1-16,8° e 22,1-22,2° atribuídos, respectivamente, aos planos cristalográficos (110) e (200) da fase cristalina

da celulose presente no bioplástico, Figura 3.7. Além disso, todas as amostras apresentaram celulose com grau médio de cristalinidade, em torno de 50%, sendo o maior valor para a amostra W-HTPG 10% e o menor para o W-HTP, Tabela 3.1. A ordem crescente de cristalinidade pode estar relacionada à rigidez crescente das fibras de celulose presentes no bioplástico ou devido a um rearranjo das cadeias por pontes de hidrogênio causadas pela presença do glicerol (GONÇALVES, 2019). No entanto, nenhuma variação significativa de Cr(%) é observada entre as amostras.

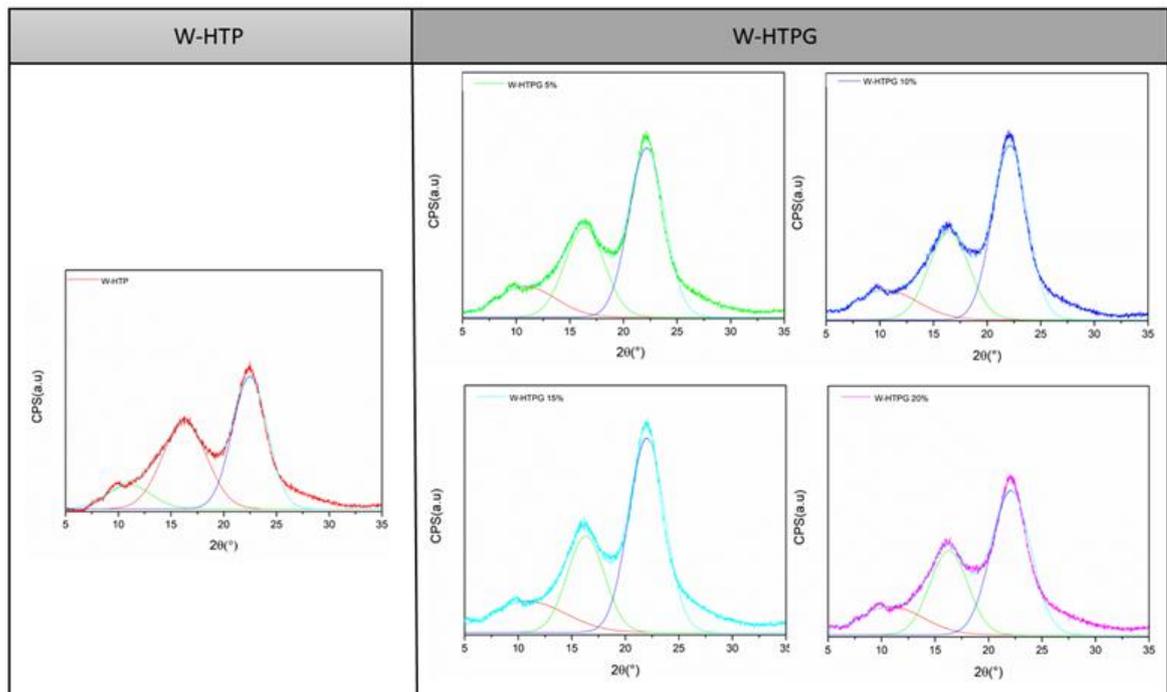


Figura 3.7 Análise DRX dos filmes W-HTP sem glicerol e W-HTPG nas concentrações de 5%, 10%, 15% e 20%.

Tabela 3.1 Intensidade dos picos cristalinos – denominados I(200) e lam – e índice de cristalinidade (Crl) dos filmes HTP e W-HTP irradiados com doses entre 5 e 40 kGy de radiação γ .

Amostras	Teor de glicerol (%)	lam/ (°)	I002 (°)	Crl (%)
	0	1772	3414	48.09
	5	1930	4166	53.67
W-HTP	10	1932	4216	54.17
	15	2154	4676	53.93
	20	1878	3646	48.58

4.7 Propriedade mecânica

O comportamento mecânico pode ser avaliado por dados de tensão versus deformação enfatizando a resistência à tração (σ_T), o módulo de Young (E) e o alongamento à ruptura (ϵ_R). A Figura 3.8 exibe o gráfico de colunas da resistência à tração, módulo de Young e alongamento na distribuição de ruptura dos bioplásticos W-HTP e W-HTPG 5, 10, 15 e 20% de glicerol. Os dados das propriedades mecânicas são apresentados na Tabela 3.2. Os bioplásticos contendo glicerol (W-HTPG) apresentaram tenacidade superior em relação ao W-HTP devido à sua resistência à tração e alongamento na ruptura relativamente maior. Também pode ser visto que a presença crescente de glicerol em bioplásticos W-HTPG aumenta sua tenacidade. No entanto, o efeito inverso é observado para o módulo de Young. Sobre o módulo de Young, Figura 3.8 Tabela 3.2, verifica-se que o desempenho do glicerol como plastificante é significativamente verificado para bioplásticos W-HTPG contendo glicerol em quantidade superior a 10%. O objetivo de determinar o módulo de Young é medir a deformação da resistência, que pode ser usado para refletir a rigidez e a resistência do filme, assim, seu valor sendo alto indica a rigidez do filme o que requer altas cargas para deformá-lo elasticamente e valores mais baixos correspondem a filmes flexíveis, que requerem cargas mais baixas para deformar elasticamente. Verifica-se que o módulo de Young dos bioplásticos 15% W-HTPG e 20% W-HTPG sofreu uma redução mais significativa e, como resultado, tornou-se mais flexível,

provavelmente devido à presença de glicerol livre em excesso atuando como plastificante, conforme verificado nas curvas TG/DTG-DSC. Um distúrbio pode ter causado isso na rede polimérica (LIU et al., 2013; GALDEANO et al., 2009) devido ao enfraquecimento das ligações de hidrogênio e interações intra e intermoleculares dipolo-dipolo devido à blindagem dessas forças atrativas pelas moléculas de glicerol livre.

Plastificantes são comumente incorporados em um bioplástico para aumentar sua flexibilidade, trabalhabilidade e distensibilidade, reduzindo o nível de interações intermoleculares, aumentando a distância entre as cadeias poliméricas e, como resultado, a liberdade de movimento (DOS SANTOS DIAS et al., 2020; ZHANG, 2016; LIM, 2013; BERTUZZI, 2012).

Resultados semelhantes foram encontrados num estudo que teve como objetivo melhorar as propriedades limitadas de filmes de ácido poliláctico (PLA), investigando o efeito da incorporação de diferentes concentrações de nanoargila de haloisita e adicionando plastificante glicerol onde obteve resultados de redução do módulo de Young e aumento da tenacidade e do alongamento de ruptura (OTHMAN et al., 2017)

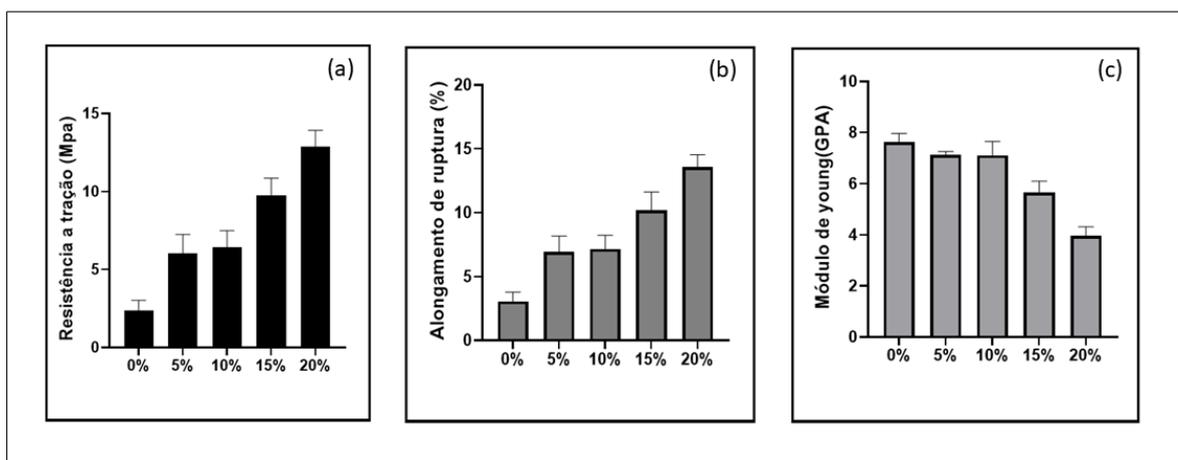


Figura 3.8 Colunas de distribuição de resistência à tração (σ_T), módulo de Young (E) e alongamento na ruptura (ϵ_R) de bioplásticos W-HTP e W-HTFG 5, 10, 15 e 20% de glicerol.

Tabela 3.2 Mostra a resistência a tração, alongamento de ruptura e módulo de Young dos filmes W-HTP sem glicerol (0%) e W-HTPG nas concentrações de 5%, 10%, 15% e 20%.

W-HTPG			
Amostra (Glicerol%)	Alongamento de ruptura (%)	Módulo de Young (GPa)	Resistência a tração (Mpa)
0	3,16±1,95	7,63±0,33	2,50±0,86
5	6,92±1,25	7,12±0,14	6,01±1,23
10	7,15±1,07	7,11±0,54	6,43±1,06
15	10,17±1,44	5,65±0,45	9,76±1,09
20	13,55±0,98	3,96±0,35	12,89±1,03

Vale ressaltar que as membranas utilizadas para regeneração óssea não podem ser tão maleáveis que pode causar complicações na manutenção do espaço necessário para a regeneração óssea e sua característica física macia pode prejudicar a estabilidade da membrana frente a pressão ou compressão e não muito rígida que possa apresentar dificuldade ao ser moldada e a falta de adaptação de suas bordas, possivelmente afiadas, podem perfurar o tecido gengival e causar a subsequente exposição desta membrana (BECKER et al., 1996). Talvez a opção dos filmes de 5 ou 10% de glicerol seja o ideal entre estas concentrações desta pesquisa para produção de filmes para regeneração óssea guiada.

4.8 Teste de Intumescimento

Para avaliar a cinética de absorção de água, o filme W-HTP puro e os filmes W-HTPG com várias porcentagens de glicerol adicionado a 5%, 10%, 15% e 20% (v/p) foram imersos em água por 105 minutos e sua massa foi medida em tempos predefinidos. A Figura 3.9 mostra a porcentagem de água absorvida para as amostras W-HTP (500%), W-HTPG 5% (492,11%), W-HTPG 10% (464,51%), W-HTPG 15% (391,89%) e W-HTPG 20% (380,55%). Os filmes HTP e HTPG foram caracterizados por um rápido aumento na absorção de água nos primeiros 15 minutos e atingiram o equilíbrio em 75 minutos. Apesar da diminuição do intumescimento com aumento da concentração de glicerol a comparação entre as amostras usando t test dos filmes

tanto com glicerol como sem glicerol não foi significativamente diferente entre os filmes W-HTP puro e W-HTPG com 5-20% de glicerol.

Os resultados sugerem que a incorporação de glicerol ao filme polimérico diminui a hidrofília do sistema. À medida que aumentou a concentração de glicerol diminuiu o poder de intumescimento de água, devido caráter higroscópico do glicerol que causa a redução das forças intermoleculares dos polímeros que o compõe. Isso se deve pela maior disponibilidade das hidroxilas livres do glicerol para interagir com as moléculas de que compõem o filme de cebola. (ALMEIDA et al., 2013).

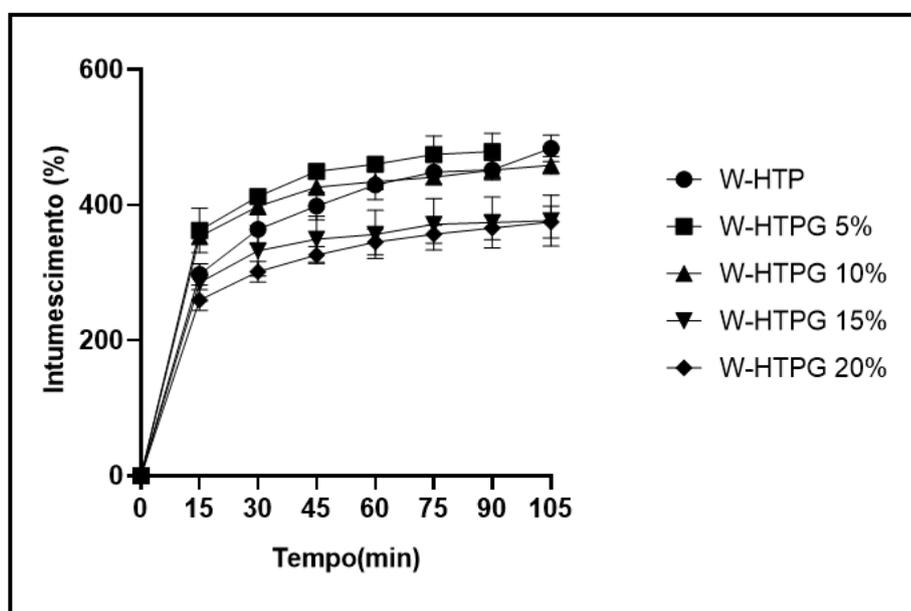


Figura 3.9 Análise de intumescimento dos filmes W-HTP sem glicerol e W-HTPG nas concentrações de 5%, 10%, 15% e 20%.

Estes resultados foram similares aos encontrados por Shimazu (2007) que constataram um decréscimo na capacidade de hidratação com aumento do teor de glicerol de filmes com 15% de glicerol que apresentaram hidratação mínima.

4.9 Propriedade de barreira (PVA)

A figura mostra o coeficiente de permeabilidade (α), permeabilidade ao vapor de água (PVA) e taxa de transmissão de vapor de água (TPVA) do bioplásticos aqui investigados. Conforme mostrado na Fig. (3.10) PVA de W-HTP puro e W-HTPG

diferente plastificado com glicerol 5-15% não mostraram diferenças significativas. Os resultados também mostraram que um aumento de 5% para 15% de glicerol não afetou o PVA dos filmes. No entanto, maior PVA foi confirmado para filme W-HTPG contendo 20% de glicerol (CAZON, 2020). Este resultado foi um indicativo de que a adição de glicerol à estrutura do W-HTP pode aumentar a transferência de umidade (BEN, 2022). Este comportamento pode estar relacionado com a mudança da estrutura da celulose em combinação com glicerol que possui um caráter hidrofílico (MALI et al.,2004; GONTARD, 1993). Laohakunjit (2004) pesquisando efeito de plastificantes do glicerol nas concentrações de 20, 25, 30 e 35% no filme de amido de arroz verificaram que a TPVA aumentou com aumento da concentração de glicerol. Em nossa pesquisa o aumento mais acentuado foi do filme de 20% glicerol do TPVA, bem como PVA.

A concentração de plastificante pode influir na propriedade de barreira de materiais poliméricos (GONÇALVES, 2019) bem como a espessura do filme (MALI et al.,2004). Neste trabalho, o aumento da concentração de glicerol influenciou o efeito da espessura dos filmes, causando também seu aumento.

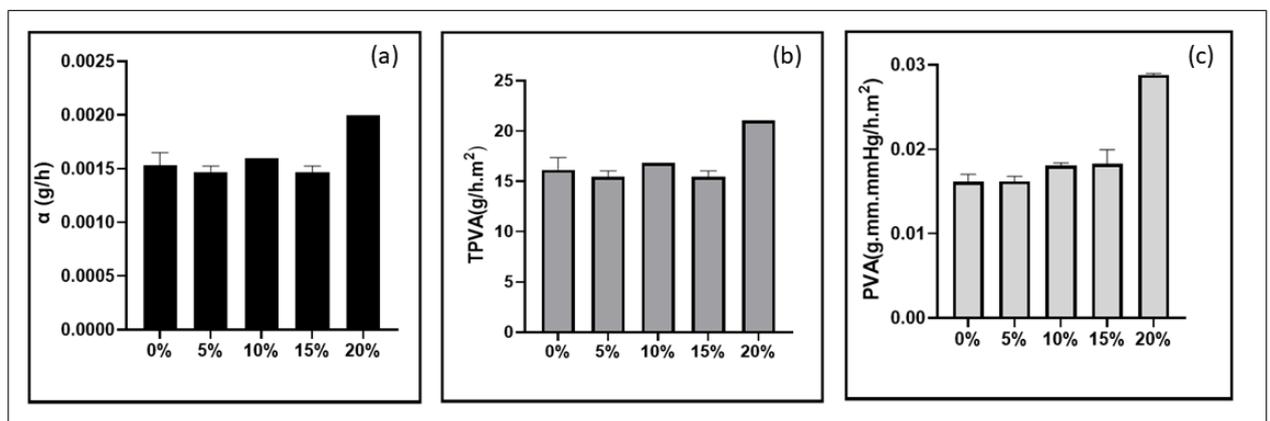


Figura 3.10 Propriedades de barreira à água dos filmes W-HTP sem glicerol (0%) e W-HTPG nas concentrações de 5%, 10%,15% e 20%.

Sanyang (2015) estudando amido de palma para embalagem constataram que os filmes plastificados exibiram valores de permeabilidade ao vapor de água aumentados independente do tipo de plastificante.

Tabela 3.3 Propriedades de barreira à água constituídos de polpa de *Allium cepa* filmes W-HTP sem glicerol (0%) e W-HTPG nas concentrações de 5%, 10%,15% e 20%.

Amostra WHTFG	α (g h ⁻¹)	Adj. R ²	TPVA (g h ⁻¹ m ⁻²)	Espessura (mm)	PVA (gmmh ⁻¹ m ⁻² mmHg ^a)
0%	0,0028	0,9926	13,68	0,072	0,01313
5%	0,0028	0,9855	15,79	0,078	0,01642
10%	0,0028	0,9911	16,84	0,077	0,01728
15%	0,0022	0,9934	17,89	0,088	0,02099
20%	0,0021	0,9578	35,79	0,102	0,04867

^a Para relatar PVA como gmmh⁻¹m⁻² kPa, multiplique o valor em gmmh⁻¹m⁻² mmHg por 7,5.

Também Gonçalves (2019) realizando testes com filmes de acetato de celulose (CA) incorporando 5, 10, 20, 30 e 50% (p/v) de glicerol com o objetivo de avaliar as possíveis alterações causadas pelo plastificante nas propriedades funcionais do embalagem e que os resultados mostraram que, a presença de glicerol nos filmes causou aumento na taxa de transmissão de vapor de água nos filmes com 10 e 30% de glicerol, porém pode haver efeito antiplastificante como foi relatado por Shimazu (2007) que avaliaram o efeito antiplastificante do glicerol nas propriedades de sorção de umidade de filmes de fécula de mandioca, pois dependendo da concentração do plastificante, pode causar efeito contrário, ao invés de aumentar a hidroflicidade do material, prova disso Jost et al. (2014) trabalhando com filmes de alginato incorporando com glicerol relataram que as concentrações de 20 e 50% de glicerol causaram uma redução na permeabilidade ao vapor de água.

Importante considerar o fator permeabilidade para filmes ou membranas para regeneração óssea guiada, pois ela é colocada em contato direto com a superfície óssea circundante, tal que permita a difusão de plasma e nutrientes, porém impeça passagem de células não osteogênicas (ANDRADE et al., 2004)

4.10 Avaliação da solubilidade dos filmes em água

Outra propriedade importante dos filmes biopoliméricos é a sua solubilidade em

água. Em alguns usos, a insolubilidade em água pode aumentar a integridade do produto e sua vida útil (BASIAK, LENART e DEBEAUFORT, 2018). Houve um claro aumento na solubilidade em água para filmes contendo maiores porcentagens de glicerol. Solubilidade em água de filmes W-HTPG de 36.77% a 53.45% quando o teor de glicerol é de 5% a 20% (figura 3.11). Resultados semelhantes foram confirmados por Farahnaky e Saberi (2013), que indicaram que a adição de glicerol aumentou a solubilidade em água de filmes de amido de trigo. O glicerol reduz as forças de atração molecular na matriz do filme, que diminuem sua rigidez, permitindo maior interação com as moléculas de água (SANCHES, 2020).

O glicerol eleva consideravelmente a solubilidade dos filmes poliméricos, como a celulose, obtidos devido ao seu tamanho e à disponibilidade de grupos hidroxila, responsáveis pela formação de ligações de hidrogênio (WANG, 2007), pois aumentando a mobilidade das macromoléculas, facilita a difusão das moléculas de água através do biofilme (SARANTÓPOULOS et al., 2002). Este aumento da solubilidade pode ser constatado devido a afinidade do glicerol com a água verificada no teste de permeabilidade de vapor de água constatada neste trabalho (MATTA et al., 2011).

Müller et al. (2008), constataram em seus estudos com filmes de amido de mandioca na presença dos plastificantes glicerol e sorbitol, que o tipo e a concentração de plastificante influenciam na solubilidade dos filmes. Segundo os autores, quanto maior a concentração do plastificante, maior a solubilidade do filme. Também, Laohakunjite e Noomhorm (2004) avaliaram o efeito plastificante de filmes de amido de arroz incorporados com glicerol e sorbitol e constataram que a solubilidade foi a mais alta com o uso da maior concentração de glicerol, pois os plastificantes são capazes de aumentar a solubilidade do filme devido às suas propriedades hidrófilas.

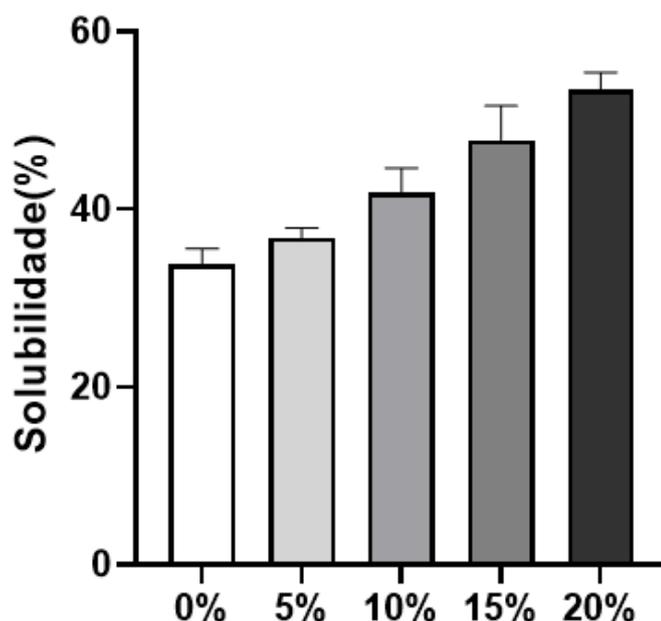


Figura 3.11. Solubilidade dos filmes W-HTP sem glicerol (0%) e W-HTPG nas concentrações de 5%, 10%, 15% e 20%.

Sanches et al. (2021) pesquisando a influência da concentração de farinha da casca de jabuticaba e da concentração de glicerol concluíram que o glicerol causou uma modificação e reduziu as forças de atração molecular na matriz do filme, diminuindo a rigidez e aumentando o volume livre do sistema, o que permitiu uma maior interação com as moléculas de água e aumentou a solubilização.

4.11 Ensaio de erosão

A erosão é o esgotamento físico de um material. Estudos de erosão são importantes para materiais aplicados na indústria alimentícia, bem como para a indústria farmacêutica. Filmes que absorvem e mantêm sua integridade física são úteis para a primeira aplicação, enquanto aqueles que absorvem solventes e depois erodem com o tempo são úteis para a segunda aplicação mencionada anteriormente. Os valores de erosão dos filmes para W-HTP puro e W-HTP plastificado com glicerol 5-20% são apresentados na Figura XC. Maior erosão foi observada para W-HTP contendo 10%, 15% e 20% de glicerol, embora nenhuma diferença significativa tenha sido encontrada entre eles (figura 3.12).

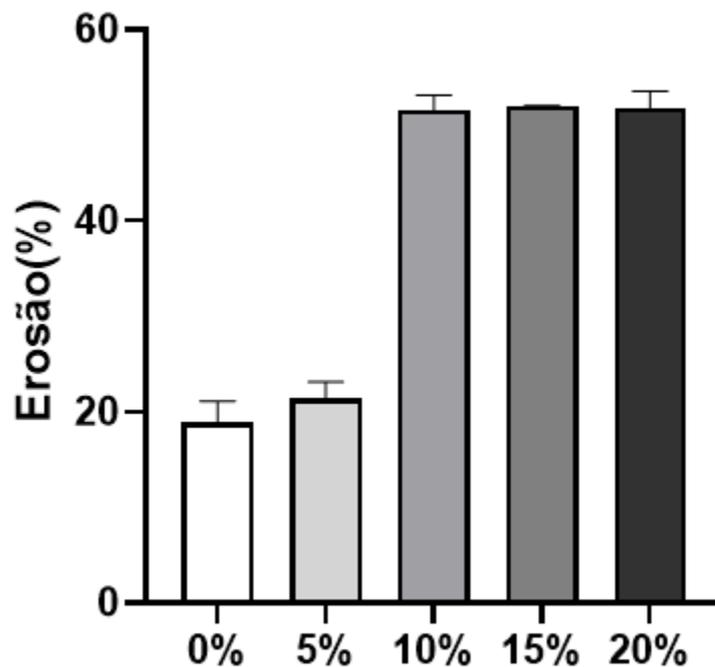


Figura 3.12. Erosão dos filmes W-HTP sem glicerol (0%) e W-HTPG nas concentrações de 5%, 10%, 15% e 20%.

4.12 Ensaio de citotoxicidade

Foram usados fibroblastos dérmicos humanos saudáveis - células HDFa - para avaliar o efeito citotóxico de filmes de cebola usando o método indireto. As células foram incubadas com extratos preparados a partir dos materiais testados: filme de cebola puro (W-HTP), filme de cebola/glicerol 5% (W-HTPG 5%), filme de cebola/glicerol 10% (W-HTPG 10%), filme de cebola/glicerol 15% (W-HTPG 15%) e filme de cebola/glicerol 20% (W-HTPG 20%). O ensaio de citotoxicidade mostrou que o filme de cebola puro e os filmes de cebola contendo glicerol, respectivamente, não apresentaram citotoxicidade (Figura 3.12). Outros estudos mostraram a segurança e biocompatibilidade dos filmes de cebola.

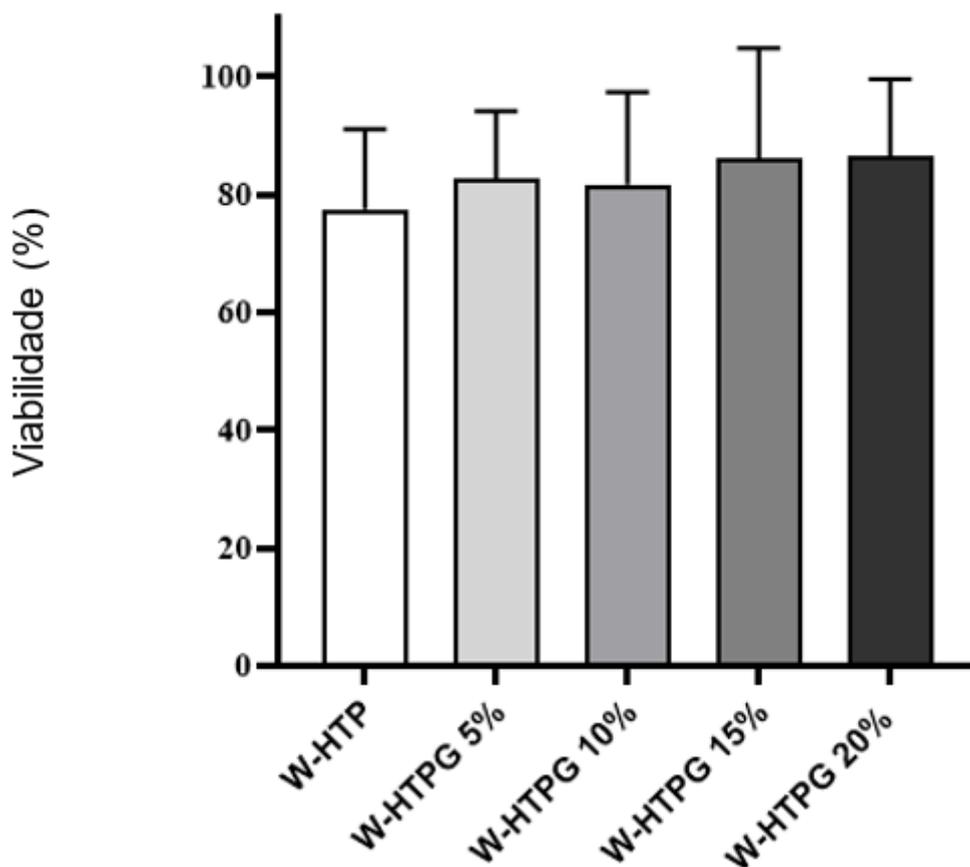


Figura 3.13. Viabilidade celular determinada pelo ensaio MTT em células HDFa tratadas por 24 horas com diferentes extratos de W-HTP e W-HTPG, respectivamente. Resultados obtidos de três experimentos independentes.

Barreto et al. (2020) trabalhando com eluatos de filmes poliméricos de *Allium cepa* L. obtidos pelo processo de casting também demonstraram que a análise da viabilidade celular não foi citotóxica para filmes de polpa lavada tratada hidrotermicamente (W-HTP). Da mesma forma Da Costa Borges et al. (2023) trabalhando com filmes HTP e W-HTP irradiados por radiação e constataram que todos os filmes não apresentaram citotoxicidade.

5. CONCLUSÕES

Os filmes incorporando glicerol mostraram-se mais espessos, com leve aumento na cristalinidade, com aumento na permeabilidade de vapor de água, com características de hidrofílicas além de apresentar alteração morfológica e alteração das propriedades mecânicas. Tais alterações podem ser confirmadas pelos espectros de FTIR que demonstraram possível interação química entre a matriz polimérica e o aditivo. A ação plastificante pode ser observada nos filmes de 15% e 20% de glicerol, pois apresentaram glicerol livre agindo como tal. Portanto, dadas as propriedades mostradas, a maioria dos filmes incorporados com glicerol são particularmente adequados para uso na área médica.

6 REFERÊNCIAS

AL-MASRY, Waheed A. et al. Evaluation of thermal and morphological properties of polymeric films based on glycerol and chitosan irradiated with γ . **Processes**, v. 9, no. 10, p. 1783, 2021.

ALMEIDA, Denise M. et al. Propriedades físicas, químicas e de barreira em filme formados por blenda de celulose bacteriana e fécula de batata. **Polímeros**, v. 23, p. 538-546, 2013.

ANDRADE Acevedo, et al. Bases clínicas e biológicas da ROG associadas a barreiras ou membranas. **Rev. Bras. Implantodont. Prótese implante.**; 11 (43): 251-7. 2004.

BARRETO, Mariana Rodrigues et al. Genotoxicological safety assessment of puree-only edible films from onion bulb (*Allium cepa* L.) for use in food packaging-related applications. **Journal of Food Science**, v. 85, n. 1, p. 201- 208, 2020.

BASIAK, E.; LENART, A.; DEBEAUFORT, F. How glycerol and water contents affect the structural and functional properties of starch-based edible films. **Polymers**, 2018, 10:412. doi:10.3390/polym10040412.

BEATRIZ, Adilson; ARAÚJO, Yara JK; LIMA, Dênis Pires de. Glicerol: um breve histórico e aplicação em sínteses estereosseletivas. **Química Nova**, v. 34, p. 306-319, 2011.

BECKER, W. et al. A prospective multi-center study evaluating periodontal regeneration for Class II furcation invasions and intrabony defects after treatment with a bioabsorbable barrier membrane: 1-year results. **J. Periodontol.**, Indianapolis. v. 67, n. 7, p. 641-649, 1996.

BEN, Zhu Ying; SAMSUDIN, Hayati; YHAYA, Mohd Firdaus. Glicerol: Suas propriedades, síntese de polímeros e aplicações em filmes à base de amido. **European Polymer Journal**, p. 111377, 2022.

BERTUZZI, Maria Alejandra; GOTTIFREDI, Juan Carlos; ARMADA, Margarita. Mechanical properties of a high amylose content corn starch based film, gelatinized at low temperature. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 15, p. 219-227, 2012.

BORGES MF. Desenvolvimento de membranas de acetato de celulose incorporadas com aditivos funcionais para tratamentos regenerativos periodontais. Dissertação (Mestrado em Química). Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2018; 94 p

CAMPOS, K. E.; BALBI, A.; ALVES, M. J. Q. F. Efeitos do extrato aquoso de cebola (*Allium cepa* L.) sobre a função renal e a pressão arterial em ratos Wistar. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, p. 24-29, 2005.

CARRILLO, F. et al. Análise estrutural FTIR e caracterização térmica de fibras do tipo lyocell e viscose. **European Polymer Journal**, v. 40, n. 9, pág. 2229-2234, 2004.

CAZÓN, Patrícia; VELÁZQUEZ, Gonzalo; VÁZQUEZ, Manuel. Filmes de celulose regenerados combinados com glicerol e álcool polivinílico: Efeito do teor de umidade nas propriedades físicas. **Food Hydrocolloids**, v. 103, p. 105657, 2020.

CHOI, Jae Shin; PARK, Won Ho. Effect of biodegradable plasticizers on thermal and mechanical properties of poly (3-hydroxybutyrate). **Polymer testing**, v. 23, n. 4, p. 455-460, 2004.

CREPALDI, Ingrid. Produção e caracterização de filmes plásticos a base de amido de milho e álcool polivinílico, com diferentes plastificantes. 2018.

CUQ, B. et al. Functional properties of myofibrillar protein-based biopackaging as effected by film thickness. **J. of Food Sci.**, Chicago, v. 61, n. 3, p. 580-584, 1996

DA COSTA BORGES, Marco Antonio et al. Self-Supported Biopolymeric Films Based on Onion Bulb (*Allium cepa* L.): Gamma-Radiation Effects in Sterilizing Doses. **Polymers**, v. 15, n. 4, p. 914, 2023.

DE OLIVEIRA, Jamerson Carneiro et al. Grafting Diels-Alder moieties on cellulose nanocrystals through carbamation. **Carbohydrate polymers**, v. 250, p. 116966, 2020.

DOS SANTOS DIAS, Diogenes et al. Large scale manufacturing of puree-only edible films from onion bulb (*Allium cepa* L.): Probing production and structure–processing–property correlations. **Industrial Crops and Products**, v. 145, p. 111847, 2020.

FARACO, Thales A. et al. Ecological Biosubstrates Obtained from Onion Pulp (*Allium cepa* L.) for Flexible Organic Light-Emitting Diodes. **ACS applied materials & interfaces**, v. 11, n. 45, p. 42420-42428, 2019.

FARAHNAKY, Asgar; SABERI, Bahareh; MAJZOBI, Mahsa. Effect of glycerol on physical and mechanical properties of wheat starch edible films. **Journal of Texture Studies**, v. 44, n. 3, p. 176-186, 2013.

GALDEANO, M. C. Filmes e laminados biodegradáveis de amido de aveia com diferentes plastificantes, produzidos por casting e extrusão. Londrina, PR. **Tese de Doutorado**. Universidade Estadual de Londrina - UEL, 2007.

GALDEANO, Melícia Cíntia et al. Effects of plasticizers on the properties of oat starch films. **Materials Science and Engineering: C**, v. 29, n. 2, p. 532-538, 2009.

GAO, Chengcheng; POLLET, Eric; AVÉROUS, Luc. Properties of glycerol-plasticized alginate films obtained by thermo-mechanical mixing. **Food Hydrocolloids**, v. 63, p. 414-420, 2017.

GAO, Wei et al. Development and characterization of starch films prepared by extrusion blowing: The synergistic plasticizing effect of water and glycerol. **LWT**, v. 148, p. 111820, 2021.

GONÇALVES, Sheyla Moreira et al. Structure and functional properties of cellulose acetate films incorporated with glycerol. **Carbohydrate polymers**, v. 209, p. 190-197, 2019.

GONTARD, N.; GUILBERT, S.; CUQ, J. L. Water and glycerol as plasticers affect mechanical and water vapor barrier properties of an edible wheat gluten film. **J. of Food Sci.**, Chicago, v. 53, n. 1, p. 206-211, 1992.

GONTARD, N.; GUILBERT, S.; CUQ, J. L. Water and glycerol as plasticizers affect mechanical and water vapor barrier properties of an edible wheat gluten film. **Journal of Food Science**, Chicago, v.58, n.1, p.206-211, 1993.

GONTARD, Nathalie et al. Edible composite films of wheat gluten and lipids: water vapour permeability and other physical properties. **International journal of food science & technology**, v. 29, n. 1, p. 39-50, 1994.

HENRIQUE, Celina Maria; CEREDA, Marney Pascoli; SARMENTO, Silene Bruder Silveira. Características físicas de filmes biodegradáveis produzidos a partir de amidos modificados de mandioca. **Food Science and Technology**, v. 28, p. 231-240, 2008.

JAIME, Laura et al. Study of total fructan and fructooligosaccharide content in different onion tissues. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 81, n. 2, p. 177-182, 2001.

JOST, Verena et al. Influence of plasticiser on the barrier, mechanical and grease resistance properties of alginate cast films. **Carbohydrate polymers**, v. 110, p. 309-319, 2014

KUMAR, KP Sampath et al. Allium cepa: A traditional medicinal herb and its health benefits. **Journal of Chemical and Pharmaceutical Research**, v. 2, n. 1, p. 283-291, 2010.

LAOHAKUNJIT, N.; NOOMHORM, A. Effect of Plasticizers on Mechanical and Barrier Properties of Rice Starch Film. **Starch/Stärke**, v. 56, p. 348–356, 2004.

LAROTONDA, F. D. S. et al. Hygroscopicity and water vapor permeability of Kraft paper impregnated with starch acetate. **Journal of Food Engineering**, v. 71, n. 4, p. 394-402, 2005.

LIM, Hanpin; HOAG, Stephen W. Plasticizer effects on physical–mechanical properties of solvent cast Soluplus® films. **Aaps Pharmscitech**, v. 14, p. 903-910, 2013.

LIU, Huihua et al. Preparation and characterization of glycerol plasticized (high-amylose) starch–chitosan films. **Journal of Food Engineering**, v. 116, n. 2, p. 588-597, 2013.

MALI, Suzana et al. Barrier, mechanical and optical properties of plasticized yam starch films. **Carbohydrate Polymers**, v. 56, n. 2, p. 129-135, 2004.

MARQUES, Geovana Silva. Obtenção de filmes biodegradáveis de amido de mandioca reforçados com nanofibras de celulose de rami. 2018.

MATTA JR, Manoel D. da et al. Barrier properties of films of pea starch associated with xanthan gum and glycerol. **Polímeros**, v. 21, p. 67-72, 2011.

MCHUGH, T. Habig; AVENA-BUSTILLOS, R.; KROCHTA, J. M. Hydrophilic edible films: modified procedure for water vapor permeability and explanation of thickness effects. **Journal of food science**, v. 58, n. 4, p. 899-903, 1993.

MUKOYAMA, Takeshi. Fitting of Gaussian peaks by simulated annealing. **X-Ray Spectrometry**, v. 46, n. 1, p. 63-68, 2017.

MÜLLER, C.; YAMASHITA, F.; LAURINDO, J.B. Evaluation of effects of glycerol and sorbitol concentration and water activity on the water barrier properties of cassava starch films through a solubility approach. **Carbohydrate Polymers**, v. 72, p. 82-87, 2008.

NGUYEN, Thuong Thi et al. Glycerol-plasticized chitosan film for the preservation of orange. **Journal of Food Safety**, v. 42, n. 1, p. e12943, 2022.

OTHMAN, Siti Hajar et al. Mechanical and thermal properties of PLA/halloysite bio-nanocomposite films: effect of halloysite nanoclay concentration and addition of glycerol. **Journal of Polymer Engineering**, v. 37, n. 4, p. 381-389, 2017.

PASCHOALICK, T. M. et al. Characterization of some functional properties of edible films based on muscle proteins of Nile Tilapia. **Food Hydrocolloids**, v. 17, n. 4, p. 419-427, 2003.

PEIRCE, Lincoln C. et al. Vegetables. Characteristics, production, and marketing. **John Wiley and sons**, 1987.

REDESCHI, Maria Carolina Moro. Preparação e caracterização de filmes a base de xiloglucana extraída de sementes de *Hymenaea Courbaril* (Jatobá). 2006.

SAGAR, Narashans Alok et al. Physicochemical and thermal characteristics of onion skin from fifteen Indian cultivars for possible food applications. **Journal of Food Quality**, v. 2021, 2021.

SANCHES, Marcio Augusto Ribeiro et al. Desenvolvimento, caracterização e otimização de filmes de biopolímeros à base de amido e farinha da casca de jabuticaba (*Myrciaria cauliflora*). **Food Chemistry**, v. 343, p. 128430, 2021.

SARANTÓPOULOS, C. I. G. L. et al. Embalagens plásticas flexíveis: principais polímeros e avaliação de propriedades. Campinas: **CETEA/ITAL**, v. 1, p. 267, 2002.

SCHLEMMER, Daniela; SALES, Maria JA; RESCK, Inês S. Preparação, caracterização e degradação de blendas PS/TPS usando glicerol e óleo de buriti como plastificantes. **Polímeros**, v. 20, p. 6-13, 2010.

SCHLEGE A.K.; et al. Preclinical and clinical studies of a collagen membrane (Bioguide). **Biomaterials**, Oxford, vol. 18, p. 535-38, 1997.

SEGAL, L. et al. Um método empírico para estimar o grau de cristalinidade da celulose nativa usando o difratômetro de raios X. **Textile Research Journal**, v. 29, n. 10, p. 786-794, 1959.

SHIMAZU, Angélica Aimoto; MALI, Suzana; GROSSMANN, Maria Victória Eiras. Efeitos plastificante e antiplastificante do glicerol e do sorbitol em filmes biodegradáveis de amido de mandioca. *Semina: Ciências Agrárias*, v. 28, n. 1, p. 79-88, 2007.

SILVA, Jeoadã Karollyne. Filmes comestíveis à base de celulose bacteriana e glicerol. 2017. **techniques** (pp. 3–34). Berlin, Heidelberg: Springer.

TARIQUE, J; SAPUAN, S. M.; KHALINA, A. Effect of glycerol plasticizer loading on the physical, mechanical, thermal, and barrier properties of arrowroot (*Maranta arundinacea*) starch biopolymers. **Scientific reports**, 2021.

WANG, Jing; JIN, Zhengyu; YUAN, Xiaoping. Preparação de amido resistente a partir de extrudados de goma guar e suas propriedades. **Food Chemistry**, v. 101, n. 1, pág. 20-25, 2007.

WEI, Benxi et al. Synthesis, characterization and hydrophobicity of silylated starch nanocrystal. **Carbohydrate polymers**, v. 136, p. 1203-1208, 2016.

YUAN, Yuehua; LEE, T. Randall. Contact angle and wetting properties. **Surface science techniques**, p. 3-34, 2013.

ZHANG, Pingping; ZHAO, Ya; SHI, Qilong. Characterization of a novel edible film based on gum ghatti: Effect of plasticizer type and concentration. **Carbohydrate polymers**, v. 153, p. 345-355, 2016.