

## Produção de filmes biodegradáveis a base de K-carragena enriquecidos com antioxidantes.

## Production of biodegradable films based on K-carrageenan enriched with antioxidants.

### RESUMO

Atualmente, os filmes biodegradáveis têm se mostrado uma ótima alternativa em relação às fontes não renováveis devido à sua biocompatibilidade e biodegradabilidade. No entanto, o ponto negativo relatado são os altos custos de produção. Nesse sentido produzimos filmes biodegradáveis a base de kappa-carragena com adição de ácido gálico. As características do novo material foram avaliadas por solubilidade em água, grau de intumescimento, perfil de ganho de massa, opacidade, permeabilidade de óleo (po) e avaliado a capacidade antioxidante e determinado a quantidade de compostos fenólicos. Todos os filmes de k-carragena apresentaram boa processabilidade, facilidade de manuseamento e homogeneidade. A espessura dos filmes varia de 95 a 122  $\mu\text{m}$ . O perfil de ganho de massa foi entre 920 a 1700%, com relação à massa do filme seco, com propriedades hidrofílicas, devido a solubilidade, em água, de monômeros presentes, e os baixos valores de permeabilidade ao óleo indicando a dificuldade das moléculas de óleo transpor o filme. Os filmes apresentaram quantidades de compostos fenólicos entre 1,7 e 4,0  $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ , e a capacidade de inibição do radical livre DPPH $\cdot$  Próximo aos 20%. Os filmes apresentados nesse estudo poderiam ter sido utilizados em curativos visto o seu alto grau de intumescimento em água, e abrindo um leque para novos estudos com a adição de outros compostos fenólicos e/ou antioxidantes.

**PALAVRAS-CHAVE:** Acido gálico. Fontes Renováveis. Compostos fenólicos.

### ABSTRACT

Currently, biodegradable films have been shown to be a great alternative to non-renewable sources due to their biocompatibility and biodegradability. However, the reported negative point is the high production costs. In this sense, we produce biodegradable films based on kappa-carrageenan with the addition of gallic acid. The characteristics of the new material were evaluated by water solubility, degree of swelling, mass gain profile, opacity and oil permeability (po). Also, the antioxidant capacity and the amount of phenolic compounds were determined and the amount of phenolic compounds was determined. All k-carrageenan films showed good processability, ease of handling and homogeneity. The thickness of the films varies from 95 to 122  $\mu\text{m}$ . The mass gain profile was between 920 to 1700%, in relation to the dry film mass, with hydrophilic properties, due to the solubility in water of monomers present, and the low oil permeability values indicating the difficulty of the molecules of oil transpose the film. The films showed amounts of phenolic compounds between 1.7 and 4.0  $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ , and the capacity to inhibit DPPH free radical was close to 20%. The films presented in this study could have been used in dressings due to their high degree of swelling in water, and opening a range for further studies with the addition of other phenolic compounds and / or antioxidants.

**KEYWORDS:** Gallic acid. Renewable sources. Phenolic compounds

Guilherme Augusto Moraes de Jesus  
[guilherme.moraesdejesus@gmail.com](mailto:guilherme.moraesdejesus@gmail.com)  
Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Apucarana, Paraná, Brasil.

Prof. Dr. Elton Guntendorfer Bonafé  
[eltongbonafe@gmail.com](mailto:eltongbonafe@gmail.com)  
Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Apucarana, Paraná, Brasil.

Lucas Del Coli Batista Araujo  
[lucasa.1999@alunos.utfpr.edu.br](mailto:lucasa.1999@alunos.utfpr.edu.br)  
Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Apucarana, Paraná, Brasil.

**Recebido:** 19 ago. 2020.

**Aprovado:** 01 out. 2020.

**Direito autoral:** Este trabalho está licenciado sob os termos da Licença Creative Commons-Atribuição 4.0 Internacional.



## INTRODUÇÃO

Carragenas são polissacáridos lineares sulfatados de D-galactose e de 3,6-anidro-D-galactose extraídos de algas vermelhas da classe Rhodophyceae. Comercialmente, os subtipos mais utilizados da carragena são o Iota ( $\iota$ ), Kappa ( $\kappa$ ) e Lambda ( $\lambda$ ). A carragena utilizada nesse estudo é predominante do tipo kappa-carragena [7].

Em meio científico a carragena vem sendo utilizada para produção de hidrogéis físicos, assim como mostram estudos de (Berton et al., 2020), devido à alta estabilidade apresentada pela carragena em hidrogéis, é válido a ideia da utilização deste material em filmes biodegradáveis. Atualmente, os filmes biodegradáveis têm sido uma ótima alternativa em comparação com fontes não renováveis, devido à sua biocompatibilidade e biodegradabilidade [2].

A busca na produção de produtos biodegradáveis vem aumentando, por apresentarem propriedades mecânicas bem próximas aos filmes plásticos sintéticos. Apesar das características positivas dos filmes e revestimentos biodegradáveis, eles representam apenas 5 a 10% do mercado atual, devido aos altos custos de produção [5].

Nas últimas décadas, diversos sistemas de embalagem têm sido desenvolvidos com o objetivo de interagir de forma desejável com o alimento. As embalagens ativas surgem como uma saída para disponibilizar, ao mesmo tempo, um produto mais saudável e com maior vida útil. Baseadas na liberação gradual de substâncias, elas conferem ao alimento a manutenção da qualidade com menos conservantes químicos [1].

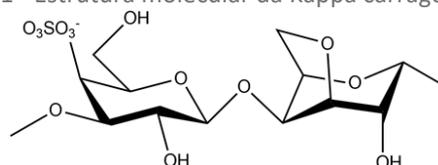
Além da utilização de filmes poliméricos biodegradáveis na indústria de embalagens para conservação de alimentos, também vem sendo utilizado na indústria farmacêutica, como curativos, para tratamento de machucados, feridas e queimaduras, fazendo a liberação controlada de medicamentos [8].

Nesse sentido produzimos filmes biodegradáveis, a base de k-carragena e ácido gálico. As características do novo material foram avaliadas pelo grau de intumescimento, perfil de ganho de massa, permeabilidade ao óleo (PO), opacidade, e a capacidade antioxidante avaliada pelo método de captura do radical livre *DPPH* (2,2-Difenil-1-picrilidrazil) e a determinação do teor de compostos fenólicos totais. A Food Drug Administration dos EUA (FDA) confirma a segurança da carragena como ingrediente alimentar [2].

## MATERIAIS E METODOS

**Preparo dos filmes.** Os filmes biodegradáveis foram produzidos com  $\kappa$ -carragena GENUGEL® (figura1), graciosamente doado pela empresa CP Kelco, Limeira-SP (Brasil); e álcool polivinílico (PVOH) como polímeros e o glicerol foi utilizado como plastificante.

Figura 1 - Estrutura molecular da Kappa carragena.



Fonte: Autoria própria, gerada com o software ChemDraw Pro 12.0.

Foram adicionados em frascos selados 2,0; 2,5 e 3,0 % em massa de k-carragena, com relação ao volume da solução, juntamente com 600 µL de glicerol e 0,6 g de PVOH e acrescentado 70 mL de água destilada, sob agitação magnética a 65 °C durante 30 min, para a dissolução. Em seguida, a solução foi mantida em banho ultrassônico, por 8 min, para a retirada das bolhas formadas.

Após a dissolução de todos os constituintes, 10,0 e 6,25% m/m de ácido gálico (com relação ao peso seco de k-carragena), diluído em uma solução tampão, que simula o fluido gástrico, de SGF/álcool etílico 1:1 foram adicionados a cada biofilme, sob agitação branda e temperatura de 40 °C, obtendo um total de seis amostras.

A solução foi então vertida sobre uma placa de petri (poliacrílica) (16 cm×16 cm×0,3 cm) e seco por 36 h em temperatura de 40 °C. Os filmes foram retirados manualmente da placa de petri e armazenados a uma temperatura de 25 °C, para a caracterização e próximos estudos.

**Espessura.** A espessura dos filmes foi determinado de acordo com Garcia et al. (2018) [4]. Um micrômetro digital eletrônico (0 – 25 mm com resolução de 0,001mm / YST tech / modelo YUANLS-H4024) foi utilizado para medir a espessura dos filmes. Quinze determinações aleatórias foram realizadas em todas as áreas do filme (9,6 cm<sup>2</sup> / 3,5 cm de diâmetro).

**Opacidade.** A opacidade aparente da amostra foi medida de acordo com os métodos de Shojaee-Aliabadi et al. (2014) [10]. Os filmes das amostras foram avaliados usando um espectrofotômetro (Thermo Fisher Scientific, modelo Genesys 10-S) a 550 nm. Uma cubeta de quartzo sem amostra foi usada como referência. A opacidade aparente dos filmes foi determinada pela equação (1).

$$Opacidade = \frac{Abs550}{X} \quad (1)$$

Onde Abs550 é a absorbância (550 nm) e X é a espessura do filme (mm).

**Grau de intumescimento.** O grau de intumescimento (GI%) foi determinado como descrito por Berton et al. (2020) [2]. As amostras secas (aproximadamente 0,20 g) foram imersas em 30 mL de água destilada (24 h, 25 °C, 100 rpm). GI% foi determinado em triplicata usando a equação (2).

$$GI\% = \left[ \frac{(M_i - M_s)}{M_s} \right] \times 100 \quad (2)$$

Onde  $M_i$  e  $M_s$  são a massa de amostras intumescidas e secas, respectivamente.

Estudos de cinética de intumescimento foram conduzidos de acordo com Lavorgna, Piscitelli, Mangiacapra e Buonocore (2010) [6]. As amostras de k-carragena foram cortadas aleatoriamente em pedaços (2 cm x 2 cm), para determinar seu peso seco ( $F_s$ ). As amostras secas (aproximadamente 0,20 g) foram imersas em 30 mL de água destilada (24 h, 25 °C, 100 rpm). A cinética do inchamento foi avaliada medindo o peso em diferentes tempos (3, 6, 10, 15, 20, 30, 60, 90, 120 min). O comportamento cinético dos filmes foi avaliado através do ganho de água e calculado conforme apresentado na equação (3)

$$CF (\%) = \left[ \frac{(F_i - F_s)}{F_s} \right] \times 100 \quad (3)$$

Onde  $F_i$  e  $F_s$  são filmes inchados e secos, respectivamente.

**Solubilidade em água.** Para determinar a solubilidade em água dos filmes, as amostras secas foram cortadas (2 x 2 cm) e imersas em 30 mL de água destilada (24 h, 25 °C e 100 rpm). A solubilidade do filme em água ( $S_a$ ) foi expressa em porcentagem de massa solúvel em massa total, equação (4).

$$\text{Solubilidade em água (\%)} = \left[ \frac{(M_o - M_f)}{M_o} \right] \times 100 \quad (4)$$

Onde  $M_o$  e  $M_f$  correspondem à massa inicial e final, respectivamente.

**Permeabilidade ao óleo.** A permeabilidade ao óleo ( $P_o$ ) foi realizada conforme metodologia proposta por Yan, Hou, Guo & Dong, (2012) [11]. As amostras do filme foram cortadas e colocadas firmemente no topo de um tubo falcon com 5 mL de óleo de soja. O tubo foi virado de cabeça para baixo sobre papel de filtro (previamente pesado) e mantido esticado (48 h, 25 °C). A  $P_o$  foi determinada de acordo com a equação (5).

$$P_o = \frac{(\Delta W \times X)}{(A \times t)} \quad (5)$$

Onde  $\Delta W$  é a diferença de massa do papel de filtro (g) (após e antes da análise),  $X$  é a espessura do filme (mm),  $A$  é a área de exposição ( $m^2$ ) e  $t$  é o tempo de análise (dia).

**Avaliação da capacidade antioxidante.** As leituras espectrais foram registradas em um Espectrofotômetro modelo Agilent Cary 60, feixe simples. Uma única cubeta de quartzo, caminho ótico 10 mm e volume de 3,5 mL foi utilizada para a leitura de absorção na região do Visível. Para esses ensaios os filmes foram cortados (2,0 cm x 2,0 cm) e colocados em 30 mL de água destilada (24 h, 25 °C, 100 rpm), e posteriormente a retirada de alíquotas para a avaliação da capacidade antioxidante, quanto a sua liberação em meio aquoso.

O ensaio de  $DPPH^{\cdot}$  foi realizado de acordo com Brand-Williams et al., (1995) [3]. Para determinação dos compostos fenólicos totais, a metodologia seguida foi descrita por Singleton e Rossi (1965)[9].

## RESULTADOS E DISCUSSÕES

Em geral, todos os filmes de k-carragena boa processabilidade, facilidade de manuseamento e homogeneidade. A k-carragena comercial gentilmente doada pela CpKelco-Brasil, em estudos anteriores, segundo (Berton et al., 2020), determinou a concentração real de sódio, potássio, magnésio e cálcio neste k-carragena. Esses íons podem funcionar como agentes reticulantes, estabilizando o sulfato e outros grupos polares, facilitando a aproximação das cadeias poliméricas, promovendo melhor estabilidade [2]. A espessura dos filmes varia de 95 a 122  $\mu m$ , conforme mostra a tabela 1.

Tabela 1– Espessura e opacidade dos filmes produzidos a base de k-carragena (K) com concentrações variando de 3; 2,5 e 2% e adicionado ácido gálico (AG) nas concentrações de 10 e 6,25%.

Amostras de filmes	Espessura ( $\mu m$ )	Opacidade
K3/AG10	101 $\pm$ 12 <sup>b</sup>	2.130 $\pm$ 0.034 <sup>a</sup>
K3/AG6.25	122 $\pm$ 7 <sup>a</sup>	1.678 $\pm$ 0.095 <sup>d</sup>
K2.5/AG10	105 $\pm$ 5 <sup>a,b</sup>	1.923 $\pm$ 0.030 <sup>c</sup>

<i>K2.5/AG6.25</i>	$96 \pm 3^b$	$1.672 \pm 0.073^d$
<i>K2/AG10</i>	$95 \pm 4^b$	$1.830 \pm 0.025^{c,d}$
<i>K2/AG6.25</i>	$106 \pm 2^{a,b}$	$1.380 \pm 0.085^b$

Fonte: autoria própria. Os resultados são expostos como médias  $\pm$  desvio padrão. a, b, c, d Letras diferentes na mesma coluna indicam diferenças significativas ( $p \leq 0,05$ ) de acordo com o teste de Tukey.

A opacidade (oposta à transparência) dos filmes varia de 1,380 a 2,130 (Tabela 1). Os filmes com 10% de ácido gálico apresentam resultados de opacidade mais altos em comparação com os filmes com 6,25% de ácido gálico na mesma proporção de k-carragena ( $p < 0,05$ ), isso mostrou que maiores concentrações de ácido gálico promovem maior opacidade nos filmes.

O grau de intumescimento (tabela 2) foi realizado em pH neutro. Os resultados variaram aproximadamente de 920 a 1700%.

Tabela 2 Grau de intumescimento em água dos filmes produzidos a base de k-carragena (K) com concentrações variando de 3; 2,5 e 2% e adicionado ácido gálico (AG) nas concentrações de 10 e 6,25%.

Amostras de filmes	Grau de intumescimento (%)
<i>K3/AG10</i>	$1666,252 \pm 1,047^a$
<i>K3/AG6.25</i>	$1452,567 \pm 0,800^d$
<i>K2.5/AG10</i>	$989,1219 \pm 0,308^c$
<i>K2.5/AG6.25</i>	$926,8102 \pm 0,422^{c,d}$
<i>K2/AG10</i>	$966,4962 \pm 0,233^b$
<i>K2/AG6.25</i>	$935,0375 \pm 0,255^{b,c}$

Fonte: Autoria própria. Os resultados são expostos como médias  $\pm$  desvio padrão. a, b, c, d Letras diferentes na mesma coluna indicam diferenças significativas ( $p \leq 0,05$ ) de acordo com o teste de Tukey.

Os filmes com 10% de ácido gálico apresentam maior grau de intumescimento em comparação aos filmes com 6,25% de ácido gálico na mesma proporção de k-carragena.

A solubilidade em água ( $S_a$ ) é um parâmetro crucial para avaliar a integridade dos filmes em sistemas aquosos. A variação dos filmes deste estudo variou de 49 a 75% (Tabela 3).

Tabela 3– Permeabilidade ao óleo e solubilidade em água dos filmes produzidos a base de k-carragena (K) com concentrações variando de 3; 2,5 e 2% e adicionado ácido gálico (AG) nas concentrações de 10 e 6,25%.

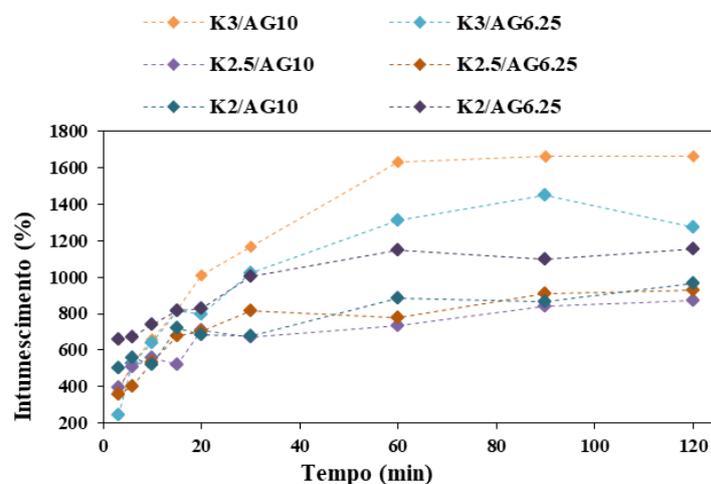
Amostras de filmes	Permeabilidade ao óleo ( $g\ mm\ m^{-2}\ d^{-1}$ )	Solubilidade em água (%)
<i>K3/AG10</i>	$0,0032 \pm 0,0246^a$	$49.976 \pm 0.912^a$
<i>K3/AG6.25</i>	$0,0047 \pm 0,1867^a$	$62.392 \pm 0.387^c$
<i>K2.5/AG10</i>	$0,0027 \pm 0,0989^a$	$75.392 \pm 1.255^b$
<i>K2.5/AG6.25</i>	$0,0037 \pm 0,1962^a$	$66.776 \pm 0.891^{b,c}$
<i>K2/AG10</i>	$0,0023 \pm 0,0441^a$	$60.557 \pm 2.077^c$
<i>K2/AG6.25</i>	$0,0021 \pm 0,0817^a$	$73.094 \pm 4.875^b$

Fonte: Autoria própria. Os resultados são expostos como médias  $\pm$  desvio padrão. a, b, c, d Letras diferentes na mesma coluna indicam diferenças significativas ( $p \leq 0,05$ ) de acordo com o teste de Tukey.

Os filmes K2/AG6.25, K2.5/AG10 e K2.5/AG6.25 apresentam Sa mais alto que para K2/AG10, K3/AG10 e K3/AG6.25. A kappa carragena é um biopolímero aniônico a pH da água destilada, ou seja, contém uma carga negativa real (figura 1). A repulsão de carga geralmente diminui quando o ácido gálico é adicionado à mistura.

Os valores de permeabilidade ao óleo ( $P_o$ ) variaram de 0,0021 a 0,0047  $\text{g}\cdot\text{mm}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{d}^{-1}$  por k-carragena: ácido gálico: glicerol: PVOH com glicerol e PVOH (todas as formulações foram idênticas  $p \geq 0,05$  - teste de Tukey). Valores baixos de  $P_o$  indicam que as moléculas de óleo têm dificuldade em transpor o filme. Estes resultados estão de acordo com os encontrados na solubilidade em água, onde os filmes apresentam solubilidade significativa. O perfil do ganho de água versus o tempo (min) foi avaliado a 25 °C, com agitação constante para os filmes de  $\kappa$ -carragena / ácido gálico, como mostrado na figura 2. Os resultados mostraram que os filmes mantiveram-se estáveis em meio aquoso entre os 60 e 90 minutos.

Figura 2 - Gráfico de cinética de intumescimento dos filmes frente as concentrações de 3; 2,5 e 2% de k-carragena(K) e adicionado ácido gálico (AG) nas concentrações de 10 e 6,25%.



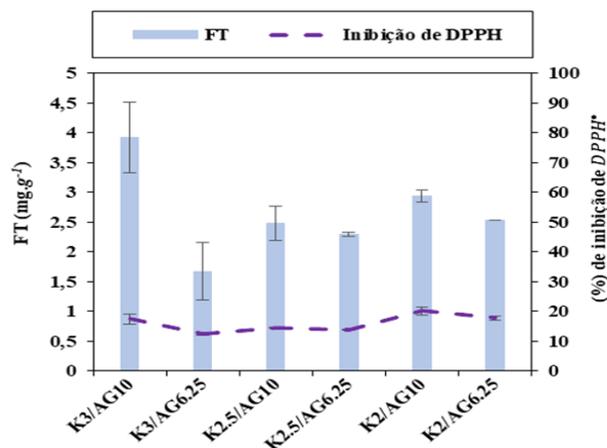
Fonte: autoria própria.

A absorção máxima de água foi do filme com maior quantidade de k-carragena (3% m/v) e maior quantidade de ácido gálico (10% em relação a massa de carragena), alcançando aproximadamente 3,8 g de água, em porcentagem atingiu cerca de 1700% da massa do filme seco, pois forma uma rede estável devido às interações hidrofílicas e hidrofóbicas. Todos os filmes permaneceram estáveis, mesmo após o pico máximo de ganho de água em tempos menores que 120 min. Após o tempo de equilíbrio, observou-se uma pequena perda de massa, que ocorreu devido à solubilização de monômeros.

O filme com as maiores proporções de k-carragena e ácido gálico (K3/AG10) apresentou maior quantidade, cerca de  $4,0 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ , de compostos fenólicos frente ao método, conforme mostra a figura 3. No entanto o filme com maior

quantidade de k-carragena, mas agora com menor proporção de ácido gálico, (K3/AG6.25) apresentou menor quantidade de compostos fenólicos, próximo a  $1,7 \text{ mg.g}^{-1}$ . Já os filmes com 2,5 e 2% de k-carragena (m/v), variaram suas quantidades de compostos fenólicos entre aproximadamente 2,3 e  $2,9 \text{ mg.g}^{-1}$  (figura 3).

Figura 3 Atividade Antioxidante dos filmes nas diferentes formulações frente captura do radical livre DPPH e a determinação de compostos fenólicos totais (FT).



Fonte: Autoria Própria.

O filme que apresentou maior inibição de  $DPPH^{\cdot}$  foi o filme com menor porcentagem de k-carragena e maior proporção de ácido gálico (K2/AG10), com pouco mais de 20% de inibição. No entanto o filme com maior quantidade de k-carragena e menor proporção de ácido gálico (K3AG6.25) apresentou menor inibição do radical livre, cerca de 12% de inibição de  $DPPH^{\cdot}$ .

## CONCLUSÕES

Considerando os resultados obtidos pode-se concluir que foi possível verificar que os filmes em suas diferentes formulações apresentaram capacidade antioxidante quando em contato com o radical livre DPPH, atingindo pouco mais de 20% de inibição, o teor de compostos fenólicos variou de  $1,7$  a  $4,0 \text{ mg.g}^{-1}$ . Os filmes apresentaram baixa permeabilidade ao óleo e solubilidade em água variando cerca de 50 a 75%, mostrando que os filmes possui características hidrofílicas e analogamente lipofóbicas. Os ensaios de intumescimento mostraram que os filmes possuem grande capacidade de absorção de água, o que pode favorecer na aplicação dos filmes como cicatrizantes, e abre um leque para novos estudos da capacidade antimicrobiana e bactericida. Desta forma, estudos futuros poderão ser realizados com a adição de outros compostos fenólicos e/ou antioxidantes, visto que os filmes apresentaram espessura entre 95 e  $122 \mu\text{m}$ , com boa processabilidade, facilidade de manuseamento e homogeneidade.

## AGRADECIMENTOS

Ao CNPq pelo apoio financeiro, à Universidade Tecnológica Federal do Paraná, à Universidade Estadual de Maringá, aos professores e amigos envolvidos.

## REFERÊNCIAS

- [1] AZEREDO, H. M. C.; FARIA, J. A. F.; AZEREDO, A. M. C. Embalagens ativas para alimentos. **Ciência e Tecnologia de alimentos**, Campinas, v. 20, n. 3, p. 337-341, 2000.
- [2] BERTON, S. B. R., DE JESUS, G. A. M., SABINO, R. M., MONTEIRO, J. P., VENTER, S. A. S., BRUSCHI, M. L. BONAFÉ, E. G. (2020). Properties of a commercial  $\kappa$ -carrageenan food ingredient and its durable superabsorbent hydrogels. **Carbohydrate Research**, 487, 107883.  
<https://doi.org/10.1016/J.CARRES.2019.107883>
- [3] BRAND-WILLIAMS, W., CUVELIER, M. E., BERSET, C. Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity. **LWT – Food Science and Technology**, 28, 25-30, 1995.
- [4] GARCIA, P. S.; TURBIANI, FRANCIELE REZENDE BARBOSA ; BARON, ALESSANDRA MACHADO ; BRIZOLA, GUILHERME LUIZ ; TAVARES, MARIANE ALVES ; YAMASHITA, FABIO ; EIRAS, DANIEL ; GROSSMANN, M. V. E. . Sericin as compatibilizer in starch/ polyester blown films. **Polímeros: ciência e Tecnologia**, v. 1, p. 1-6, 2018.
- [5] JIANG, T., DUAN, Q., ZHU, J., LIU, H., & YU, L. (2020). Starch-based biodegradable materials: Challenges and opportunities. **Advanced Industrial and Engineering Polymer Research**, 3(1), 8–18.  
<https://doi.org/10.1016/J.AIEPR.2019.11.003>
- [6] LAVORGNA, M., PISCITELLI, F., MANGIACAPRA, P., & BUONOCORE, G. G. (2010). Study of the combined effect of both clay and glycerol plasticizer on the properties of chitosan films. **Carbohydrate Polymers**, 82(2), 291–298.
- [7]- RUDOLPH, B. Seaweed Product: Red Algae of Economic Significance. In R. E. Martin, E. P. Carter, L. M. Davis, & G. J. Flich (Eds.), **Marine and Freshwater Products Handbook**. Lancaster, USA: Technomic Publishing Company Inc. 2000; 515–529.
- [8] SHOJAEI-ALIABADI, S., HOSSEINI, H., MOHAMMADIFAR, M. A., MOHAMMADI, A., GHASEMLOU, M., HOSSEINI, S. M., & KHAKSAR, R. (2014). Characterization of  $\kappa$ -carrageenan films incorporated plant essential oils with improved antimicrobial activity. **Carbohydrate Polymers**, 101, 582–591.  
<https://doi.org/10.1016/J.CARBPOL.2013.09.070>

[9] SINGLETON, V. L.; ROSSI, J. A. Jr. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic–phosphotungstic acid reagents. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 16, p. 144 - 158, 1965.

[10] SOUZA, L.K., BRUNO, C.H., LOPES, L., PULCINELLI, S.H., SANTILLI, C.V., CHIAVACCI, L.A., “Ureasil–polyether hybrid film-forming materials”, **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 101, pp. 156-161, Jan. 2013.

[11] YAN, Q., HOU, H., GUO, P., & DONG, H. (2012). Effects of extrusion and glycerol content on properties of oxidized and acetylated corn starch-based films. **Carbohydrate Polymers**, 87(1), 707–712.  
<https://doi.org/10.1016/J.CARBPOL.2011.08.048>