

RAFAEL RESENDE ASSIS SILVA

**EFEITO DA FORÇA IÔNICA E RAIOS IÔNICOS DE SAIS DIVALENTES NAS
PROPRIEDADES DE EMBALAGENS BIODEGRADÁVEIS E SENSORES
COLORIMÉTRICOS CONTENDO ANTOCIANINAS DO EXTRATO FENÓLICO DE
AÇAÍ (*Euterpe oleracea* Mart.)**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

Orientador: Nilda de Fátima Ferreira Soares

**VIÇOSA - MINAS GERAIS
2020**

**Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Campus Viçosa**

T

S586e
2020

Silva, Rafael Resende Assis, 1993-

Efeito da força iônica e raio iônico de sais divalentes nas propriedades de embalagens biodegradáveis e sensores colorimétricos contendo antocianinas do extrato fenólico de açaí (*Euterpe oleraceae* Mart.) / Rafael Resende Assis Silva. – Viçosa, MG, 2020.

128 f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Inclui anexo.

Orientador: Nilda de Fátima Ferreira Soares.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. Alimentos - Embalagens. 2. Metilcelulose.
3. Antocianinas. 4. Açaí. I. Universidade Federal de Viçosa.
Departamento de Tecnologia de Alimentos. Programa de
Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos.
II. Título.

CDD 22. ed. 664.09

RAFAEL RESENDE ASSIS SILVA

**EFEITO DA FORÇA IÔNICA E RAIOS IÔNICOS DE SAIS CLORADOS NAS
PROPRIEDADES DE EMBALAGENS BIODEGRADÁVEIS E SENSORES
COLORIMÉTRICOS CONTENDO ANTOCIANINAS DO EXTRATO FENÓLICO DE
AÇAÍ (*Euterpe oleracea* Mart.)**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 15 de dezembro de 2020.

Assentimento:


Rafael Resende Assis Silva
Autor


Nilda de Fátima Ferreira Soares
Orientadora

À minha tia Sandra Rezende,
À minha avó Maria Resende,
À minha irmã Janaína Resende
À minha mãe Teresinha Resende,

Por sempre me incentivarem a correr atrás dos meus objetivos...

Dedico este trabalho!

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que contribuíram de alguma forma para o meu desenvolvimento ao longo desses dois anos e para a construção deste trabalho, que não é nem de longe um trabalho feito a duas mãos.

À Universidade Federal de Viçosa e seus funcionários, pela oportunidade e por todo o suporte durante o mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Ao CNPq pelo apoio financeiro e pela bolsa concessão de bolsa de estudos.

A agências financiadoras CAPES, CNPq, FAPEMIG e FINEP pelo apoio financeiro e investimento na infraestrutura do Labem.

À minha Tia Sandra Rezende, pelo amor, incentivo, carinho, sustentação e por ser exemplo profissional e ser humano. Obrigado por sempre cuidar de mim, te amo!

À minha avó Maria Resende (*in memorian*) e minha mãe Teresinha Resende (*in memorian*).

À minha irmã Janaína Resende, meu padrinho Marcos Carvalho, minhas sobrinhas Priscila Resende e Ana Laura Resende pelo carinho, amor e que nos meus momentos da minha ausência, sempre me apoiaram entendiam.

À toda minha família, em especial a Eliana, Dulcimeia, Sônia, Vera e Eli por serem marcantes na minha vida.

À minha orientadora Nilda de Fátima Ferreira Soares, pela orientação, apoio, confiança e oportunidade de fazer parte da equipe do Labem.

Ao professor Paulo César Stringheta, pela coorientação, apoio, confiança, ensinamentos e disponibilidade, muito obrigado mesmo.

À professora Ana Clarissa dos Santos Pires, pela coorientação, apoio, confiança e ensinamentos, muito obrigado.

Aos amigos do Labem, Adassa, Alane, Cícero, Clara, Clesia, Eber, Fabiana, Fernando, João, José, Heitor, Laís, Laura, Mariane, Mariah, Michele, Miriane, Nelson, Pedro, Rafaela, Raquel, Rosilene, Samiris, Taíla, Tarsila, Vânia e Wilher pela amizade, ótimos momentos e por transmitirem um pouco dos seus conhecimentos para o meu crescimento e sempre contribuíram para o excelente ambiente da melhor equipe do Brasil, muito obrigado!

Aos grandes amigos Ana Huback, Arthur Brandão, Caio Melo, Cícero Pola, Erica Cardoso, Gabriel Araújo, Guilherme Henrique, Guilherme Martins, Gustavo

Coala, Igor Limão, Julio Guimarães, Luis Henrique, Luíza Mendes, Marcus Carvalho, Patrícia Mendonça, Pedro Dutra, Pedro Freitas, Raniere Teixeira, Thaís Rigolon, Thales Resende, Thiago Rigotto, e Walterson Luzzi que estiveram ao meu lado ao longo desta grande caminhada, que irão continuar presentes em minha vida e estarei aqui para o que precisarem.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

Muito obrigado a todos vocês!

BIOGRAFIA

RAFAEL RESENDE ASSIS SILVA, filho de Teresinha Resende de Assis, nasceu em Divinópolis, Minas Gerais, em 20 de março de 1993.

Em setembro de 2013, iniciou o curso de Engenharia de Alimentos, pela Universidade Federal de São João Del Rei, graduando-se em julho de 2018.

Em agosto de 2018, ingressou no Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos na Universidade Federal de Viçosa, concluindo-o em dezembro de 2020.

“Mestre não é quem sempre ensina, mas quem de repente aprende”.

Guimarães Rosa (1908-1967)

RESUMO

SILVA, Rafael Resende Assis, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, dezembro de 2020. **Efeito da força iônica e raio iônico de sais divalentes nas propriedades de embalagens biodegradáveis e sensores colorimétricos contendo antocianinas do extrato fenólico de açaí (*Euterpe oleraceae* Mart.).** Orientador: Nilda de Fátima Ferreira Soares.

Nos últimos anos a crescente geração de resíduos plásticos derivados de petróleo ampliou a necessidade de desenvolvimento de pesquisas relacionadas aos polímeros biodegradáveis. Outra problemática ambiental inerente aos resíduos plásticos é a liberação de plastificante da matriz polimérica que são empregados para melhorar a sua flexibilidade e processabilidade. Esses aditivos são em sua maioria da classe de ftalatos e são considerados agentes de efeitos tóxicos e adversos em humanos. Desde então, os pesquisadores têm direcionado esforços no desenvolvimento de materiais plásticos com fontes de matérias primas naturais, renováveis e biodegradáveis. Aliado a isso, a funcionalização desses materiais por meio do desenvolvimento de embalagens ativas, inteligentes ou sensores são estratégias importantes para conquistar maior público de consumidores. Entretanto, alguns bioplásticos apresentam propriedades que limitam aplicações em alimentos e, por isso, diversos estudos têm sido realizados para melhorar essas características por meio da adição de reforços, mistura de polímeros e reticulação das cadeias poliméricas. Nesse contexto, o objetivo desse trabalho foi avaliar o efeito da força iônica do sistema e o raio iônico de sais clorados nas propriedades de embalagens biodegradáveis e sensores colorimétricos contendo antocianinas do extrato fenólico de açaí (*Euterpe oleraceae* Mart.). No primeiro capítulo, mostramos que a incorporação dos sais de CaCl_2 ou MgCl_2 com força iônica de 50 mM em filmes de metilcelulose promove a reticulação das cadeias poliméricas por meio de interações eletrostáticas e ligações coordenadas, enquanto valores acima de 250 mM contribuem para o efeito plastificante. Confirmamos que esse efeito plastificante é decorrente da absorção e retenção de água na matriz polimérica, o que é dependente da força iônica do sistema e do raio iônico dos sais incorporados. Aliado a isso, a incorporação dos sais em sensores contendo antocianinas gerou cores distintas e foi relacionado à formação de copigmentos ou metaloantocianinas. Descobrimos que o efeito aditivo da força iônica ou de cátions com o menor raio iônico (Magnésio) nos sensores aumentou

a sensibilidade de detecção a amônia (NH_3). No segundo capítulo, foram desenvolvidos e caracterizados sensores colorimétricos contendo extrato fenólico de açaí para monitorar o frescor de peixes. Mostramos que a força iônica do sistema pode ser empregada para modular a sensibilidade de detecção de NH_3 e de nitrogênio de bases voláteis totais. Sensores com alteração de cor reversível podem ser desenvolvidos ao empregar valores de força iônica de até 50 mM, enquanto que a irreversibilidade pode ser obtida ao utilizar a força iônica igual ou superior a 250 mM. O tempo de equilíbrio foi o principal fator para desestabilização das cores após a detecção de NH_3 seguido pela força iônica e pela presença da radiação visível. Foram desenvolvidos dois tipos de sensores capazes de classificar o frescor de peixes Lambari de acordo com normas brasileira e europeia. Utilizamos ferramentas estatísticas multivariadas para validar a aplicação dos sensores no monitoramento do frescor de peixes. De forma geral, apresentamos a importância em compreender e controlar os fatores extrínsecos à matriz polimérica para assegurar o desenvolvimento de materiais com propriedades homogêneas e de interesse. Aliado a isso, todos os materiais desenvolvidos neste trabalho possuem natureza renovável, sustentável e biodegradável, o que sugere excelente potencial para aplicação em alimentos e contribui para a redução do impacto ambiental no planeta.

Palavras-chave: Embalagens biodegradáveis. Força iônica. Raio iônico. Sensores colorimétricos. Antocianinas. Metilcelulose. Caracterização de materiais. Açaí.

ABSTRACT

SILVA, Rafael Resende Assis, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, December, 2020. **Effect of ionic strength and ionic radius of divalent salts on the properties of biodegradable packaging containing anthocyanins from phenolic extract of açai (*Euterpe oleraceae* Mart.).** Adviser: Nilda de Fátima Ferreira Soares.

In recent years, the growing generation of petroleum-derived plastic waste has increased the need for research related to biodegradable polymers. Another environmental problem inherent to plastic waste is release of plasticizers from polymer matrix that are used to improve its flexibility and processability. These additives are mostly from the phthalate class and are considered to be toxic and adverse agents in humans. Since then, researchers have directed efforts towards the development of plastic materials with sources of natural, renewable and biodegradable raw materials. Allied to this, the functionalization of these materials through development of active, intelligent or sensor packaging are important strategies to conquer a larger consumer audience. However, some bioplastics have properties that limit applications in food and, therefore, several studies have been carried out to improve these characteristics through the addition of reinforcements, mixture of polymers and crosslinking of polymer chains. In this context, objective of this work was to evaluate effect of ionic strength of system and ionic radius of chlorinated salts on properties of biodegradable packaging and colorimetric sensors containing anthocyanins from phenolic extract of açai (*Euterpe oleraceae* Mart.). In the first chapter, we show that incorporation of CaCl_2 or MgCl_2 salts with 50 mM ionic strength in methylcellulose films promotes crosslinking of polymer chains through electrostatic interactions and coordinated bonds, while values above 250 mM contribute to plasticizer effect. We confirm that this plasticizer effect is due to absorption and retention of water in polymeric matrix, which is dependent on ionic strength of system and ionic radius of incorporated salts. Allied to this, incorporation of salts in sensors containing anthocyanins generated different colors and was related to formation of copigments or metalloanthocyanins. We found that additive effect of ionic strength or cations with smallest ionic radius (Magnesium) on sensors increased detection sensitivity to ammonia (NH_3). In the second chapter, colorimetric sensors containing phenolic extract of açai were developed and characterized to monitor freshness of fish. We show that ionic strength of system can be used to modulate the detection sensitivity of NH_3 and nitrogen of total volatile bases.

Sensors with reversible color change can be developed by employing ionic strength values of up to 50 mM, while irreversibility can be achieved by using ionic strength equal to or greater than 250 mM. The equilibrium time was main factor for color destabilization after NH_3 detection followed by ionic strength and presence of visible radiation. Two types of sensors have been developed capable of classifying freshness of Lambari fish according to Brazilian and European standards. We use multivariate statistical tools to validate application of sensors in monitoring freshness of fish. In general, we present importance of understanding and controlling factors extrinsic to polymeric matrix to ensure development of materials with homogeneous and interesting properties. Allied to this, all the materials developed in this work have a renewable, sustainable and biodegradable nature, which suggests excellent potential for application in food and contributes to reduction of the environmental impact on planet.

Keywords: Biodegradable packaging. Ionic strength. Ionic radius. Colorimetric sensors. Anthocyanins. Methylcellulose. Açaí.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

CAPITULO I

Figura 1. Espectros de FTIR dos filmes de MC com FI de 0, 25, 50, 250 e 500 mM corrigida com CaCl_2 (a) ou MgCl_2 (b).	41
Figura 2. Curvas de regressão do ângulo de contato (θ) entre água e a superfície dos filmes de MC com FI de 0, 25, 50, 250 e 500 mM corrigida com CaCl_2 (vermelho) ou MgCl_2 (preto) (a) e (b) ilustração das estruturas de MC, água e Cálcio com indicação das ligações coordenadas (laranja), interações eletrostáticas (verde) e hidroxilas ionizadas (vermelho).	43
Figura 3. Curvas de DSC dos filmes de MC com FI de 0, 25, 50, 250 e 500 mM corrigida com CaCl_2 (a) ou MgCl_2 (b).	47
Figura 4. Imagens da MEV dos filmes com magnificação de 600x: a: Controle, b: 25 mM CaCl_2 , c: 500 mM CaCl_2 , d: 25 mM MgCl_2 , e: 500 mM MgCl_2 . 3D micrografias de perfilometria dos filmes: a': Control, b': 25 mM CaCl_2 , c': 500 mM CaCl_2 , d': 25 mM MgCl_2 , e': 500 mM MgCl_2 . f: Gráfico de barras da rugosidade média (R_a) dos filmes.	49
Figura 5. Transmitância dos filmes de MC com 0, 25, 50, 250 e 500 mM corrigida com CaCl_2 (a) ou MgCl_2 (b).	51
Figura 6. Curvas de regressão para a espessura (a), resistência a tração (b), módulo de Young (c) e elongação percentual até a ruptura (d) dos filmes de MC com FI de 0, 25, 50, 250 e 500 mM corrigida com CaCl_2 (vermelho) ou MgCl_2 (preto). Curvas de tensão por elongação percentual dos filmes de MC com CaCl_2 (e) ou MgCl_2 (f).	52
Figura 7. Ilustração dos fatores que influenciam nos mecanismos de adsorção, difusão e dessorção de oxigênio nos filmes de MC com FI de 0, 25, 50, 250 ou 500 mM.	55
Figura 8. Curvas de regressão para a permeabilidade ao oxigênio (a) e a vapor d'água (b) dos filmes de MC com FI de 0, 25, 50, 250 e 500 mM corrigida com CaCl_2 (vermelho) ou MgCl_2 (preto).	56
Figura 9. Fotografia do APE em solução aquosa no pH 2 ao 13 (a) e os espectros de absorção no UV-Vis (b).	58

Figura 10. Fotografias dos sensores contendo 0, 25, 50, 250 ou 500 mM corrigida com CaCl_2 ou MgCl_2 no tempo inicial e após a exposição de NH_3 ao longo de 30 minutos.....	59
Figura 11. Variação das propriedades de cor a^* , C^* e ΔE^* dos sensores contendo CaCl_2 (a, c, e respectivamente) ou MgCl_2 (b, d, f respectivamente) durante 30 minutos de contato com NH_3	62
Figura 12. Gráfico de superfície de resposta e parâmetros estatísticos do comportamento de variação do ângulo h^* dos sensores contendo CaCl_2 quando expostos a NH_3 durante 30 minutos.	63

CAPÍTULO II

Figura 13. Estrutura química da cianidina-3-glicosídeo com realce do grupo aglicona (cianidina) e glicona (β -glicopirranose).....	77
Figura 14. Fotografia do APE em solução aquosa no pH 2 ao 13 (a) e os respectivos espectros no UV-Vis (b). Espectros UV-Vis dos filmes antes e após o contato com NH_3 durante 30 minutos (c). Espectros UV-Vis da solução de APE no pH 2 (d) e 8 (e) com 0 e 500 mM corrigida com CaCl_2 ao longo de cinco dias.	87
Figura 15. Espectros de ATR-FTIR do APE (vermelho), dos filmes controle com 0 e 500 mM de CaCl_2 na presença (linha contínua) ou ausência de APE (linha tracejada) (a). Espectros de ATR-FTIR dos sensores com FI de 0, 25, 50, 250 e 500 mM corrigida com CaCl_2 (b).....	89
Figura 16. Imagens MEV dos filmes sem APE na magnificação de 100x para: (a) Controle; (b) 25 mM; (c) 50 mM; (d) 250 mM; (e) 500 mM e na magnificação de 1000x para: (f) Controle; (g) 25 mM; (h) 50 mM; (i) 250 mM; (j) 500 mM e sensores na magnificação de 1000x para: (k) Controle; (l) 25 mM; (m) 50 mM; (n) 250 mM e (o) 500 mM. A seta preta indica os aglomerados de MC, a seta vermelha indica a segregação de fase de alguns compostos presentes no APE.	91
Figura 17. Curvas termogravimétricas dos filmes sem APE (linhas contínuas), dos sensores (linhas tracejadas) e do APE (a). Gráfico de porcentagem da variação de massa entre 25 a 100 °C para os filmes com e sem APE (b).....	93
Figura 18. Fotografias dos sensores no tempo inicial e ao longo do tempo de contato com NH_3 por até 300 minutos.	94

Figura 19. Variação das propriedades de cor a^* (a); C^* (b); h^* (c) e ΔE^* (d) dos sensores durante 30 minutos sob contato com NH_3 nos ensaios in vitro.	96
Figura 20. Estruturas de copigmentação das antocianinas com Cálcio (tipo I), Cálcio, antocianinas e MC (tipo II), e/ou Cálcio, antocianinas e compostos fenólicos (tipo III).	97
Figura 21. Variação da coordenada a^* durante sete dias sob luz após 2 minutos (a) ou 30 minutos de contato dos sensores com NH_3 (c). Variação do ΔE^* durante sete dias sob luz após 2 minutos (b) ou 30 minutos de contato dos sensores com NH_3 (d).	99
Figura 22. Fotografia dos sensores no tempo inicial e após 60 dias sem contato com NH_3 (a) no sétimo e 60º dia após a exposição dos sensores a NH_3 por 2 (b) ou 30 minutos (c).....	100
Figura 23. Gráfico normal dos efeitos padronizados para os parâmetros colorimétricos L^* (a), a^* (b), b^* (c), h^* (d) e C^* (e).....	102
Figura 24. Índice de TVB-N dos peixes e parâmetros a^* (a) ou b^* (b) ou ΔE^* (c) do sensor controle ao longo de seis dias. Valores de pH dos peixes e parâmetro ΔE^* do sensor controle ao longo de seis dias de degradação (d). Fotografia dos peixes Lambari e dos sensores no tempo inicial e após seis dias de armazenamento (e).	106
Figura 25. Gráfico de pontuação de análise de componentes principais (PCA) de Lambari em armazenamento refrigerado ao longo do tempo (0, 1, 2, 3, 4, 5, e 6 dias). PCA realizada por meio das coordenadas L^* , a^* , b^* , C^* , h^* e DE^* dos sensores com FI de 0 (a), 25 (b), 50 (c), 250 (d) e 500 mM (e). Gráfico de <i>loading</i> do sensor controle (f).	108

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I

Tabela 1. Potencial Zeta da MC em solução aquosa com FI de 0, 25, 50, 250, 500 mM corrigida com CaCl_2 ou MgCl_2	44
Tabela 2. Eventos térmicos da MC em pó, glicerol e os filmes de MC com FI de 0, 25, 50, 250 e 500 mM corrigida com CaCl_2 ou MgCl_2	45

CAPÍTULO II

Tabela 3. Coordenadas colorimétricas, antocianinas e fenólicos totais do APE.	85
Tabela 4. Comparação da ΔE^* entre os sensores após 2 ou 30 minutos de contato com NH_3 e submetidos a presença de luz visível ou ausência após sete dias.	101
Tabela 5. Parâmetros colorimétricos no primeiro dia de desenvolvimento do sensor (dia 0) e após 60 dias de armazenamento sob escuro.	104
Tabela 6. Validação cruzada para classificação do frescor de peixes em função da FI dos sensores colorimétricos.	109
Tabela 7. Regressão multivariada para predição de TVB-N e pH por parâmetros colorimétricos do sensor controle.	110

MATERIAL SUPLEMENTAR I

Figura 1sl. Curvas termogravimétricas dos filmes de MC contendo 0, 25, 50, 250 e 500 mM corrigida com CaCl_2 (a) ou MgCl_2 (b).	122
Tabela 1sl. Equações de regressão ajustadas, valores de falta de ajuste (F_{aj}) e coeficiente de determinação ajustado (R^2_{aj}) para ângulo de contato e propriedades mecânicas de filmes contendo FI de 0, 25, 50, 250 e 500 mM corrigida com CaCl_2	120
Tabela 2sl. Equações de regressão ajustadas, valores de falta de ajuste (F_{aj}) e coeficiente de determinação ajustado (R^2_{aj}) para ângulo de contato e propriedades mecânicas de filmes contendo FI de 0, 25, 50, 250 e 500 mM corrigida com MgCl_2	120

Tabela 3sl. Valores médios das coordenadas de cor L *, a *, b *, Chroma, ângulo Hue e ΔE^* dos filmes contendo EPA contendo FI de 0, 25, 50, 250 e 500 mM corrigida com CaCl_2 , no tempo inicial (T0) e após contato com NH_3 durante 30 minutos (T30).

.....123

Tabela 4sl. Valores médios das coordenadas de cor L *, a *, b *, Chroma, ângulo Hue e ΔE^* dos filmes contendo EPA contendo FI de 0, 25, 50, 250 e 500 mM corrigida com MgCl_2 , no tempo inicial (T0) e após contato com NH_3 durante 30 minutos (T30).

.....124

MATERIAL SUPLEMENTAR II

Figura 1sII. Espectros UV-Vis da solução de EEA no pH 4 (a), 6 (b), 8 (c) e 10 (d) com 0 ou 500 mM corrigida com CaCl_2 ao longo de 5 dias

125

Figura 2sII. Fotografia dos sensores em bandejas de poliestireno contendo peixe tipo Lambari no dia 0 e após 6 dias sob armazenamento sob 6 °C e 60 %UR.

125

LISTA DE ACRÔNIMOS E ABREVIações

%UR: Umidade relativa
 ΔE^* : Diferença total de cor
ANOVA: Análise de Variância
AT: Antocianinas totais
ATR: Reflectância total atenuada
DIC: Delineamento inteiramente casualizado
DP: Desvio padrão
DSC: Calorimetria exploratória diferencial
EAG: Ácido gálico equivalente
EB: Alongamento até a ruptura
APE: extrato fenólico de açaí
 F_{aj} : Falta de ajuste ajustada
FI: Força iônica
FT: Fenólicos totais
GS: Grau de substituição
HDPE: Polietileno de alta densidade
HPMC: Hidroxipropilmetilcelulose
LDA: Análise discriminante linear
LDPE: Polietileno de baixa densidade
LED: Diodo emissor de luz
L.H: Ligação de hidrogênio
LOD: Limites de detecção
LW: Perda de peso
MC: Metilcelulose
MEV: Microscopia eletrônica de varredura
Mn: Peso molecular médio em número
MSR: Metodologia de superfície de respostas
PA: Poliamida
PCA: Análise de componentes principais
PCs: Componentes principais
PET: Tereftalato de polietileno

PO₂: Permeabilidade ao oxigênio
PBS: Polissuccinato de butileno (PBS)
PCL: Policaprolactona (PCL)
PP: Polipropileno
PVC: Polivinil álcool
R²_{aj}: Coeficiente de determinação ajustado
Ra: Rugosidade média (Ra)
SST: Sólidos solúveis totais
TGA: Análise termogravimétrica
TMAO: Óxido de trimetilamina
T_{max}: Temperatura máxima de degradação
T_{onset}: Temperatura de início de degradação
TS: Resistência à tração
TVB-N: Nitrogênio de bases voláteis totais
UV-Vis: Ultravioleta- Visível
WVP: Permeabilidade ao vapor de água
YM: Módulo de Young

LISTA DE SÍMBOLOS

θ	Ângulo teta
β	Beta
$\rightleftharpoons$	Equilíbrio químico
$=$	Igual
$\geq$	Igual ou maior
$\leq$	Igual ou menor
®	Marca registrada
%	Porcentagem
$\rightarrow$	Reação direta
ΔE^*	Variação total de cor
ΔG_{born}	Energia de hidratação dos íons
Å	Angstrom
C^*	Índice Chroma
C_i	Concentração do íon (i)
ϵ_0	Permissividade do meio
h^*	Ângulo hue
$\lambda_{\text{máx}}$	Comprimento de onda de máxima absorbância
μ	Força iônica
Z_i	Carga elétrica do íon (i)
ζ	Potencial Zeta

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL	23
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	27
Impacto da força iônica e raio iônico de MgCl₂ e CaCl₂ nas propriedades físico-químicas de filmes biodegradáveis e na alteração colorimétrica de sensores de NH₃.....	32
RESUMO.....	32
1. INTRODUÇÃO.....	33
2. MATERIAL E MÉTODOS	35
2.1 Material	35
2.2 Coleta dos frutos de açaí (<i>Euterpe oleraceae</i> Mart.).....	35
2.3 Obtenção do extrato fenólico de açaí (APE)	35
2.4 Preparo dos filmes biodegradáveis e sensores colorimétricos.....	36
2.5 Caracterização dos filmes	37
2.5.1 Espectroscopia no infravermelho médio com transformada de Fourier por reflectância total atenuada (ATR-FTIR)	37
2.5.2 Ângulo de contato (θ)	37
2.5.3 Potencial Zeta (ζ)	37
2.5.4 Termogravimetria (TG)	37
2.5.4 Calorimetria diferencial exploratória (DSC)	38
2.5.5 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	38
2.5.7 Perfilometria	38
2.5.8 Transmissão de luz UV-Vis	38
2.5.9 Espessura e propriedades mecânicas.....	38
2.5.10 Permeabilidade ao oxigênio (PO ₂)	39
2.5.11 Permeabilidade ao vapor d'água (WVP)	39
2.6 Caracterização colorimétrica do APE e sensores	39
2.6.1 Espectro de absorção no UV-Vis do APE	40
2.6.2 Alteração colorimétrica dos sensores por detecção de NH ₃	40
2.7 Análise estatística	40
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
3.1 Espectroscopia na região do infravermelho médio (ATR-FTIR).....	41
3.2 Ângulo de contato (θ) e potencial zeta (ζ)	43
3.3 Análise termogravimétrica (TGA)	45
3.4 Calorimetria diferencial exploratória (DSC)	46

3.5	MEV e Perfilometria	47
3.6	Transmitância dos filmes.....	50
3.7	Espessura e propriedades mecânicas	51
3.8	Propriedades a barreira.....	54
3.9	Impacto da incorporação de sais em sensores colorimétricos	57
3.9.1	Espectro de absorção no UV-Vis do APE	57
3.9.2	Alteração colorimétrica dos sensores por detecção de NH ₃	58
4.	CONCLUSÃO	64
5.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	65
	Desenvolvimento de sensores colorimétricos biodegradáveis para monitoramento do frescor de peixes tipo Lambari e avaliação do efeito da força iônica na sensibilidade de detecção	75
	RESUMO.....	75
1.	INTRODUÇÃO.....	75
2.	MATERIAL E MÉTODOS	78
2.1	Material	78
2.2	Obtenção dos frutos de açaí (<i>Euterpe oleraceae</i> Mart.).....	79
2.3	Obtenção do extrato fenólico de açaí (APE)	79
2.4	Caracterização do APE	79
2.4.1	Antocianinas totais	79
2.4.2	Fenólicos totais	80
2.4.3	Análise colorimétrica	80
2.4.4	Espectro de absorção no UV-Vis do APE e estabilidade com CaCl ₂ ..	80
2.5	Desenvolvimento dos sensores	80
2.6	Caracterização dos sensores.....	81
2.6.1	Espectroscopia no infravermelho médio com transformada de Fourier de refletância total atenuada (ATR-FTIR)	81
2.6.2	Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	81
2.6.3	Análise termogravimetria (TGA)	82
2.6.4	Espectro de absorção no UV-Vis dos sensores	82
2.6.5	Alteração colorimétrica dos sensores por contato com amônia volátil (NH ₃) ..	82
2.6.6	Reversibilidade colorimétrica após detecção de NH ₃	83
2.6.7	Estabilidade da cor durante o armazenamento	83
2.6.8	Ensaio de monitoramento do frescor de peixes Lambari	83
2.6.9	Determinação de pH e TVB-N dos peixes Lambari	83

2.6.10	Desenvolvimento de modelos de predição multivariados	84
2.7	Análise estatística	84
3.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	85
3.1	Caracterização do extrato fenólico de açaí (APE).....	85
3.1.1	Antocianinas e fenólicos totais	85
3.1.2	Espectro de absorção no UV-Vis do APE e dos sensores	86
3.2	Caracterização dos sensores.....	89
3.2.1	Espectroscopia na região do infravermelho médio (FTIR)	89
3.2.2	Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	91
3.2.3	Análise termogravimetria (TGA)	92
3.2.4	Alteração de cor dos sensores em contato com NH ₃	93
3.2.5	Reversibilidade colorimétrica após a detecção de NH ₃	98
3.2.6	Principais fatores de desestabilização colorimétrica após detecção de NH ₃	101
3.2.7	Estabilidade colorimétrica durante o armazenamento.....	103
3.2.8	Aplicação em peixe Lambari	104
3.2.9	Análise de componentes principais (PCA) e discriminante linear (LDA)	107
3.10	Predição de TVB-N e pH por regressão linear múltipla.....	110
4.	CONCLUSÃO	111
5.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	112
	MATERIAL SUPLEMENTAR CAPÍTULO I.....	122
	MATERIAL SUPLEMENTAR CAPITULO II.....	125
	ANEXO I.....	126
	CONSIDERAÇÕES FINAIS	127
	PERSPECTIVAS FUTURAS.....	128

INTRODUÇÃO GERAL

Desde 1950, cerca de 6,3 bilhões de toneladas de resíduos plásticos foram produzidos em todo o mundo, enquanto somente no ano de 2018 a geração de resíduos plásticos chegou a 343 milhões de toneladas (Geyer, Jambeck & Law, 2017). Além dessa impressionante quantidade de resíduos acumulados, vários plásticos de origem petroquímica são resistentes, ou seja, são inertes à degradação bacteriana ou enzimática. No entanto, esses polímeros podem ser fragmentados continuamente por ação química, física ou antrópica, o que proporciona a geração de microplásticos ou nanoplásticos e, que por sua vez, aumentam a área superficial específica do contaminante ambiental. Esses materiais ainda apresentam alta resistência à degradação, liberação de aditivos e monômeros plásticos, capacidade de adsorver e acumular outros poluentes ambientais e, portanto, possuem alto impacto ambiental (Wright, & Kelly, 2017).

No ambiente marinho, os plásticos de origem petroquímica são os componentes do lixo com maior abundância devido à facilidade com que podem ser transferidos, sendo encontrados nos locais mais remotos como na Antártica (Ryan *et al.*, 2009). Em especial o polietileno é responsável por quase 79 % dos polímeros em microplásticos amostrados no ambiente marinho (Hidalgo-Ruz, V., and Thiel, M., 2013). Outra problemática ambiental inerente aos resíduos plásticos é a liberação de aditivos da matriz polimérica, como os plastificantes, que são empregados para melhorar a flexibilidade e processabilidade. Esses aditivos são em sua maioria à base de ésteres de ácido ftálico ou ácido adípico e são considerados agentes de efeitos tóxicos, desreguladores de sistemas endócrinos (Ahuactzin-Pérez, *et al.*, 2018) e adversos em tecidos animais e humanos como fígado, pulmão e testículos (Camacho, Latendresse, Muskhelishvili, Law, & Delclos, 2020; Pradeep, & Benjamin, 2012).

Nas embalagens de alimentos, os plásticos à base de petróleo são, também, amplamente utilizados devido as propriedades desejáveis de barreira ao oxigênio, CO₂, resistência à tração e ao calor, além da possibilidade de selagem a quente e baixo custo de produção (Siracusa, Rocculi, Romani, & Rosa, 2008). No entanto, tendo em vista as problemáticas supracitadas e o crescente interesse dos consumidores pela sustentabilidade ambiental, torna-se cada vez mais importante desenvolver embalagens que apresentem baixa toxicidade, menor impacto ambiental e maior biodegradabilidade. Para isso os pesquisadores têm direcionado esforços no

desenvolvimento de materiais plásticos com fontes de matérias primas naturais, renováveis e biodegradáveis.

Os plásticos biodegradáveis possuem grande vantagem ambiental pois são metabolizados por organismos vivos e transformam-se em segmentos de polímeros com baixo peso molecular e dióxido de carbono (Rudin, & Choi, 2015). Enquanto, os biopolímeros são formados na natureza durante ciclos de crescimento de organismos, ou seja, são polímeros naturais e, portanto, contribuem para a redução nas emissões de dióxido de carbono (Imre, & Pukánszky, 2013), contudo não são necessariamente biodegradáveis (Chandra, & Rustgi, 1998). O impacto ambiental produzido por alguns bioplásticos pode ser maior do que alguns derivados de petróleo e que são biodegradáveis como policaprolactona (PCL) e poli(succinato de butileno) (PBS). A borracha natural ou látex é um exemplo de um biopolímero que perde a propriedade de biodegradabilidade ao produzir ligações cruzadas do cis-1,4-poli-isopreno por meio de um processo conhecido como vulcanização e no qual é utilizado para a produção de pneus (Rudin, & Choi, 2015).

A biodegradabilidade advinda de plásticos é, portanto, a principal propriedade desejável para redução da degradação ambiental relacionada aos resíduos plásticos no planeta. Em especial, os polímeros biodegradáveis apresentam grande potencial para substituição dos plásticos convencionais utilizados nas embalagens de alimentos. Visto que são plásticos que requerem um curto tempo de vida, são descartáveis e não necessitam de altas resistências mecânica e térmica como os plásticos utilizados para eletrodomésticos, peças de automóveis e em construção civil.

Dentre os biopolímeros utilizados para o desenvolvimento de embalagens de alimentos, muita atenção tem sido dedicada aos polissacarídeos, proteínas, lipídios e poliésteres isoladamente ou em mistura (*blends*) (Mohamed, El-Sakhawy, & El-Sakhawy, 2020; Park *et al.*, 2020). Dentre esses, a celulose apresenta um grande potencial de substituição dos plásticos tradicionais, tendo em vista que é o biopolímero renovável mais abundante da terra, capaz de formar hidrocoloides e, dependendo das modificações químicas, pode ser considerada biodegradável (Khalil *et al.*, 2017).

A estrutura química da celulose consiste num homopolissacarídeo linear ordenada em unidades D-glicopiranosose por meio de ligações glicosídicas β -1-4 e organizadas como microfibrilas unidas para formar redes compactadas em fibras de celulose (Jedvert, & Heinze, 2017). Diversas modificações químicas na celulose nativa são

frequentemente realizadas com o intuito de obter propriedades específicas de rigidez, permeabilidade a gases e, também, para melhorar a solubilidade aquosa, capacidade de processamento e até reduzir a biodegradabilidade (Qiu, Tao, Ren, & Hu, 2012).

A metilcelulose é um exemplo de biopolímero que mantém a propriedade de biodegradabilidade, sendo derivado de celulose mais simples de produção por contar com apenas a substituição de grupos metil ($-\text{CH}_3$) nas hidroxilas de posição C-2, C-3 e/ou C-6 em unidades de D-glicose (Nasatto *et al.*, 2015; Rimdusit, Jingjid, Damrongsakkul, Tiptipakorn, Takeichi, 2008). Apesar dessa modificação, os plásticos à base de metilcelulose apresentam baixa barreira a vapor d'água, alta solubilidade aquosa, biodegradabilidade e dificuldade para o processamento em *scale-up*, o que limita aplicações em alimentos úmidos (Kalkan, Otağ, & Engin, 2019).

Algumas estratégias têm sido exploradas para melhorar o desempenho dessas propriedades, como a adição de reforços (Silvério *et al.*, 2014), mistura de polímeros (Lee *et al.*, 2019) e reticulação das cadeias poliméricas (Fadeeva *et al.*, 2019). Aliado a isso, foi observado que alguns fatores extrínsecos ao polímero como a força iônica (FI), pH e temperatura de secagem da dispersão formadora dos filmes, também, influenciam significativamente nas propriedades mecânicas e de barreira (Chambi & Grosso, 2011; Rosa, Vanga, Gariepy, & Raghavan, 2019). Contudo, até o momento, poucos trabalhos estudaram o impacto da FI nas propriedades físico-químicas de filmes biodegradáveis. Segundo Lewis & Randall (1961), a FI é definida como a ação de cargas e interações interiônicas nas atividades eletrolíticas das espécies em solução. Fang, Tung, Britt, Yada, & Dalglish (2002) mostraram que a FI dos íons de Ca^{+2} proporcionou a reticulação nos filmes a base de proteínas de soro de leite, o que aumentou os valores da resistência máxima à tração, alongação percentual, enquanto houve manutenção da permeabilidade a vapor d'água.

Além do requisito de biodegradabilidade e sustentabilidade ambiental, os pesquisadores necessitam desenvolver materiais plásticos contendo funções inovadoras para conquistar maior público de consumidores e, também, atender exigências na qualidade de alimentos impostas por órgãos fiscalizadores. Uma dessas maneiras é o desenvolvimento de sensores biodegradáveis ou embalagens inteligentes para monitorar em tempo real a qualidade físico-química e/ou microbiológica dos alimentos. Para assegurar características com menor impacto ambiental, alguns trabalhos têm desenvolvido materiais inteligentes com substâncias

naturais, seguras e que apresentam capacidade de alteração colorimétrica em função de alguma modificação físico-química ocorrida no alimento, como as antocianinas (Freitas *et al.*, 2020a; Kang *et al.*, 2019; Zhai *et al.*, 2017).

As antocianinas são fitopigmentos hidrossolúveis da família dos flavonoides que apresentam em sua estrutura química um grupo glicona (açúcares) e outro aglicona (antocianidinas) derivados do 2-fenilbenzopirílio (Tarone, Cazarin, & Marostica Junior, 2020). Aliado a isso, as antocianinas apresentam conveniência para aplicação em alimentos, pois possuem propriedades benéficas para a saúde do ser humano e, também, podem ser utilizadas como indicadores de pH para monitorar a qualidade de algum alimento, visto que são reativas a espécies ácidas ou básicas presentes no sistema e apresentam ampla variação colorimétrica (Peixoto, Roxo, Krstin, Wang, & Wink, 2016; Silva, Mastrantonio, Costa, & de Moraes, 2019). Diante disso, diversos estudos utilizaram extratos de antocianinas para a funcionalização de polímeros e desenvolvimento de sensores ou embalagens inteligentes com a capacidade de indicar modificações do pH, CO₂, amônia e frescor de alimentos (Kang *et al.*, 2019; Vo, Dang, & Chen, 2019; Saliu & Pergola, 2018; Alizadeh-Sani, Tavassoli, McClements, & Hamishehkar, 2021).

Freitas *et al.* (2020b) mostraram que a variação do pH na matriz polimérica foi um fator extrínseco importante para o desenvolvimento de sensores reversíveis ou irreversíveis. Esse comportamento irreversível das cores nos sensores foi justificado por meio da maior estabilidade das estruturas de antocianinas ao interagir com a matriz polimérica, o que aconteceu em maior intensidade ao corrigir o pH da suspensão polimérica para 2,0. Portanto, estudos sobre efeitos dos fatores extrínsecos à matriz polimérica como pH, pressão externa, temperatura e FI podem ser úteis para descobertas relativas as interações de detecção do analito, estabilidade e alteração das cores. Contudo, até o momento não foram encontrados trabalhos sobre o impacto da incorporação de sais divalentes em sensores contendo antocianinas em relação às propriedades de detecção de espécies básicas, como amônia volátil e/ou íons OH⁻.

Nesse contexto, objetivou-se compreender a influência da força iônica e do raio iônico do cloreto de magnésio (MgCl₂) e cloreto de cálcio (CaCl₂) nas propriedades físico-químicas de filmes à base de metilcelulose e nas propriedades colorimétricas de sensores de detecção de NH₃.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdul Khalil, H. P. S., Tye, Y. Y., Saurabh, C. K., Leh, C. P., Lai, T. K., Chong, E. W. N., Fazita, M. R. N., Hafiidiz, J. M., Banerjee, A. Syakir, M. I. (2017). Biodegradable polymer films from seaweed polysaccharides: A review on cellulose as a reinforcement material. **Express Polymer Letters**, 11(4), 244–265. doi:10.3144/expresspolymlett.2017.26
- Ahuactzin-Pérez, M., Tlecuitl-Beristain, S., García-Dávila, J., Santacruz-Juárez, E., González-Pérez, M., Gutiérrez-Ruíz, M. C., & Sánchez, C. (2018). Mineralization of high concentrations of the endocrine disruptor dibutyl phthalate by *Fusarium culmorum*. **3 Biotech**, 8(1). doi:10.1007/s13205-017-1065-2
- Alizadeh-Sani, M., Tavassoli, M., McClements, D. J., & Hamishehkar, H. (2021). Multifunctional halochromic packaging materials: Saffron petal anthocyanin loaded-chitosan nanofiber/methyl cellulose matrices. **Food Hydrocolloids**, 106237. doi:10.1016/j.foodhyd.2020.106237
- Camacho, L., Latendresse, J. R., Muskhelishvili, L., Law, C. D., & Delclos, K. B. (2020). Effects of intravenous and oral di(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) and 20% Intralipid vehicle on neonatal rat testis, lung, liver, and kidney. **Food and Chemical Toxicology**, 111497. doi:10.1016/j.fct.2020.111497
- Chambi, H. N. M., & Grosso, C. R. F. (2011). Mechanical and water vapor permeability properties of biodegradable films based on methylcellulose, glucomannan, pectin and gelatin. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, 31(3), 739–746. doi:10.1590/s0101-20612011000300029
- Chandra, R., & Rustgi, R. (1998). Biodegradable polymers. **Progress in Polymer Science**, 23(7), 1273–1335. doi:10.1016/s0079-6700(97)00039-7
- Fang, Y., Tung, M. A., Britt, I. J., Yada, S., & Dalgleish, D. G. (2002). Tensile and Barrier Properties of Edible Films Made from Whey Proteins. **Journal of Food Science**, 67(1), 188–193. doi:10.1111/j.1365-2621.2002.tb11381.x

Fadeeva, I. V., Trofimchuk, E. S., Dedushenko, S. K., Fomin, A. S., Davydova, G. A., Selezneva, I. I., Perfiliev, Y. D., & Barinov, S. M. (2019). Methylcellulose films partially crosslinked by iron compounds for medical applications. **Materials Today Communications**, 18, 54–59. doi:10.1016/j.mtcomm.2018.10.008

Freitas, P. A. V., Silva, R. R. A., de Oliveira, T. V., Soares, R. R. A., Junior, N. S., Moraes, A. R. F., Pires, A. C. dos S., & Soares, N. F. F. (2020a). Development and characterization of intelligent cellulose acetate-based films using red cabbage extract for visual detection of volatile bases. **LWT - Food Science and Technology**, 132, 109780. doi:10.1016/j.lwt.2020.109780

Freitas, P. A. V., De Oliveira, T. V., Silva, R. R. A., Moraes, A. R. F., Pires, A. C. S., Soares, R. R. A., Junior, N. S., Soares, N. F. F. (2020b). Effect of pH on the intelligent film-forming solutions produced with red cabbage extract and hydroxypropylmethylcellulose. **Food Packaging and Shelf Life**. doi:10.1016/j.fpsl.2020.100604

Hidalgo-Ruz, V., and Thiel, M. (2013). Distribution and abundance of small plastic debris on beaches in the SE Pacific (Chile): a study supported by a citizen science project. **Mar. Environ. Res.** 87–88, 12–18. doi:10.1016/j.marenvres.2013.02.015

Lee, S., Lei, Y., Wang, D., Li, C., Cheng, J., Wang, J., Meng, W., & Liu, M. (2019). The study of zeolitic imidazolate framework (zif-8) doped polyvinyl alcohol/starch/methyl cellulose blend film. **Polymers**, 11(12), doi:10.3390/polym11121986

Imre, B., & Pukánszky, B. (2013). Compatibilization in bio-based and biodegradable polymer blends. **European Polymer Journal**, 49(6), 1215–1233. doi:10.1016/j.eurpolymj.2013.01.019

Jedvert, K., & Heinze, T. (2017). Cellulose modification and shaping – a review. **Journal of Polymer Engineering**, 37(9). doi:10.1515/polyeng-2016-0272

Kalkan, S., Otağ, M. R., & Engin, M. S. (2019). Physicochemical and bioactive properties of edible methylcellulose films containing *Rheum ribes* L. extract. **Food Chemistry**, 125524. doi:10.1016/j.foodchem.2019.125524

Kang, S., Wang, H., Xia, L., Chen, M., Li, L., Cheng, J., Li, X., Jiang, S. (2019). Colorimetric film based on polyvinyl alcohol/okra mucilage polysaccharide incorporated with rose anthocyanins for shrimp freshness monitoring. **Carbohydrate Polymers**, 115402. doi:10.1016/j.carbpol.2019.115402

Lewis, G. N.; Randall, M.; Pitzer, K. S.; Brewer, L. (1961). **Thermodynamics**. New York, N.Y.: McGraw Hill, p. 723, ISBN: 0070376220 9780070376229.

Mohamed, S. A. A., El-Sakhawy, M., & El-Sakhawy, M. A.-M. (2020). Polysaccharides, Protein and Lipid-Based Natural Edible Films in Food Packaging: A Review. **Carbohydrate Polymers**, 116178. doi:10.1016/j.carbpol.2020.116178

Nasatto, P. L., Pignon, F., Silveira, J. L. M., Duarte, M. E. R., Nosedá, M. D., & Rinaudo, M. (2015). Methylcellulose, a cellulose derivative with original physical properties and extended applications. **Polymers**, 7(5), 777–803. <https://doi.org/10.3390/polym7050777>

Park, S., Oh, Y., Yun, J., Yoo, E., Jung, D., Park, K. S., Oh, K. K., Lee, S. H. (2020). Characterization of blended cellulose/biopolymer films prepared using ionic liquid. **Cellulose**. doi:10.1007/s10570-020-03152-3

Peixoto, H., Roxo, M., Krstin, S., Wang, X., & Wink, M. (2016). Anthocyanin-rich extract of Acai (*Euterpe precatoria* Mart.) mediates neuroprotective activities in *Caenorhabditis elegans*. **Journal of Functional Foods**, 26, 385–393. doi:10.1016/j.jff.2016.08.012

Pradeep, S., & Benjamin, S. (2012). Mycelial fungi completely remediate di(2-ethylhexyl)phthalate, the hazardous plasticizer in PVC blood storage bag. **Journal of Hazardous Materials**, 235-236, 69–77. doi:10.1016/j.jhazmat.2012.06.064

Qiu, X., Tao, S., Ren, X., & Hu, S. (2012). Modified cellulose films with controlled permeability and biodegradability by crosslinking with toluene diisocyanate under homogeneous conditions. **Carbohydrate Polymers**, 88(4), 1272–1280. doi:10.1016/j.carbpol.2012.02.007

Rimdusit, S., Jingjid, S., Damrongsakkul, S., Tiptipakorn, S., & Takeichi, T. (2008). Biodegradability and property characterizations of Methyl Cellulose: Effect of nanocompositing and chemical crosslinking. **Carbohydrate Polymers**, 72(3), 444–455. doi:10.1016/j.carbpol.2007.09.007

Rosa, G. S., Vanga, S., Gariepy, Y., & Raghavan, V. (2019). The effect of drying on the mechanical properties and structure of biodegradable films. **Editorial Universitat Politècnica de València**. 675-682. doi:10.4995/IDS2018.2018.7624

Rudin, Alfred., & Choi, Phillip. (2015). The elements of polymer science and engineering. **Elsevier**, 3^o Ed., p. 584, ISBN: 978-85-352-7041-9

Ryan, P. G., Moore, C. J., van Franeker, J. A., and Moloney, C. L. (2009). Monitoring the abundance of plastic debris in the marine environment. **Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.**, 364, 1999–2012. doi:10.1098/rstb.2008.0207

Saliu, F., & Pergola, R. D. (2018). Carbon dioxide colorimetric indicators for food packaging application: Applicability of anthocyanin and poly-lysine mixtures. **Sensors and Actuators B: Chemical**, 258, 1117–1124. doi:10.1016/j.snb.2017.12.007

Sharma, A., Thakur, M., Bhattacharya, M., Mandal, T., & Goswami, S. (2019). Commercial application of cellulose nano-composites – A review. **Biotechnology Reports**, 21, e00316. doi.org/10.1016/j.btre.2019.e00316

Silva, C. K., Mastrantonio, D. J. S., Costa, J. A. V., & de Moraes, M. G. (2019). Innovative pH sensors developed from ultrafine fibers containing açai (*Euterpe*

oleracea) extract. **Food Chemistry**, 294, 397–404. doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.05.059

Silvério, H. A., Neto, W. P. F., Da Silva, I. S. V., Rosa, J. R., Pasquini, D., De Assunção, R. M. N., Da Silva Barud, H., & Ribeiro, S. J. L. (2014). Mechanical, thermal, and barrier properties of methylcellulose/cellulose nanocrystals nanocomposites. **Polímeros**, 24(6), 683–688. doi.org/10.1590/0104-1428.1691

Siracusa, V., Rocculi, P., Romani, S., & Rosa, M. D. (2008). Biodegradable polymers for food packaging: a review. **Trends in Food Science & Technology**, 19(12), 634–643. doi:10.1016/j.tifs.2008.07.003

Tarone, A. G., Cazarin, C. B. B., & Marostica Junior, M. R. (2020). Anthocyanins: New techniques and challenges in microencapsulation. **Food Research International**, 133. doi:10.1016/j.foodres.2020.109092

Vo, T. V., Dang, T. H., & Chen, B. H. (2019). Synthesis of Intelligent pH Indicative Films from Chitosan/Poly(vinyl-alcohol)/Anthocyanin Extracted from Red Cabbage. **Polymers**, 11(7), 1088. doi:10.3390/polym11071088

Wright, S. L. & Kelly, F. J. (2017). Plastic and Human Health: A Micro Issue?. **Environmental Science & Technology**, 51, 6634–6647. doi:10.1021/acs.est.7b00423.

Zhai, X., Shi, J., Zou, X., Wang, S., Jiang, C., Zhang, J., Huang, X., Zhang, W., & Holmes, M. (2017). Novel colorimetric films based on starch/polyvinyl alcohol incorporated with roselle anthocyanins for fish freshness monitoring. **Food Hydrocolloids**, 69, 308–317. doi.org/10.1016/j.foodhyd.2017.02.014

CAPÍTULO I

Impacto da força iônica e raio iônico de MgCl_2 e CaCl_2 nas propriedades físico-químicas de filmes biodegradáveis e na alteração colorimétrica de sensores de NH_3

RESUMO

Nos últimos anos a crescente geração de resíduos plásticos derivados de petróleo ampliou a necessidade de desenvolvimento de pesquisas relacionadas aos polímeros biodegradáveis. Contudo, as reduzidas propriedades mecânicas e de barreira são os obstáculos para a efetivação destas tecnologias. Neste contexto, objetivou-se avaliar o impacto da força iônica (FI) e do raio iônico do cloreto de magnésio (MgCl_2) e do cloreto de cálcio (CaCl_2) nas propriedades físico-químicas de filmes à base de metilcelulose e nas propriedades colorimétricas dos sensores de detecção a NH_3 . Mostramos que a incorporação de sais com FI de 50 mM nos filmes de MC promoveu a reticulação das cadeias poliméricas por meio de interações eletrostáticas e ligações coordenadas, enquanto valores acima de 50 mM contribuíram para o efeito plastificante. A incorporação dos sais nos sensores contendo antocianinas gerou cores distintas, o que foi relacionado à formação de copigmentos ou metaloantocianinas. O efeito aditivo da FI ou de cátions com o menor raio iônico (Magnésio) nos sensores aumentou a sensibilidade de detecção a NH_3 e provocou a redução do tempo necessário para observar alteração das cores nos sensores em até três vezes. Portanto, destaca-se que estes sais podem ser utilizados como um novo aditivo com função de plastificante seguro ou de reticulação e abre perspectivas para pesquisas com a intenção de modular interações entre aditivos/polímeros em embalagens ativas e/ou inteligentes.

1. INTRODUÇÃO

Em 2018, a geração de resíduos plásticos chegou a 343 milhões de toneladas, com a estimativa que alcance 33.000 milhões de toneladas em 2050, caso a tendência de consumo se mantenha estável como nos últimos 67 anos (Geyer, Jambeck & Law, 2017). O desenvolvimento de polímeros biodegradáveis é uma possibilidade para redução dos impactos ambientais associados ao longo tempo de degradação e das emissões dos gases do efeito estufa que são inerentes da produção dos polímeros derivados de petróleo (Sudharsan *et al.*, 2017). Os polímeros biodegradáveis são aqueles no qual todo o carbono orgânico deverá ser convertido para biomassa, água, dióxido de carbono e/ou metano via a ação natural de microrganismos de ocorrência natural, como bactérias, fungos e algas, num período de tempo consistente com as condições ambientais do método de disposição (ASTM, 2018).

Dentre os tipos de filmes biodegradáveis, a celulose ganha destaque por ser o biopolímero renovável mais abundante da terra, sendo encontrado em plantas, algas (Tarchoun, Trache, & Klapötke, 2019), tunicados (Zhao & Li, 2014), oomicetos (Helbert, Sugiyama, Ishihara, & Yamanaka, 1997) e produzido por biofilmes bacterianos (Du, Zhao, Peng, Zhou, & Han, 2018). A celulose é um homopolissacarídeo linear com estrutura ordenada por ligações glicosídicas β -1-4 das unidades de D-glicopirranose. Possui redes compactadas em fibras de celulose devido à capacidade de realizar ligações de hidrogênio intra e intermoleculares, contribuindo para aplicações que necessitam de alta resistência mecânica e baixa permeabilidade a vapor d'água (Sharma, Thakur, Bhattacharya, Mandal, & Goswami, 2019).

As propriedades físico-mecânicas de alto módulo de elasticidade (Young) e baixa elongação percentual são características de polímeros que contêm fibras de celulose e, portanto, provocam limitações nas aplicações que necessitam de revestimento com um bom ajuste ao material (Cazón, Vázquez, & Velazquez, 2018). Uma vez que durante a etapa de embalagem torna-se necessário polímeros com boa flexibilidade para que não ocorram fissuras, fraturas e outros defeitos mecânicos, comprometendo a qualidade do produto. Diante disso, diferentes modificações químicas na estrutura da celulose têm sido realizadas para melhorar essas propriedades mecânicas sem perder as características de reciclabilidade, biocompatibilidade e biodegradação (Kumar & Walia, 2014).

Dentre as modificações, destacam-se os derivados de ésteres de celulose que são obtidos pela substituição dos grupos hidroxilas por grupos de acetato, tendo como produto os polímeros de acetato de celulose e butirato de celulose. Essa substituição confere maior hidrofobicidade aos filmes e, devido a isto, tornou-se uma das principais classes de polímeros biodegradáveis para aplicação em alimentos com alta umidade e para produção de embalagens ativas (Pola *et al.*, 2016; Saha *et al.*, 2018). A celulose nativa não dissolve em água e foi a partir dos derivados de éteres de celulose como a metilcelulose (MC) e hidroxipropilmetilcelulose (HPMC) que foram obtidos os primeiros polímeros celulósicos com características hidrossolúveis. Esses polímeros modificados proporcionam maior homogeneidade e facilidade de incorporação de compostos hidrossolúveis ou de reforço para embalagens alimentícias (Ghadermazi, Hamdipour, Sadeghi, Ghadermazi, & Khosrowshahi, 2019; Halim, Kamari, & Phillip, 2018).

A MC é o tipo de derivado de celulose mais simples de produção por contar com apenas a substituição de grupos metil ($-CH_3$) nas hidroxilas de posição C-2, C-3 e/ou C-6 em unidades de D-glicose (Nasatto *et al.*, 2015). A solubilidade aquosa da MC é influenciada pela distribuição dos grupos metoxilas, porém é o grau de substituição (GS) dos grupos metoxilas que mais interfere na solubilidade, sendo considerada solúvel em solventes orgânicos quando o GS é maior que 2,5 (Hirrien, Desbrières, & Rinaudo, 1996). Diversas pesquisas foram direcionadas para produção de embalagens ativas (Matta, Tavera-Quiroz, & Bertola, 2019; Nunes *et al.*, 2018) ou inteligentes (Nopwinyuwong, Trevanich, & Suppakul, 2010; Rukchon, Nopwinyuwong, Trevanich, Jinkarn, & Suppakul, 2014) à base de MC, devido à facilidade na incorporação de aditivos hidrofílicos. Entretanto, as pobres propriedades intrínsecas da celulose em relação a barreira a vapor d'água, resistência ao impacto e impedimento de selagem a quente são os principais obstáculos para a efetivação destas tecnologias (Imre & Pukánszky, 2013).

Diante disso, as vertentes de pesquisas foram orientadas a estudar as propriedades físicas e mecânicas dos filmes, por meio da adição de reforços (Silvério *et al.*, 2014), blenda de polímeros (Lee *et al.*, 2019) e reticulação das cadeias poliméricas (Fadeeva *et al.*, 2019). Além disto, foi observado que alguns fatores extrínsecos ao polímero como o pH, pressão e temperatura de secagem da dispersão formadora dos filmes, também, influenciam significativamente nas propriedades

mecânicas e de barreira a vapor d'água (Chambi & Grosso, 2011; Rosa, Vanga, Garipey, & Raghavan, 2019). Contudo, até hoje não foram encontrados estudos envolvendo o impacto do fator extrínseco da FI do sistema sobre as propriedades de filmes celulósicos biodegradáveis e de sensores colorimétricos para detecção de NH_3 . Para o avanço na pesquisa de filmes biodegradáveis e sensores colorimétricos, o presente estudo teve como objetivo compreender a influência da força iônica dos sistemas e o raio iônico do cloreto de magnésio (MgCl_2) e do cloreto de cálcio (CaCl_2) nas propriedades físico-químicas de filmes à base de metilcelulose e nas propriedades colorimétricas dos sensores de detecção de NH_3 .

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material

Acetona, cloreto de cálcio (CaCl_2) e cloreto de lítio (LiCl) foram adquiridos da Vetec (Duque de Caxias, Brasil). Álcool etílico foi adquirido da Neon (Suzano, Brasil). Ácido clorídrico (HCl), cloreto de magnésio (MgCl_2), cloreto de amônio (NH_4Cl), glicerol e hidróxido de sódio (NaOH) foram comprados da Synth (Diadema, Brasil). Cloreto de sódio (NaCl) foi adquirido da Fmaia (Belo Horizonte, Brasil). Metilcelulose de massa molar média de 40.000, viscosidade de 400 cP e com GS de 1,6 a 1,9 (metoxi/celulose) foi comprada da Sigma-Aldrich (St.Louis, Estados Unidos da América).

2.2 Coleta dos frutos de açaí (*Euterpe oleraceae* Mart.)

Foram utilizados frutos de açaí (*Euterpe oleraceae* Mart.) colhidos em Cametá - Pará (Latitude: 2° 14' 21.8" S e Longitude: 49° 29' 54.3" O). Os frutos foram selecionados, lavados e despulpados. A casca e o mesocarpo foram triturados em *mixer* durante 3 minutos com adição de água destilada na proporção de 3:1 (m/m) do fruto/água. A polpa homogênea foi congelada em ultrafreezer à temperatura de -60 °C até o momento das análises.

2.3 Obtenção do extrato fenólico de açaí (APE)

A obtenção do APE foi realizada segundo Rocha *et al.* (2018), no qual cerca de 50 g de poupa de açaí foi adicionada num balão contendo solução etanólica (75 % v/v) e, em seguida, o pH foi corrigido para 2,0 utilizando ácido clorídrico. A extração

assistida por ultrassom foi realizada em banho ultrassônico (Ultracleaner 1400A, Unique, Brasil) operando a 40 kHz e na temperatura de 40 °C durante 50 minutos. O APE obtido foi filtrado a vácuo em funil de Büchner com papel filtro qualitativo Whatman nº 1 e concentrado a vácuo com auxílio de um evaporador rotativo (IKA RV 10 digital) na temperatura máxima de 50 °C até a obtenção do teor de sólidos solúveis totais (SST) de aproximadamente 7 °Brix. O SST foi obtido pela leitura direta em refratômetro marca Leica, modelo AR 200 (New York, USA). O APE foi armazenado em frasco âmbar sob congelamento no ultrafreezer (aproximadamente -60 °C).

2.4 Preparo dos filmes biodegradáveis e sensores colorimétricos

Os filmes foram preparados pelo método de *casting* conforme descrito por (Noronha, De Carvalho, Lino, & Barreto, 2014) com adaptações. Foram adicionadas as massas dos sais de CaCl₂ ou MgCl₂ correspondentes a 25, 50, 250 ou 500 mM de FI do sistema num béquer contendo 100 mL de água milli-Q, com valores obtidos por meio Equação 1, e aquecido à temperatura de 100 °C ± 2 °C. Em seguida, dispersou 2 g do polímero MC, nesta solução, sob agitação magnética de 500 rpm por 15 minutos, adicionou o glicerol (20 % m.m⁻¹) em relação à massa do polímero e manteve-se a agitação por mais 10 minutos.

$$FI = \mu = \frac{\sum_{i=1}^n Z_i^2 * C_i}{2} \quad (1)$$

Em que μ é a FI (mol.L⁻¹), C_i é a concentração do íon (i) (mol.L⁻¹), Z_i é o número da carga elétrica do íon (i).

A suspensão formadora de filme foi vertida em placas de vidro com bordas (34 cm x 18,5 cm) e armazenada a 23 °C e 55 % Umidade Relativa (%UR) por 72 horas para evaporação do solvente. Para o desenvolvimento dos sensores colorimétricos foi utilizado o mesmo procedimento, porém com a incorporação de 4 mL do APE logo após a etapa de adição do plastificante (glicerol). O controle foi preparado nas mesmas condições e em ausência de qualquer sal.

Uma consideração a ser ressaltada está relacionada aos valores de FI do sistema ou da concentração de qualquer componente na matriz polimérica, ou seja, o produto final (plástico). Nesse sistema, tanto os valores de FI quanto de concentração são descritos como analíticos, ou seja, são valores obtidos a partir de um cálculo

teórico e que não são consideradas as variações de volume, dissociação, ionização ou reações das espécies com outros componentes. Tendo em vista a complexidade do sistema e a evaporação de água, torna-se improvável a determinação real da FI ou concentração dos aditivos com acurácia e, portanto, a partir desse momento, fica designado as medidas de FI e concentração como valores analíticos teóricos.

2.5 Caracterização dos filmes

2.5.1 Espectroscopia no infravermelho médio com transformada de Fourier por reflectância total atenuada (ATR-FTIR)

A análise de FTIR foi realizada num espectrômetro Nicolet 6700 (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, EUA) equipado com acessório ATR com cristal de germânio. Os espectros foram obtidos numa resolução de 4 cm^{-1} com número de onda de 4000 a 700 cm^{-1} e 32 varreduras foram realizadas para cada espectro. Foram realizados os processamentos de normalização da intensidade de absorção e a correção da linha de base.

2.5.2 Ângulo de contato (θ)

O ângulo de contato entre a água e a superfície dos filmes foi determinado com auxílio de um goniômetro (Kruss, Alemanha) por meio do método da gota séssil, depositando uma gota na superfície do filme em que o solvente foi evaporado. As leituras foram realizadas a $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ com 3 replicatas e 3 repetições por tratamento.

2.5.3 Potencial Zeta (ζ)

Os valores de potencial zeta (ζ) da metilcelulose em dispersão aquosa com 0, 25, 50, 250 e 500 mM de CaCl_2 ou MgCl_2 foram obtidos pelo método de mobilidade eletroforética utilizando a equação de Smoluchowski e com auxílio do Zetasizer Nano ZS (Zen 3600, Malvern Instruments, Reino Unido). As amostras foram diluídas em água milli-Q com o pH igual a 6,8 até a concentração de $0,01\text{ g.mL}^{-1}$ e as leituras foram realizadas na célula DTS 1070.

2.5.4 Termogravimetria (TG)

A decomposição térmica dos filmes foi avaliada pelo método termogravimétrico usando um analisador TGA, modelo DTG-60H (Shimadzu, Japão). Aproximadamente

3 mg de cada filme foram aquecidos em cadinhos de alumina até 600 °C, a uma taxa de aquecimento de 10 °C.min⁻¹ em atmosfera de nitrogênio com fluxo de 50 mL.min⁻¹.

2.5.4 Calorimetria diferencial exploratória (DSC)

As medidas de DSC foram realizadas num calorímetro associado a um analisador térmico, modelo DSC-60H (Shimadzu, Japão). Cerca de 3 mg dos filmes foram colocados em cadinhos de alumínio e aquecidos até 500 °C com taxa de 10 °C.min⁻¹ sob atmosfera de nitrogênio.

2.5.5 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

As fotomicrografias da seção transversal dos filmes foram obtidas por meio do microscópio eletrônico de varredura com detector de elétrons secundários, modelo TM3000 (Hitachi High Technologies America, Inc. Schaumburg, IL, EUA). A tensão de aceleração de elétrons usada foi de 15 kV com ampliação das imagens de 600x.

2.5.7 Perfilometria

A rugosidade e topografia do filme foram caracterizadas por meio um perfilômetro óptico 3D, modelo Contour GTK (Bruker, USA) e analisadas usando o software Gwyddion versão 2.55. Foi usada a técnica de interferometria de luz branca para medir a topografia dos filmes com resolução lateral de até 0,5 mícrons e vertical melhor que 1,0 nm. As imagens foram obtidas das superfícies que estavam em contato com o ar durante a etapa de secagem dos filmes e com varredura da área de 1,23 mm por 0,927 mm.

2.5.8 Transmissão de luz UV-Vis

A transmitância dos filmes foi medida em espectrofotômetro UV-Vis, modelo UV 1800 (Shimadzu, Japão). As amostras foram cortadas em formato retangular com dimensões de (3 x 6) cm². O intervalo de varredura foi de 200 a 800 nm e como referência foi utilizado o compartimento vazio. Os dados foram plotados em transmitância (u.a.) por comprimento de onda (nm).

2.5.9 Espessura e propriedades mecânicas

A espessura dos filmes foi determinada com o auxílio de um micrômetro digital com precisão de 0,001 mm (Mitutoyo Corporation, Japão). As medidas foram realizadas em 10 pontos aleatórios para cada amostra com três repetições e em sete réplicas. A resistência máxima à tração (TS), o alongamento até a ruptura (EB) e o módulo de Young (YM) foram determinados por ensaio de tração usando Máquina Universal de Ensaio Mecânicos, modelo 3367 (Instron Corporation, Norwood, MA, USA) equipada com célula de carga de 500 N. Os corpos de prova foram dimensionados em 150 x 25 mm² e a análise foi realizada de acordo com a norma ASTM D882-12 (ASTM, 2012) com três repetições e sete réplicas por tratamento.

2.5.10 Permeabilidade ao oxigênio (PO₂)

A PO₂ dos filmes foi determinada no VAC-V1 (Labthink Instruments Co., Shandong, China) de acordo com a norma ASTM D1434 (ASTM, 2009) com adaptações. A análise foi realizada a 25 ± 2 °C e 50 ± 2 % UR e o oxigênio foi removido por uma bomba de vácuo durante por 8 horas. Foram realizadas três repetições por tratamento e a PO₂ foi expressa em (cm³. μm.m⁻².d⁻¹.atm⁻¹).

2.5.11 Permeabilidade ao vapor d'água (WVP)

A WVP dos filmes foi determinada por meio do método dessecante, seguindo a ASTM E96/E96M (ASTM, 2016) com modificações. Os filmes foram dimensionados com 80 mm de diâmetro, colocados sob as cápsulas circulares de parafina e vedados com parafina líquida. O interior das cápsulas foi preenchido com solução saturada de MgCl₂ (32,5 %UR) e armazenado a 25 °C em dessecador contendo solução saturada de NaCl para manter a umidade relativa igual a 75,1 % e promover o gradiente constante de 43 %UR através do filme. As amostras foram pesadas a cada 2 horas durante 48 horas. A WVP foi calculada usando três repetições e expressa em (g.m⁻¹.s⁻¹.kPa⁻¹).

2.6 Caracterização colorimétrica do APE e sensores

A fim de compreender o impacto da FI e do raio iônico dos cátions em polímeros biodegradáveis funcionalizados, como sensores colorimétricos, foi incorporado o APE nos filmes desenvolvidos neste trabalho e avaliada as modificações colorimétricas produzidas ao detectar NH₃.

2.6.1 Espectro de absorção no UV-Vis do APE

Os espectros de absorção no UV-Vis do APE com valores de pH entre 1 ao 13 foram obtidos com auxílio do espectrofotômetro UV-Vis modelo UV 1800 (Shimadzu, Japão). Foi ajustada a concentração do APE para 0,1 mL.mL⁻¹ em água milli-Q, obtendo-se SST igual a 18,3 °Brix. A faixa do comprimento de onda utilizada para leitura foi de 350 a 800 nm.

2.6.2 Alteração colorimétrica dos sensores por detecção de NH₃

O impacto da incorporação de CaCl₂ e MgCl₂ nas propriedades colorimétricas dos sensores foi avaliada por meio do ensaio de detecção de NH₃ de acordo com a metodologia de Freitas *et al.* (2020a) com modificações. Os sensores foram dimensionados com área de 16 cm² e mantidos dentro de dessecadores a 25 °C e 51 %UR com uso de solução saturada de Mg(NO₃)₂ e com 10 mL da solução de NH₄Cl em béquer. A NH₃ foi produzida por meio da reação entre a solução de NH₄Cl (80 mg.mL⁻¹) e ao corrigir pH para 12 com NaOH (4 N).

A alteração das cores dos sensores em contato com NH₃ foi avaliada durante 30 minutos por meio das coordenadas colorimétricas (L*, a*, b*) nos tempos de 0, 2, 5, 10, 15, 20 e 30 minutos empregando-se a escala de cor CIELAB por reflectância, com geometria esférica d/8°, iluminante D65 e ângulo de observação de 10 °, com auxílio do colorímetro Colorquest XE (Hunter Lab, Reston, USA). Os valores de Diferença Total de Cor (ΔE*), índice Chroma (C*) e ângulo hue (h*) foram calculados de acordo com as Equações 2, 3 e 4 respectivamente. Todos os parâmetros foram obtidos com três repetições e cinco replicatas.

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

$$C^* = \sqrt{[(a^*)^2 + (b^*)^2]} \quad (3)$$

$$h = \arctan(b^* \times a^{*-1}) \quad (4)$$

2.7 Análise estatística

Os experimentos foram realizados seguindo um delineamento inteiramente casualizado (DIC) com dois fatores em estudo, o raio iônico: 0,72 Ångstrom para o Magnésio e 1,00 Ångstrom para o Cálcio (Weller, Rourke, Overton, & Armstrong, 2017) e a FI do sistema de 0, 25, 50, 250 e 500 mM corrigido por meio da adição de CaCl_2 ou MgCl_2 . Foram ajustadas curvas de regressão e obtidos os parâmetros estatísticos de coeficiente de determinação ajustado (R^2_{aj}), falta de ajuste (F_{aj}), estimativas dos coeficientes do modelo por meio do teste t de Student. Os modelos ajustados foram compostos apenas pelos parâmetros significativos ($p < 0,05$). Todas as análises estatísticas foram realizadas com os programas MINITAB versão 17 e OriginPro 8.5.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Espectroscopia na região do infravermelho médio (ATR-FTIR)

As alterações no comportamento de absorção no infravermelho médio possibilitaram inferir sobre as interações intra e intermoleculares que ocorreram nos filmes de MC sob efeito dos diferentes raios iônicos e da FI do sistema ao incorporar CaCl_2 e MgCl_2 , sendo mostrado os espectros FTIR na Figura 1.

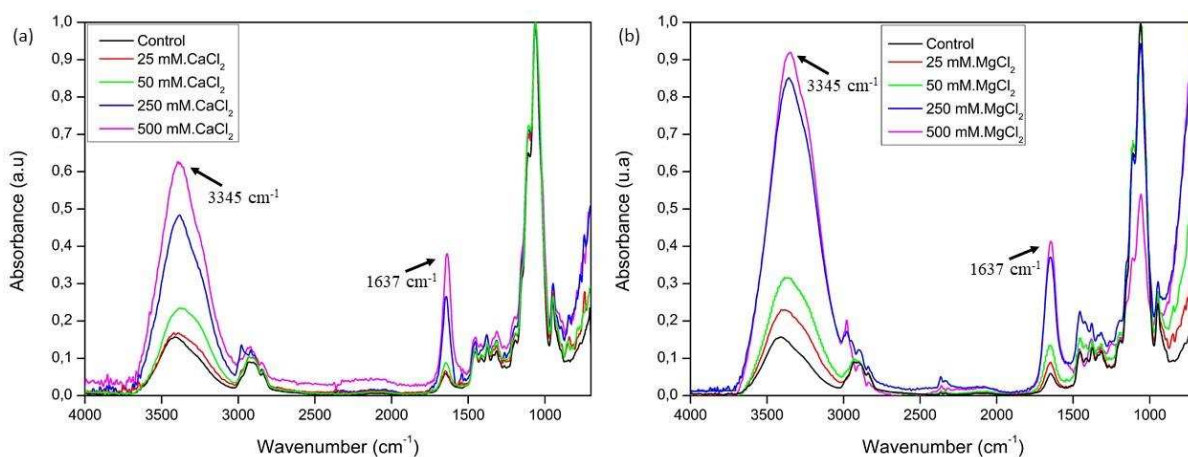


Figura 1. Espectros de FTIR dos filmes de MC com FI de 0, 25, 50, 250 e 500 mM corrigida com CaCl_2 (a) ou MgCl_2 (b).

O aumento da FI nos filmes contendo ambos sais provocou o aumento da intensidade e o deslocamento para comprimentos de ondas menores da banda de estiramento da ligação O-H situada entre 3000-3680 cm^{-1} . O deslocamento dessa banda para comprimento de ondas menores ocorreu devido à formação interações

intermoleculares do tipo íon-dipolo entre as hidroxilas da metilcelulose e os cátions dos sais dissociados e, como resultando, houve o enfraquecimento da ligação covalente O-H, o que reduziu a frequência de absorção. Aziz, Rasheed, & Ahmed (2017) também indicaram que formação de ligações de hidrogênio entre as hidroxilas da metilcelulose induzem o deslocamento dessa banda de absorção para comprimentos de ondas menores. Aliado a isso, o aumento da FI nos polímeros provocou o ganho significativo da intensidade do pico em 1637 cm^{-1} referente à deformação angular da água (Barbosa, 2007).

Esse ganho da intensidade do pico em 1637 cm^{-1} em função do efeito aditivo da FI é justificado pela hidratação dos íons presentes nos filmes e que provocou na maior quantidade de moléculas de água presentes na matriz polimérica. Esta descoberta foi confirmada com ajuda da TGA ao verificar que a perda de massa do solvente é de pelo menos 4,23 vezes maior nos filmes de 500 mM de ambos sais em relação ao filme controle. Além disto, foi verificada a maior intensidade dos picos referentes às hidroxilas para os filmes contendo íons de magnésio em relação ao Cálcio. Isso é justificado pelo menor raio iônico do Magnésio ($0,72\text{ Å}$) em relação ao Cálcio ($1,00\text{ Å}$) e devido a isso são obtidas diferentes energias de solvatação dos íons. Born (1920) mostrou que a energia de hidratação dos íons (ΔG_{born}) é influenciada linearmente com o inverso do raio iônico, mostrado na Equação 5.

$$\Delta G_{\text{born}} = -\frac{q^2}{2R\epsilon_0} \left(1 - \frac{1}{K}\right) \quad (5)$$

Em que q e R são a carga e raio do íon, respectivamente, ϵ_0 é permissividade do meio, e K é a constante dielétrica do meio.

Os demais picos presentes no espectro infravermelho não sofreram alterações significativas sob efeito dos tratamentos avaliados e, por isto, foram utilizados apenas para diagnóstico da presença dos constituintes nos filmes. Os picos na região entre $3000\text{-}2800\text{ cm}^{-1}$ são associados ao estiramento assimétrico de CH_3 de grupos alquilas da MC (Barbosa, 2007; Liebeck, Hidalgo, Roth, Popescu, & Böker, 2017). Entre os comprimentos de onda de $1300\text{ a }1500\text{ cm}^{-1}$ são associados os picos harmônicos do grupo éter e a deformação angular de C-H de alcanos presentes na MC. A região entre $1270\text{-}1030\text{ cm}^{-1}$ é associada a bandas de estiramento assimétrico de éteres e em

1180-1050 cm^{-1} ao estiramento simétrico de éteres, ambos presentes na MC (Barbosa, 2007).

3.2 Ângulo de contato (θ) e potencial zeta (ζ)

Uma das maneiras de caracterizar a hidrofobicidade dos filmes ou interação entre um líquido e um sólido é por meio do ângulo de contato (θ) entre as duas fases. Os resultados do ângulo de contato dos filmes com as curvas de regressão são mostrados na Figura 2.

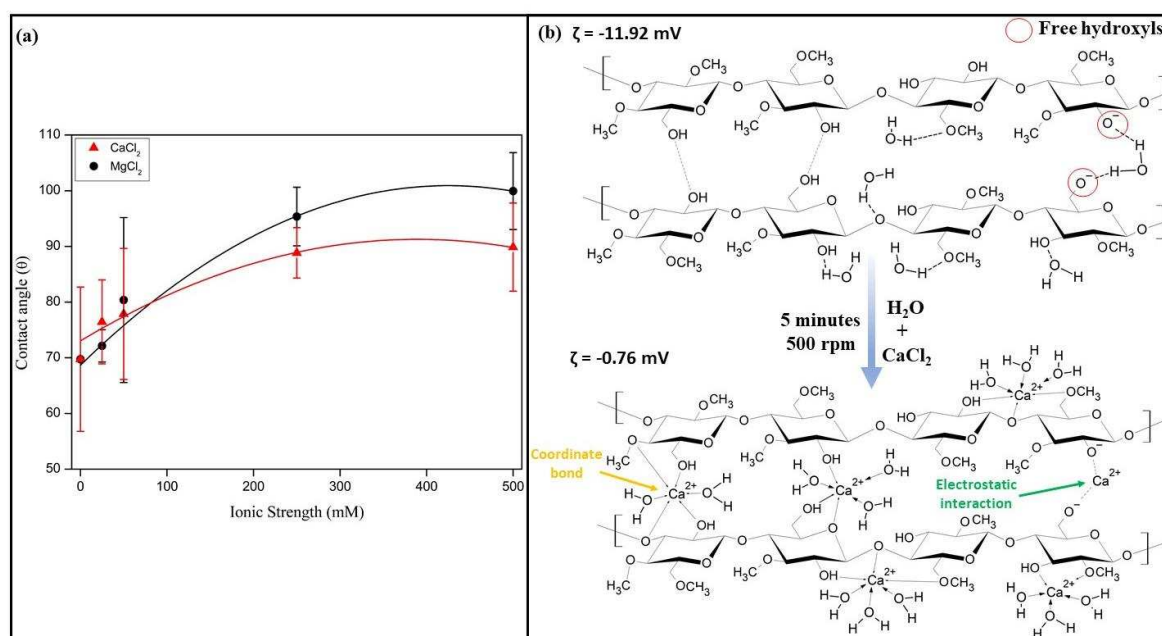


Figura 2. Curvas de regressão do ângulo de contato (θ) entre água e a superfície dos filmes de MC com FI de 0, 25, 50, 250 e 500 mM corrigida com CaCl_2 (vermelho) ou MgCl_2 (preto) (a) e (b) ilustração das estruturas de MC, água e Cálcio com indicação das ligações coordenadas (laranja), interações eletrostáticas (verde) e hidroxilas ionizadas (vermelho).

Foi verificado que o aumento da FI nos filmes de MC provocou o aumento do ângulo de contato, entre o filme e a gota d'água, sendo que a incorporação de concentrações de MgCl_2 para o desenvolvimento de FI $\geq 250 \text{ mM}$ do sistema alterou a superfície dos filmes de caráter hidrofílico para hidrofóbica, ou seja, o ângulo de contato foi maior que 90° . Razavi *et al.* (2019) verificaram o mesmo comportamento quando foram adicionadas concentrações crescentes de plastificantes hidrofílicos na matriz polimérica de filmes baseado em goma de sálvia e indicaram a redução de grupos hidrofílicos livres na superfície devido às interações dos grupos polares das

cadeias poliméricas com o plastificante. Esses mesmos autores também verificaram que as interações hidrofílicas entre polímero/plastificante reduziram as energias livres polar e dispersiva, tendo como resultado, a orientação de resíduos hidrofóbicos para a superfície dos filmes.

Duas causas podem ter contribuído para o aumento da hidrofobicidade superficial dos filmes, a indisponibilização dos grupos hidroxilas da MC para interação com moléculas de água na superfície do filme (1) e/ou a difusão do sal para as moléculas de água (2). A primeira causa está relacionada as interações intra (ligação coordenada) e intermoleculares (eletrostáticas) entre as hidroxilas e os cátions dissociados dos sais, conforme ilustrado na Figura 2b. O desenvolvimento de interações eletrostáticas é confirmado ao observar a redução em módulo do ζ negativo da suspensão de MC pura após a incorporação dos sais, o que promoveu a reticulação das cadeias de MC entre os cátions dos sais e os resíduos negativos da hidroxila (Tabela 1). Enquanto, as ligações coordenadas foram estabelecidas entre os cátions de Cálcio ou Magnésio, que possuem número de coordenação igual a seis, e os átomos com pares de elétrons não ligantes da MC como o oxigênio.

Tabela 1. Potencial Zeta da MC em solução aquosa com FI de 0, 25, 50, 250, 500 mM de CaCl_2 ou MgCl_2 .

Tratamento	Força Iônica (mM)	Potencial Zeta - ζ (mV)*
Controle	0	-11,92 ^b (1,60)
	25	-5,16 ^a (1,23)
	50	-1,73 ^a (1,44)
	250	-0,73 ^a (0,87)
	500	-0,63 ^a (0,28)
Controle	0	-11,92 ^c (1,60)
	25	-5,49 ^b (0,98)
	50	-2,29 ^{ab} (0,43)
	250	-1,97 ^a (0,10)
	500	-1,59 ^a (0,14)

* Valores em média com três repetições e desvio padrão (DP). Comparação realizada entre as forças iônicas de cada sal. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si, de acordo com o teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

A segunda causa foi relacionada a alteração do equilíbrio da relação de medida de tensões interfaciais entre a superfície do filme, a gota d'água e o ar atmosférico. No qual ocorre o aumento da tensão interfacial entre a gota d'água e a superfície do

filme por meio da difusão do sal para a gota d'água, o que provoca no rearranjo estrutural das moléculas de água por meio de novas interações (íon-dipolo) e, como consequência, aumentam a hidrofobicidade dos filmes. Portanto, acreditamos que esses sais podem ser considerados como novos aditivos de extrema importância com capacidade de modular a hidrofobicidade dos filmes, sendo úteis para ampliar as possibilidades de desenvolvimento de embalagens hidrofílicas para alimentos úmidos.

3.3 Análise termogravimétrica (TGA)

A Tabela 2 mostra as temperaturas dos eventos de degradação térmica da MC em pó, glicerol, dos filmes controle e contendo CaCl_2 e MgCl_2 com FI de 25, 50, 250 ou 500 mM. As curvas termogravimétricas de cada tratamento estão disponibilizadas no material suplementar (Figura 1sII).

Tabela 2. Eventos térmicos da MC em pó, glicerol e os filmes de MC com FI de 0, 25, 50, 250 e 500 mM corrigida com CaCl_2 ou MgCl_2 .

Tratamentos	Evaporação de solventes		Degradação térmica do glicerol		Degradação térmica da MC	
	$T_{\text{máx}}$ (°C)	% LW	$T_{\text{máx}}$ (°C)	% LW	$T_{\text{máx}}$ (°C)	% LW
Metilcelulose	35,36	5,62	-	-	351,34	80,14
Glicerol	59,83	3,77	200,96	95,37	-	-
0 mM - Controle	47,70	6,62	180,71	14,96	350,76	64,70
25 mM - CaCl_2	59,85	7,08	223,64	10,21	298,67	56,59
50 mM - CaCl_2	50,85	8,29	216,45	9,21	293,51	52,24
250 mM - CaCl_2	53,38	23,37	214,41	6,01	273,21	39,22
500 mM - CaCl_2	59,39	28,03	210,54	7,50	267,07	24,86
25 mM - MgCl_2	50,24	10,83	246,60	19,60	303,25	60,60
50 mM - MgCl_2	39,63	16,91	245,74	19,10	284,37	57,92
250 mM - MgCl_2	57,45	28,88	193,13	15,97	262,60	43,39
500 mM - MgCl_2	54,31	32,37	192,05	12,75	202,02	40,71

* % LW: Perda de massa; $T_{\text{máx}}$: Temperatura de máxima degradação.

O primeiro evento de perda de massa é referente à evaporação de voláteis e, principalmente, da água que foi utilizada como solvente nos filmes (Lin, Wang, Wei, & Li, 2007). Neste evento, a perda de massa em qualquer FI dos filmes com MgCl_2 foi maior do que nos filmes com CaCl_2 , o que indica a maior presença de água, como também evidenciado no FTIR. O segundo evento está relacionado com a temperatura

de degradação do plastificante glicerol, sendo observado que a interação entre glicerol-MC no filme controle reduziu a temperatura de máxima degradação do plastificante em aproximadamente 20 °C, como também verificado por Yunos & Rahman (2011).

A temperatura de máxima degradação térmica do polímero MC (pirólise térmica) foi reduzida de 350 °C no controle para 267 °C e 202 °C nos filmes com 500 mM da FI de CaCl_2 ou MgCl_2 , respectivamente. Foi visto que o acréscimo da FI contribuiu para o aumento da quantidade de moléculas de água no filme e, que por sua vez, atuaram como plastificante diminuindo as interações entre MC-MC. Segundo Junior (2002) a atração de moléculas de água entre as ligações covalentes na cadeia principal da MC, como carbono-carbono ou funções éteres, provocam a redução da temperatura de degradação térmica devido as reações de cisão de cadeia aleatória catalisada pela hidrólise e, como resultado, obtém-se a redução da massa molar do polímero. Isso explica a maior estabilidade térmica dos filmes com CaCl_2 em relação aos filmes com MgCl_2 , visto que nos filmes contendo cálcio há menor quantidade de moléculas de água, o que, também, provoca no menor efeito plastificante nos filmes de MC. Portanto, por meio desses resultados da TGA confirmamos que a força e o raio iônico dos sais são fatores que governam o comportamento de absorção de água em filmes de MC.

3.4 Calorimetria diferencial exploratória (DSC)

A atuação indireta dos sais como promotores da ação plastificante, também, foi comprovada por meio da redução da temperatura de fusão dos cristalitos de MC em função do acréscimo da FI. Segundo Junior (2002), o fator externo ao polímero que mais influência os valores da temperatura de fusão (T_m) é a presença de plastificantes adicionados ou naturalmente absorvidos, como é no caso da água.

As curvas de DSC dos filmes de MC são mostradas na Figura 3 e foi verificado que a temperatura de fusão do filme controle foi alterada de 194,05 °C para 162,32 °C e 160,55 °C nos filmes contendo 500 mM de CaCl_2 e MgCl_2 , respectivamente. Filipini, Romani & Martins (2020) relataram valores semelhantes da T_m dos filmes de MC incorporado com diferentes concentrações de extrato de jambolão e, também, indicaram que a modificação das propriedades térmicas aconteceram em consequência das novas interações formadas entre o extrato e a matriz polimérica.

Além do efeito plastificante, verificamos que os filmes contendo 50 mM de CaCl_2 apresentaram maior temperatura de fusão do que os filmes contendo 25 mM. Isso pode confirmar a formação de reticulação entre as cadeias poliméricas de MC promovida por interações eletrostáticas e ligações coordenadas, conforme sugerido na Figura 2b.

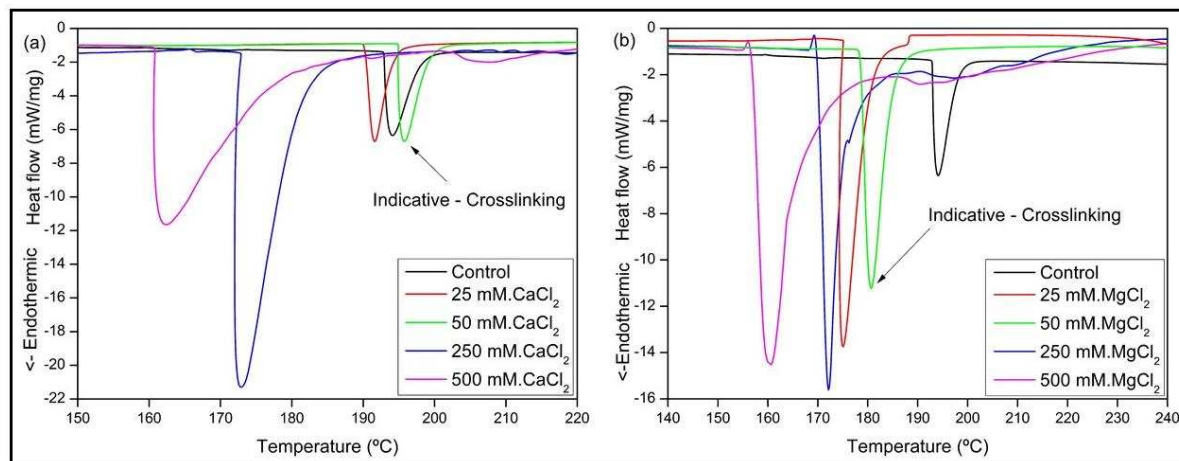


Figura 3. Curvas de DSC dos filmes de MC com FI de 0, 25, 50, 250 e 500 mM corrigida com CaCl_2 (a) ou MgCl_2 (b).

A confirmação do efeito plastificante provocado pela incorporação da FI ≥ 250 mM de CaCl_2 ou MgCl_2 em MC surge como potencial aditivo para substituição de outros plastificantes não seguros para o ser humano, como os ftalatos que são associados a problemas de saúde humana incluindo infertilidade, alergias e câncer (Crinnion, 2010). Novos estudos são necessários sobre o impacto desses sais nas propriedades mecânicas, térmicas, de barreira e exsudação em outras matrizes poliméricas, biodegradáveis ou não, para confirmar aplicação como plastificantes seguros. Em especial destacamos o CaCl_2 , pois nos processos de exsudação do cálcio para alimentos, como a migração, por meio das embalagens plásticas não é preocupante, visto que o Cálcio é um micronutriente essencial para dieta humana e pode prevenir e/ou tratar osteoporose e síndrome metabólica, sendo frequentemente descrito com ingestão insuficiente para quase toda a população humana (Muscariello *et al.*, 2020).

3.5 MEV e Perfilometria

A morfologia, topografia e rugosidade média (R_a) foram avaliadas por meio da MEV e perfilometria (Figura 4). As imagens da seção transversal dos filmes, indicaram que não houve a separação de fase do plastificante e que a dispersão das cadeias

poliméricas foi melhorada com o aumento da FI do sistema, uma vez que aglomerados de MC e rachaduras foram reduzidos (Figura 4C, E). Roşu *et al.* (2017) também verificaram estruturas semelhantes de rede fibrosa da celulose como mostrado nas Figura 4A, B, D.

O aumento da dispersão das cadeias poliméricas também pode contribuir na redução do módulo de elasticidade e no aumento da elongação percentual dos filmes (conforme verificado nos ensaios mecânicos), uma vez que as forças de interações entre polímeros são reduzidas. A Ra aumentou de 2500 nm do filme controle para 3670 e 3680 nm nos filmes com CaCl_2 e MgCl_2 , respectivamente (Figura 4F). Bataglioli *et al.* (2019) relataram comportamento semelhante, ou seja, criação de superfícies irregulares de acordo com o aumento da concentração de NaCl em filmes de carboximetilcelulose com quitosana. Dubas & Schlenoff (1999) sugeriram que a modificação da rugosidade acontece por meio mudanças conformacionais lentas na superfície da cadeia polimérica assumida em ambientes com maior força iônica.

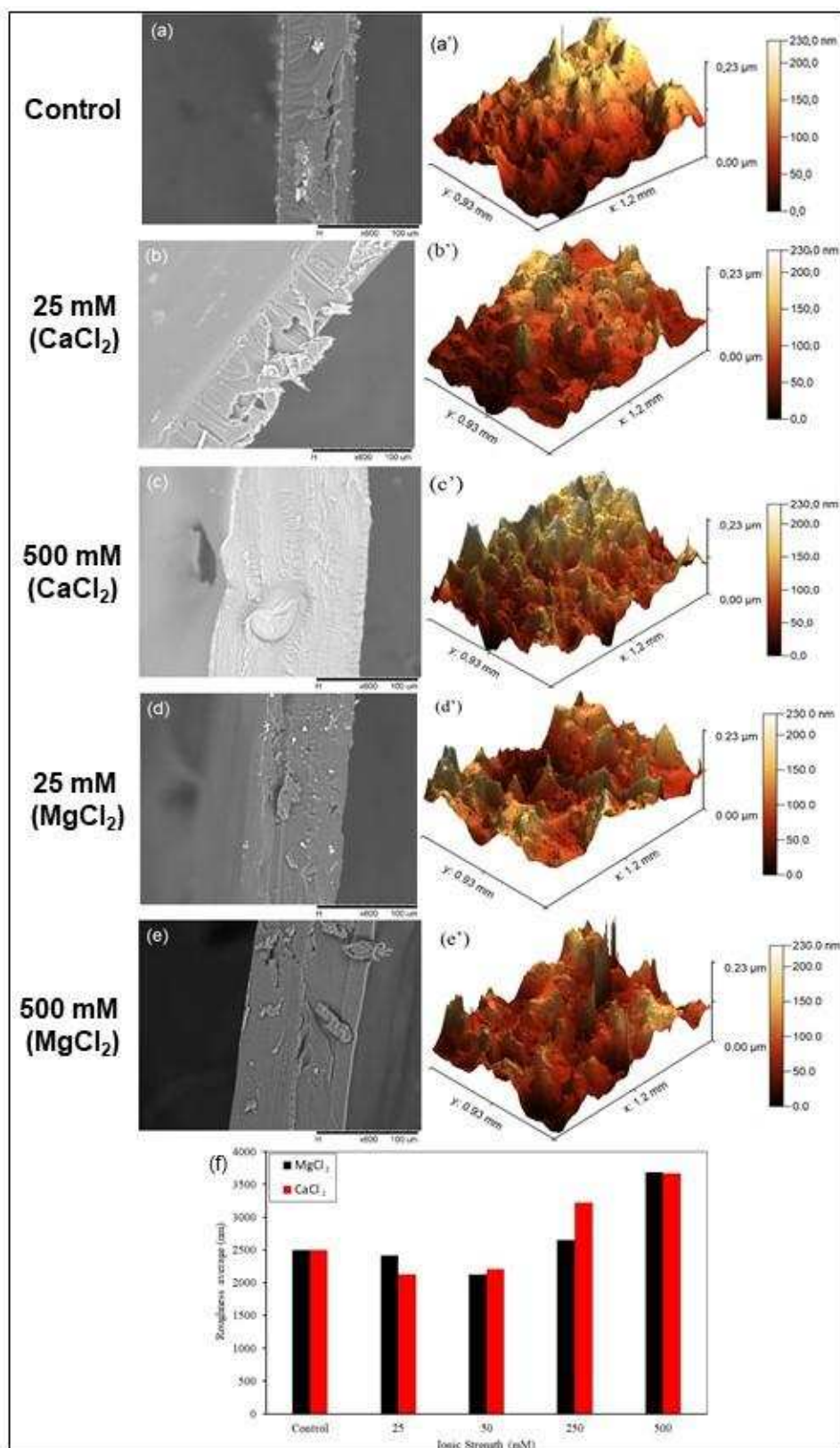


Figura 4. Imagens da MEV dos filmes com magnificação de 600x: a: Controle, b: 25 mM CaCl_2 , c: 500 mM CaCl_2 , d: 25 mM MgCl_2 , e: 500 mM MgCl_2 . 3D micrografias de perfilometria dos filmes: a': Controle, b': 25 mM CaCl_2 , c': 500 mM CaCl_2 , d': 25 mM MgCl_2 , e': 500 mM MgCl_2 . f: Gráfico de barras da rugosidade média (R_a) dos filmes.

Deve-se destacar que os polímeros de quitosana apresentam resíduos carregados e, portanto, são fortemente influenciados por íons em solução, o que propicia essas alterações no espaço conformacional dos ângulos glicosídicos do polímero e, por conseguinte, possíveis irregularidades na superfície do filme (Esteban, *et al.*, 2018). Acreditamos que, ao contrário do efeito relatado nos filmes de quitosana, o aumento da Ra nos filmes de MC, em destaque para os filmes com 250 ou 500 mM de FI, foi decorrente das diferentes taxas de evaporação do solvente, o que desenvolveu superfícies irregulares como as observadas nas Figuras 4D, E. Essas diferenças nas taxas de evaporação são associadas ao desenvolvimento de interações íon-dipolo entre os sais dissociados e a água, o que elevam a temperatura de evaporação do solvente. Nos filmes com 25 ou 50 mM de FI não foi observada esse mesmo comportamento de aumento da rugosidade em relação ao controle, o que justifica nossa teoria de reticulação das cadeias de MC, pois provavelmente a maioria dos íons dissociados reticulam a cadeia polimérica e poucos íons remanescentes interagem com as moléculas de água.

3.6 Transmitância dos filmes

A transmitância dos filmes pode indicar a qualidade de dispersão das cadeias poliméricas, cristalinidade e presença de aditivos (Turhan & Şahbaz, 2001). O acréscimo da FI do sistema ao incorporar ambos sais reduziu a transmitância dos filmes ao longo de todo o espectro (200 a 800 nm), o que é justificado devido ao aumento significativo da espessura e que, por sua vez, contribui para o maior desvio de luz em todo o espectro. Na Figura 5 mostramos que o tipo de cátion é uma propriedade que influencia diretamente na dispersão de luz, visto que a incorporação dos íons com menor raio iônico (Mg^{+2}) apresentaram menor dispersão de luz em relação a íons com maior raio iônico (Ca^{+2}). Confirmamos a dispersão efetiva dos sais ao longo da matriz polimérica de MC, uma vez que aglomerados dispersam fortemente a luz (Saha, *et al.*, 2016). Aziz, Rasheed, & Ahmed, (2017) incorporaram o mineral CuS e também verificaram a redução da intensidade de transmitância dos filmes de MC, o que justificou pelo alto índice de refração gerado por esses nanocompósitos.

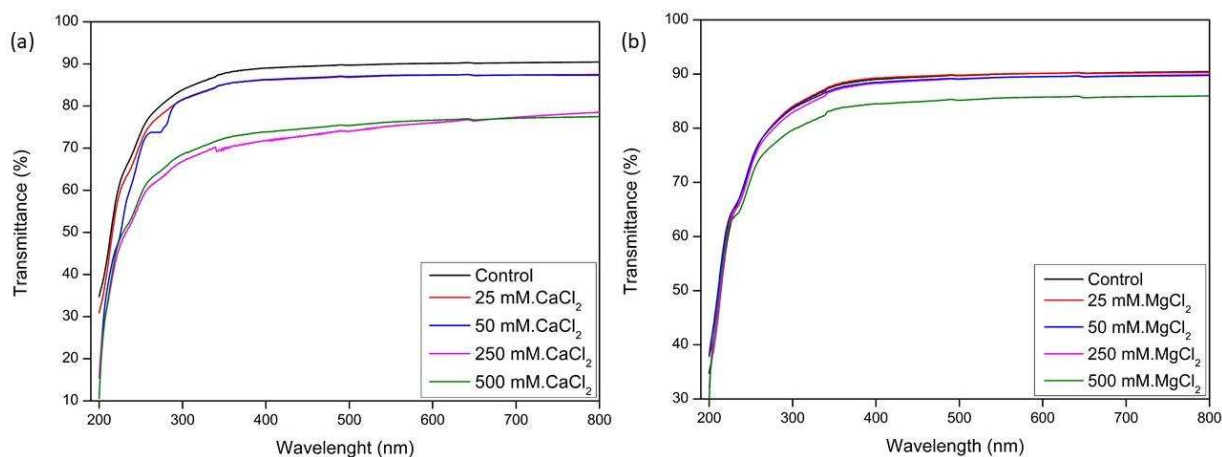


Figura 5. Transmitância dos filmes de MC com 0, 25, 50, 250 e 500 mM corrigida com CaCl_2 (a) ou MgCl_2 (b).

3.7 Espessura e propriedades mecânicas

Os resultados e as curvas de regressão da espessura (Figura 6a), propriedades mecânicas de TS (Figura 6b), YM (Figura 6c) e EB (Figura 6d) dos filmes em função da FI nesse sistema ao incorporar concentrações crescentes de CaCl_2 ou MgCl_2 são mostrados na Figura 6. Os modelos matemáticos ajustados e os parâmetros estatísticos estão disponibilizados na Tabela 1sl e 2sl do material suplementar.

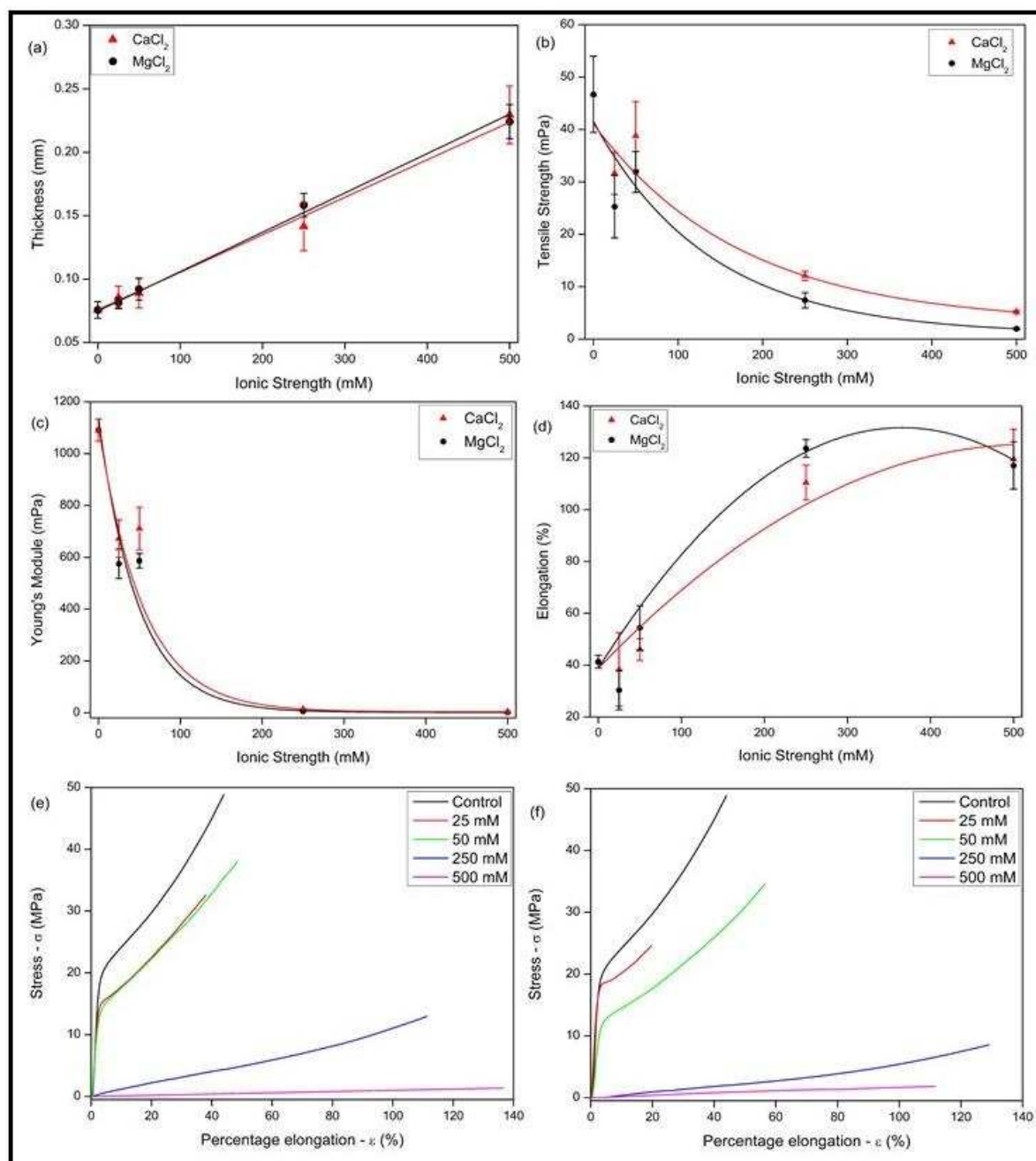


Figura 6. Curvas de regressão para a espessura (a), resistência a tração (b), módulo de Young (c) e elongação percentual até a ruptura (d) dos filmes de MC com FI de 0, 25, 50, 250 e 500 mM corrigida com CaCl₂ (vermelho) ou MgCl₂ (preto). Curvas de tensão por elongação percentual dos filmes de MC com CaCl₂ (e) ou MgCl₂ (f).

O efeito aditivo da FI do sistema desenvolvida ao incorporar concentrações de CaCl₂ ou MgCl₂ nos filmes provocou no aumento da espessura e da EB, enquanto a TS e o YM foram reduzidos. A influência da FI é justificada pela atuação indireta dos íons como plastificantes após a absorção e retenção de água na matriz polimérica.

Junior (2002) indicou que a atuação da água como plastificante ocorre devido às interações do tipo L.H entre as hidroxilas da água e os grupos oxigenados da matriz polimérica, o que provoca a redução da TS, YM e o aumento da EB. A comparação entre os diferentes raios iônicos nos filmes indicou que o $MgCl_2$ proporcionou maior EB e menor TS e YM em relação aos filmes com $CaCl_2$. Isto é justificado pela maior quantidade de moléculas de água presentes na matriz polimérica, conforme visto na Figura 1, tendo a redução das interações entre MC-MC e a maior mobilidade das cadeias poliméricas adjacentes.

Ao aumentar a FI de 25 mM para 50 mM nos filmes de MC e contendo qualquer sal, verificamos o aumento da TS e o aumento, porém não significativo, da rigidez do filme (YM). Entretanto, era de se esperar que os valores de TS e YM fossem reduzidos, assim como acontece após o aumento da FI de 50 para 250 mM e depois até 500 mM. Isso pode ser observado com maior facilidade por meio das curvas de tensão x deformação dos filmes (Figuras 6 e, f). Acreditamos que na região de FI próxima a 50 mM são estabelecidas forças intra e intermoleculares como interações eletrostáticas e ligações coordenadas e que resultam na alteração dessas propriedades mecânicas. O desenvolvimento de interações eletrostáticas é confirmado ao observar a redução em módulo do ζ negativo da suspensão de MC pura após a incorporação dos sais, o que promoveu a reticulação das cadeias de MC entre os cátions dos sais e os resíduos negativos da hidroxila, conforme ilustrado na Figura 2b. Enquanto, as ligações coordenadas foram estabelecidas entre os cátions de Cálcio ou Magnésio, que possuem número de coordenação igual a seis, e átomos com pares de elétrons não ligantes como o oxigênio.

Sugerimos que a região da FI próxima a 50 mM são valores que potencializam a formação da reticulação entre as cadeias de MC, tendo em vista o aumento da TS e YM em relação aos filmes com 25 mM e que, nestes, a insuficiência de cátions pode ter limitado a formação das reticulações. Esse aumento da TS e YM pode ser derivada da formação de estruturas contínuas que são mantidas por meio das interações ocorridas na reticulação e no qual o estresse mecânico aplicado pode ser distribuído de forma mais uniforme, o que evita a sobrecarga de alguma região e consequente rompimento das interações existentes.

De forma análoga, Salari, Khiabani, Mokarram, Ghanbarzadeh, & Kafil verificaram que a incorporação de nanocristais de celulose bacteriana (BCNC) nos

filmes de quitosana aumentaram a YM e TS, sendo justificado por meio da dispersão homogênea dos BCNC e das interações estabelecidas ao longo da cadeia polimérica, melhorando a transferência efetiva de carga. Enquanto, a redução da TS e YM nos filmes com FI $\geq$ 250 mM ocorrem por meio do efeito plastificante ocasionado pela maior absorção de moléculas de água na matriz polimérica. Isso é corroborado ao observar que o aumento da FI de 50 até 500 mM nos filmes indicam um comportamento constante e direcional para redução da TS e aumento da EB.

Confirmamos que as diferenças das propriedades mecânicas supracitadas podem ser atribuídas a FI e raio iônico das substâncias inorgânicas higroscópicas presentes na matriz polimérica. A descoberta de que a FI e o raio iônico alteram as interações entre as cadeias poliméricas podem contribuir para novas pesquisas com o intuito de reduzir as fortes interações entre aditivos-polímero e modelar a taxa de difusão de substâncias ativas. Tunç & Duman (2011) confirmaram que isso pode ser feito ao mostrar que o aumento da concentração de um outro aditivo (Argila Montmorilonita) no polímero de MC reduziu a liberação controlada de carvacrol em embalagens ativas.

3.8 Propriedades a barreira

Uma das principais propriedades dos filmes biodegradáveis para aplicação como embalagens de alimentos é a capacidade de evitar mecanismos de transferência de massa. Wang *et al.* (2018) desenvolveu uma classificação para avaliação da qualidade de barreira de filmes e, independentemente do tipo de tratamento realizado neste trabalho, os filmes foram classificados como alta barreira a PO₂ e pobre propriedade a barreira ao vapor d'água. A permeabilidade ao oxigênio de qualquer filme desenvolvido neste trabalho foi menor do que outros plásticos comumente utilizados, como: tereftalato de polietileno (PET), poliamida (PA), polietileno de alta densidade e baixa densidade (HDPE e LDPE), polivinil álcool (PVC) e polipropileno (PP).

A permeabilidade de gases ou vapores através de um filme é dívida em três etapas, a sorção (1) relacionada ao contato do permeante com a superfície do polímero (adsorção) e a conseguinte penetração na superfície (absorção), depois ocorre a difusão (2) do permeante através do filme por meio do gradiente de concentração e, por último, a dessorção (3) por meio da evaporação ou difusão do

permeante da outra extremidade do material para o ambiente (Robertson, 2012). Para determinação do coeficiente de permeabilidade (P) através de um filme no qual o sistema encontra-se em estado estacionário, ou seja, a quantidade de matéria que atravessa a área transversal do material ao longo do tempo é constante, pode ser calculado por meio do produto entre o coeficiente de solubilidade (S) e o coeficiente de difusão (D) do permeante (Junior, 1984).

Sugerimos que o comportamento da PO_2 e WVP nos diferentes tipos de filmes ao incorporar sais divalentes é justificada pela variação do S e D, conforme mostrado na Figura 7. O aumento do coeficiente de solubilidade do oxigênio, por exemplo, acontece ao aumentar a área superficial do filme e, também, ao apresentar forças intermoleculares compatíveis com a superfície do material, como o aumento da hidrofobicidade na superfície. Os valores do coeficiente de difusão podem ser reduzidos por meio de reticulações que provocam caminhos tortuosos ao permeante ou aumentado por meio da incorporação de plastificantes, como a água, que contribuem a maior movimentação das cadeias poliméricas e, conseqüente, formação de espaços vazios. Com base na compreensão do efeito desses fatores na permeabilidade e nos resultados de caracterização dos filmes de MC, indicamos indiretamente a ordem dos valores de cada etapa de permeabilidade ao oxigênio (adsorção, difusão e dessorção) dos plásticos de MC em função da FI e que contribuem para o entendimento dos valores de PO_2 obtidos por análise instrumental.

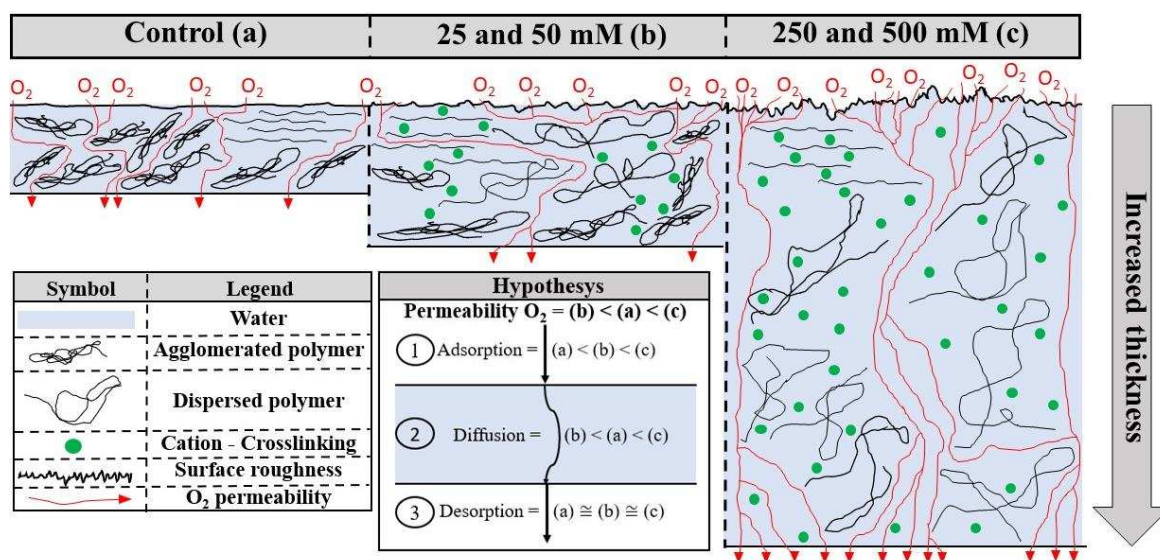


Figura 7. Ilustração dos fatores que influenciam nos mecanismos de adsorção, difusão e dessorção de oxigênio nos filmes de MC com FI de 0, 25, 50, 250 ou 500 mM.

Os valores de PO_2 e WVP dos filmes de MC em função do efeito aditivo da FI do sistema promovida ao incorporar $CaCl_2$ ou $MgCl_2$ e a curva de regressão ajustada são mostrados na Figura 8A e 8B, respectivamente. A incorporação de $CaCl_2$ ou $MgCl_2$ com o aumento da FI nos filmes provocou na redução da barreira de PO_2 e da WVP. A hipótese sobre a formação da reticulação entre as cadeias de MC promovida pelos cátions dos sais incorporados é corroborada ao verificar a menor PO_2 e WVP dos filmes com FI ≤ 50 mM. Tendo em vista que as ligações coordenadas e interações eletrostáticas podem contribuir para formação de caminhos tortuosos e, portanto, reduzem a velocidade de difusão e transferência de massa ao longo da matriz polimérica (Gill, Abid, & Song, 2020).

O ganho da PO_2 nos filmes com o aumento gradativo da FI após 50 mM foi atribuído ao aumento do volume livre ocasionado pela absorção de moléculas de água nos filmes e que, também, provocou na maior permeabilidade dos filmes com $MgCl_2$ em relação ao $CaCl_2$ (Bonnaillie, Zhang, Akkurt, Yam, & Tomasula, 2014; Lieberman, & Gilbert, 1973). Segundo Slavutsky *et al.* (2014) a permeação do gás depende da difusividade que é relacionada à dificuldade na passagem de moléculas de oxigênio através da matriz polimérica e, portanto, a difusividade será favorecida quanto maior for o volume livre.

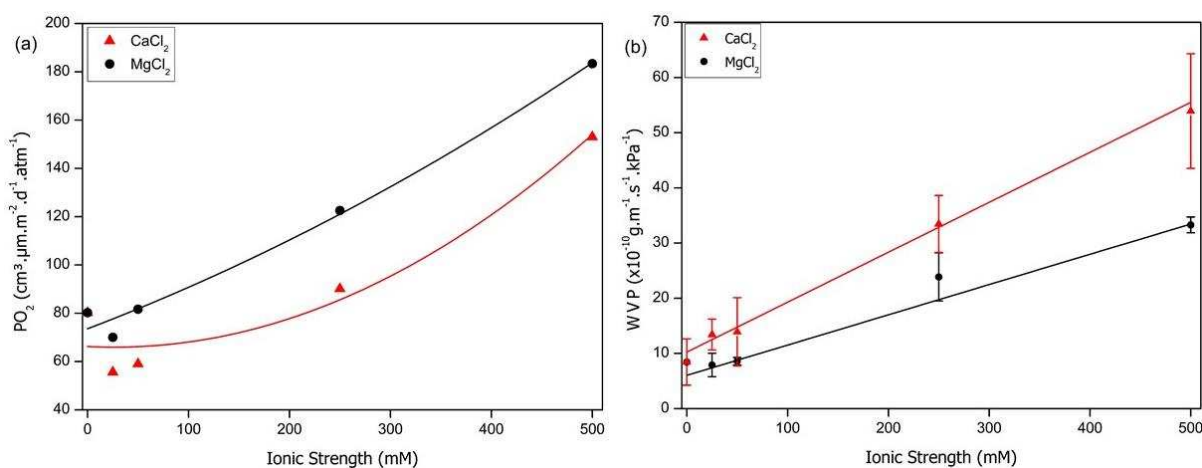


Figura 8. Curvas de regressão para a permeabilidade ao oxigênio (a) e a vapor d'água (b) dos filmes de MC com FI de 0, 25, 50, 250 e 500 mM corrigida com $CaCl_2$ (vermelho) ou $MgCl_2$ (preto).

A difusividade e a solubilidade das moléculas de água através da matriz polimérica são os principais fatores de influência para a WVP (Kalkan, Otağ, & Engin, 2020). O efeito aditivo da FI aumentou a WVP devido ao aumento do número de moléculas de água contribuindo para a maior velocidade de difusão do vapor d'água. Aliado a isso, mostramos que o ganho da FI aumenta a Ra e, por sua vez, eleva a área de contato com componentes externos, o que aumenta a permeabilidade na primeira etapa do processo, ou seja, a adsorção de vapor d'água na superfície do filme.

A maior barreira à WVP dos filmes contendo $MgCl_2$, em relação aos filmes com $CaCl_2$ ocorre pelo aumento do caráter hidrofóbico da superfície dos filmes, como mostrado no experimento de ângulo de contato. Liu *et al.* (2018) também indicaram que o aumento da hidrofobicidade dos filmes dificultou a permeação das moléculas de água nos filmes de MC. Apesar do efeito aditivo da FI aumentar a WVP e PO_2 , os filmes desenvolvidos neste trabalho cumpriram com os requisitos de barreira propostos por Wang *et al.* (2018) para aplicação como embalagens para carne, queijo, frutas, vegetais e/ou saladas.

3.9 Impacto da incorporação de sais em sensores colorimétricos

3.9.1 Espectro de absorção no UV-Vis do APE

As cores produzidas pelo APE em solução com variação do pH entre 2 ao 13 são mostradas na Figura 9a e os espectros de absorção no UV-Vis na Figura 9b. No pH 2, o APE tornou-se rosa com comprimento de onda de máxima absorbância ($\lambda_{m\acute{a}x}$) em 512 nm. O aumento da alcalinidade até o pH 4 reduziu a intensidade de absorção, enquanto no pH 5 houve um maior espalhamento de luz ao longo de todo o espectro e sem alterações significativas no $\lambda_{m\acute{a}x}$. Quando o pH aumentou de 5 para 9 houve o deslocamento batocrômico gradual do $\lambda_{m\acute{a}x}$ para 580 nm, o que proporcionou cores com baixa saturação. Nos pHs 10 e 11 a cor mudou para o marrom escuro e houve a redução da intensidade de absorção com a perda do formato de um pico característico (achatamento da curva). Nos pHs 12 e 13 a cor aproximou-se do marrom claro com a redução da intensidade de absorção, o que ficou evidente o direcionamento para à cor amarela devido a formação das estruturas *cis*-chalcona e *trans*-chalcona como principais espécies nessa região de pH (Basílio & Pina, 2016).

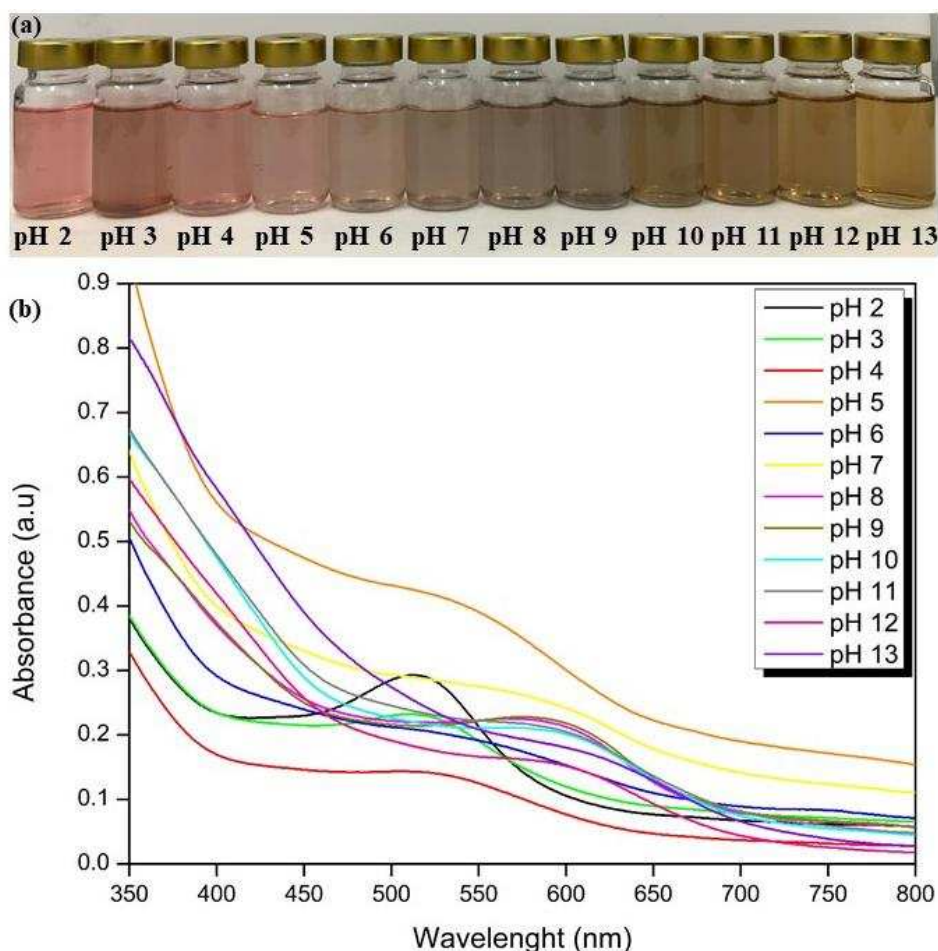


Figura 9. Fotografia do APE em solução aquosa no pH 2 ao 13 (a) e os espectros de absorção no UV-Vis (b).

3.9.2 Alteração colorimétrica dos sensores por detecção de NH_3

A exposição dos sensores a NH_3 durante 30 minutos provocou comportamentos colorimétricos diferenciais em função da FI do sistema e do raio iônico do cátion (Figura 10). Foram verificados a ampliação do espectro de cores e o aumento da sensibilidade dos sensores de acordo com o efeito aditivo da FI do sistema e da incorporação de cátions com menor raio iônico (Magnésio) nos filmes. O ganho de sensibilidade a NH_3 pelos sensores é justificado por dois fatores relativos ao aumento da FI: acréscimo da quantidade de moléculas de água no sensor e pelo aumento do efeito plastificante.

O aumento do efeito plastificante nos filmes de MC contribui para a maior mobilidade de aditivos hidrofílicos presentes na matriz polimérica, pois eleva a dispersão desses aditivos e ocorre o acréscimo do volume livre (Wypych, 2017). Esses efeitos facilitam a interação das antocianinas com fatores extrínsecos ao sensor como

as espécies básicas. Dessa forma, nas matrizes com maior volume livre é esperado o maior do coeficiente de difusão das espécies básicas provocando a maior interação com as antocianinas e, como resultado, têm-se o ganho de sensibilidade dos sensores em ordem crescente de FI ($0 < 25 < 50 < 250 < 500$ mM).

Treatment	Ionic Strength	Time (Minutes)						
		0	2	5	10	15	20	30
Control	0 mM							
CaCl ₂	25 mM							
MgCl ₂								
CaCl ₂	50 mM							
MgCl ₂								
CaCl ₂	250 mM							
MgCl ₂								
CaCl ₂	500 mM							
MgCl ₂								

Figura 10. Fotografias dos sensores contendo 0, 25, 50, 250 ou 500 mM corrigida com CaCl₂ ou MgCl₂ no tempo inicial e após a exposição de NH₃ ao longo de 30 minutos.

O aumento da quantidade de moléculas de água é o segundo fator que contribui para o ganho da sensibilidade, tendo em vista o deslocamento da Reação 1 no sentido dos produtos, de acordo com o princípio de Le Chatelier. Esse deslocamento promove a formação do ambiente alcalino (OH⁻) e, portanto, altera o equilíbrio dinâmico entre as espécies de antocianinas. As cores produzidas pelas antocianinas são resultantes das combinações entre espécies: base quinoidal (violeta ao azul), cátion flavílio (vermelho), pseudo-base carbinol ou hemiacetal (incolor), cis-chalcona e trans-chalcona (amarelo e/ou incolor) (Brooks, & Celli, 2019).



A incorporação de cátions com menor raio iônico (Mg^{+2} em relação ao Ca^{+2}) reduziu a variação nos tipos de cores desenvolvidas pelos sensores após a exposição de 30 minutos com NH_3 . Nos sensores com 500 mM de CaCl_2 houve alteração da cor púrpura ao violeta, depois ao azul até o verde acinzentado. Enquanto, nos sensores contendo MgCl_2 a cor modificou de púrpura a diferentes tons de verde sem produzir as cores violeta ou azul. Esse comportamento diferencial pode ser justificado por meio da formação de específicos copigmentos ternários ou complexos de metaloantocianinas que contribuem para o deslocamento do comprimento de máxima absorção e estabilidade das antocianinas (Dangles, Elhabiri, & Brouillard, 1994). Yoshida *et al.* (2015) indicaram que o raio do iônico e a força de coordenação do íon metálico são propriedades que influenciam nos modos de empilhamento molecular dos copigmentos e, portanto, afetam no desenvolvimento da cor e na estabilidade das antocianinas.

Os sensores contendo $\text{FI} \leq 50$ mM de MgCl_2 não foram capazes de produzir cores próximas ao verde mesmo após 30 minutos de contato com NH_3 , de tal forma, como foi observado nos sensores com FI de 250 e 500 mM. Yoshida, Mori, & Kondo (2009) mostraram que existe uma razão estequiométrica mínima entre o metal e as antocianinas para a formação de copigmentos ou metaloantocianinas. Portanto, isso indica que a formação dessas estruturas supramoleculares contendo íons de magnésio nos sensores necessita de FI com valores superiores a 50 mM. Uma vez, que ao variar o pH dos sensores com $\text{FI} \leq 50$ mM foi observado cores semelhantes a aquelas produzidas pelas antocianinas em solução aquosa e, portanto, indica que não houve a formação de copigmentos ou metaloantocianinas (Figura 9).

Verificamos que a presença dos íons de Magnésio contribuiu para a maior velocidade de alteração colorimétrica nos sensores em relação aos íons de cálcio. Visto que a coordenada colorimétrica a^* possui tendência de estabilização dos valores de -2,5 em 10 minutos nos sensores com MgCl_2 contra 15 minutos nos sensores com CaCl_2 (Figura 10a, b). Essa maior sensibilidade dos sensores com íons de magnésio é justificada por meio da equação de Born, pois esses íons possuem maior energia de hidratação em relação aos íons de cálcio e, portanto, retém maiores quantidades de moléculas de água na matriz polimérica (conforme observado na Figura 1).

A saturação das cores (C^*) nos sensores apresentou comportamento de redução dos seus valores, o que era esperado tendo em vista o equilíbrio de novas espécies que apresentam cores distintas e corroboram para a redução da pureza da cor (Figura 11c, d). Os valores da coordenada colorimétrica b^* não apresentaram comportamento suficiente para compreensão ou ajuste de modelos matemáticos em função do tempo de contato com NH_3 e, portanto, não foram disponibilizados.

A partir dos valores calculados do ângulo hue, confirmamos que as cores produzidas pelos sensores com MgCl_2 em contato com NH_3 durante 30 minutos alcançaram a região do verde ($h^* = 118,09$). Enquanto, nos sensores com CaCl_2 os valores de h^* não ultrapassaram $167,56^\circ$ (Tabela 3sl e 4sl do material suplementar). Mollaamin, & Monajjemi (2020) mostraram que o metal com menor raio iônico e mesma carga elétrica (Fe^{+3} em relação ao Ga^{+3}) também produziu maior frequência e deslocamento de absorção da radiação. Apesar da maior variação do ângulo hue produzido pelos sensores com Mg^{+2} , observamos na Figura 10 que os sensores com Ca^{+2} produziram a maior variedade de cores ao longo do tempo de contato com NH_3 . O comportamento desses sensores com CaCl_2 pode ser mais apropriado para aplicações de monitoramento da qualidade de alimentos, uma vez que classificações podem ser correlacionadas entre as diversas cores produzidas e o nível de NH_3 liberado no ambiente.

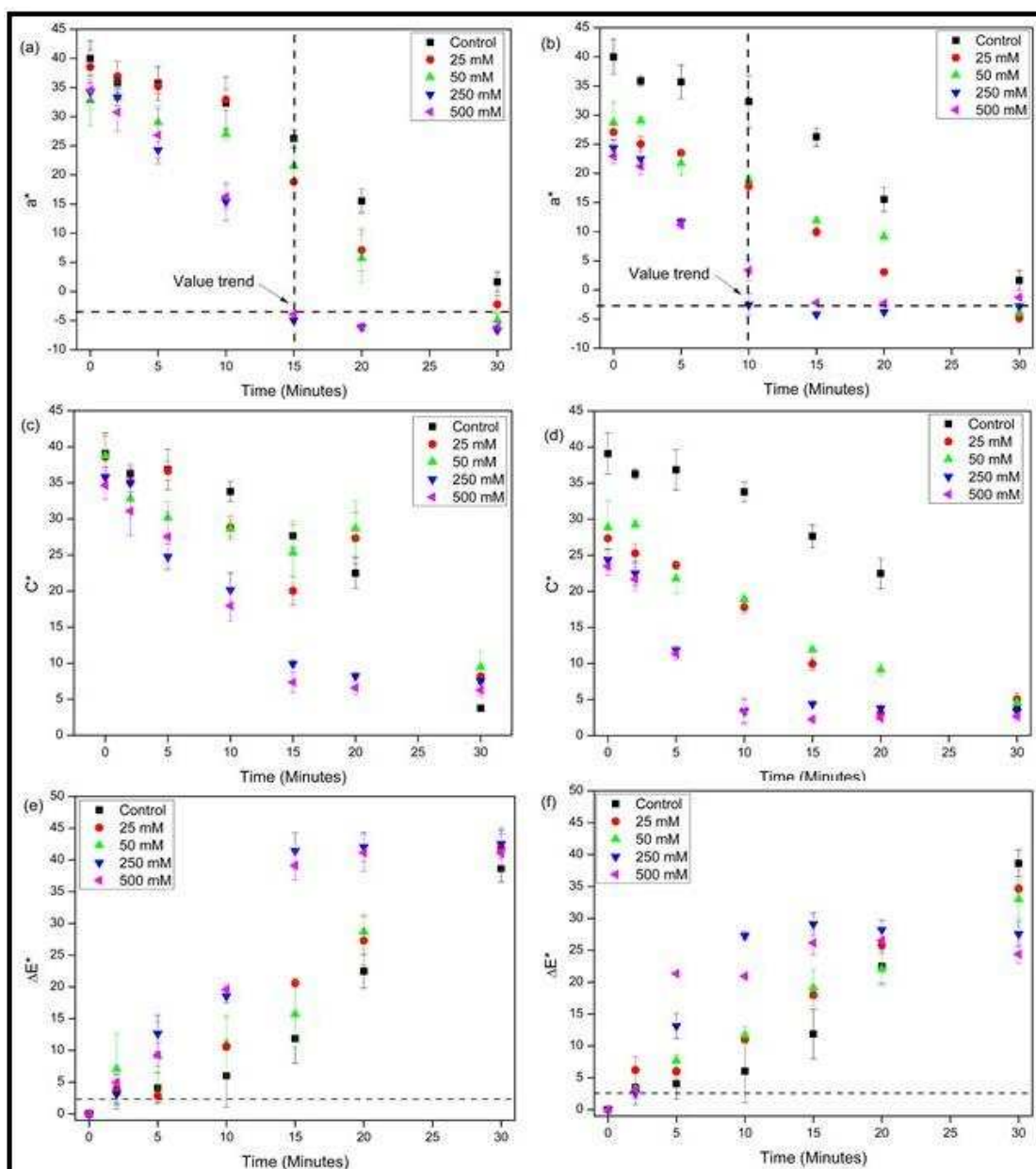


Figura 11. Variação das propriedades de cor a^* , C^* e ΔE^* dos sensores contendo CaCl_2 (a, c, e respectivamente) ou MgCl_2 (b, d, f respectivamente) durante 30 minutos de contato com NH_3 .

Outra maneira de confirmar o ganho de sensibilidade dos sensores a NH_3 com o aumento da FI é por meio do tempo necessário para percepção de cor distintas ao olho nu pelo ser humano. Essa percepção pode ser correlacionada com a diferença total de cor (ΔE^*) calculada com parâmetros colorimétricos obtidos com instrumentos analíticos. Mokrzycki & Tatol (2011) sugeriram que a faixa de valores de ΔE^* entre 3,5 e 5,0 são valores que torna possível a percepção de modificação da cor por um observador inexperiente, enquanto valores da $\Delta E^* > 5,0$ indicam a percepção de duas

cores distintas. Nos sensores com FI ≥ 250 mM e para qualquer sal incorporado é perceptível a modificação das cores em até 5 minutos de contato com NH_3 , enquanto no sensor controle torna-se necessário 15 minutos (Figura 11e, f).

Para explicar a variação de h^* do sensor com CaCl_2 em função da FI (mM) e do tempo de contato com NH_3 (minutos), foi ajustado um modelo de regressão quadrático desse comportamento. Enquanto, para o sensor contendo MgCl_2 , não foi possível o ajuste de modelos matemáticos relacionados a esses fatores, pois a capacidade preditiva e a explicação da variação dos dados pelo modelo foram baixas. O gráfico de superfície de resposta com a equação do modelo ajustado, coeficiente de determinação ajustado (R^2_{aj}) e coeficientes significativos ($p < 0,05$) são mostrados na Figura 12.

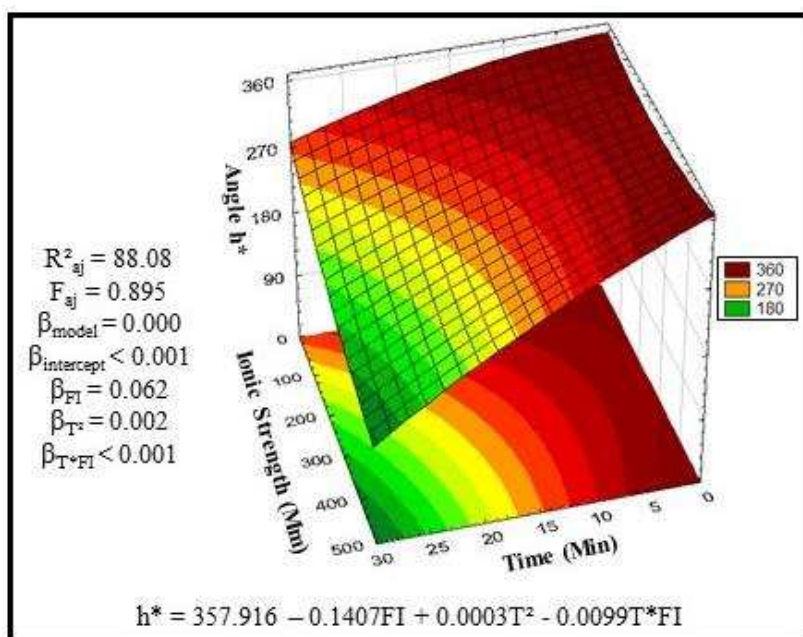


Figura 12. Gráfico de superfície de resposta e parâmetros estatísticos do comportamento de variação do ângulo h^* dos sensores contendo CaCl_2 quando expostos a NH_3 durante 30 minutos.

Com o modelo ajustado verificamos que a FI de CaCl_2 empregada nos sensores mostrou maior influência em relação ao tempo de contato com NH_3 para alteração do parâmetro h^* . Aliado a isso, os valores de h^* são influenciados significativamente de acordo com o efeito linear e negativo da FI e do efeito linear e positivo do tempo de contato (T). O coeficiente significativo e negativo da interação FI*T confirma a existência de um efeito sinérgico entre os dois componentes para reduzir os valores

de h^* . As demais variáveis independentes não apresentaram coeficientes significativos e, portanto, foram removidos da equação. O desenvolvimento desse modelo permite conhecer a concentração de FI de CaCl_2 necessária para atingir uma determinada cor em função do tempo de contato com NH_3 . Devido a isso, o emprego da FI surge como ferramenta para modular a sensibilidade de detecção a NH_3 e que pode ser empregada no desenvolvimento de sensores em aplicações que exigem alta, baixa ou outra específica sensibilidade de detecção.

Mostramos que a formação de complexos com metais (cálcio ou magnésio) e as antocianinas são os motivos da ampliação do espectro de cores produzidas pelos sensores e também pelo aumento da sensibilidade a NH_3 ou OH^- . Aliado a isso, o emprego desses sais, em proporções estequiométricas apropriadas, é uma alternativa em potencial para aumentar a vida útil desses tipos de sensores em aplicações para alimentos. Diversos trabalhos já relataram o ganho de estabilidade das cores produzidas pelas antocianinas e do seu tempo de meia vida ao formar metaloantocianinas ou copigmentos (Li, Li, Wang, & Jiang (2016); Fenger, Moloney, Robbins, Collins, & Dangles (2019); Mollaamin, & Monajjemi (2020); Tachibana, Kimura, & Ohno (2014). Esse aumento da estabilidade acontece devido à competição eficiente entre a formação de ligações dos metais com as antocianinas e o equilíbrio de hidratação, o que impossibilita a abertura do anel central e reduz a formação de espécies incolores (Dangles & Fenger, 2018).

4. CONCLUSÃO

Este estudo mostrou resultados pioneiros sobre o impacto da incorporação de sais em filmes e sensores poliméricos à base de metilcelulose. Mostramos que os sais de CaCl_2 ou MgCl_2 podem atuar tanto como reforço mecânico quanto plastificante em polímeros biodegradáveis de acordo com a FI empregada. A incorporação de sais para a obtenção de 50 mM de FI nos filmes de MC promoveu a reticulação das cadeias poliméricas por meio de ligações coordenadas e interações eletrostáticas, enquanto os valores de FI de 250 mM a 500 mM atuam como o efeito plastificante. Confirmamos que a força e o raio iônico dos sais são fatores que governam o comportamento de absorção de água nesses filmes de MC. O efeito aditivo dos sais auxiliou na dispersão da rede fibrosa da celulose e contribuiu para a flexibilidade dos filmes de metilcelulose. Destacamos o CaCl_2 como um potencial plastificante seguro para embalagens de

alimentos à base de metilcelulose. A adição de CaCl_2 ou MgCl_2 nos sensores contendo antocianinas gerou cores distintas e indicamos a formação de copigmentos ou metaloantocianinas. Os sensores com maior FI ou com cátions de menor raio iônico aumentaram a sensibilidade de detecção a NH_3 . Mostramos que a FI pode ser utilizada para modular a sensibilidade de detecção a NH_3 por meio da superfície de resposta e surge como ferramenta para o desenvolvimento de sensores que produzem alteração colorimétrica próxima ao limite máximo estabelecido por legislações de cada país.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

American Society Standard Testing and Materials. **D882-12: Standard test method for tensile properties of thin plastic sheeting**. West Conshohocken: ASTM International, p. 12, 2012.

American Society Standard Testing and Materials. **D1434-82: Standard Test Method for Determining Gas Permeability Characteristics of Plastic Film and Sheeting**. West Conshohocken: ASTM International, p. 13, 2009.

American Society Standard Testing and Materials. **E96/E96M: Standard test methods for water vapor transmission of materials**. West Conshohocken, ASTM International, 2016

ASTM - American Society Standard Testing and Materials. **D883-18: Standard Terminology Relating to Plastics**. West Conshohocken, ASTM International, 2018.

Aziz, S. B., Rasheed, M. A., & Ahmed, H. M. (2017). Synthesis of polymer nanocomposites based on [methyl cellulose](1-x):(CuS)x ($0.02M \leq x \leq 0.08 M$) with desired optical band gaps. **Polymers**, 9(6). <https://doi.org/10.3390/polym9060194>

Barbosa, L. C. A. (2007). **Espectroscopia no infravermelho na caracterização de compostos orgânicos**. 1ª ed. Viçosa: Editora UFV. ISBN: 978-85-7269-280-9.

Bataglioli, R. A., Taketa, T. B., Neto, J. B. M. R., Lopes, L. M., Costa, C. A. R., & Beppu, M. M. (2019). Analysis of pH and salt concentration on structural and model-drug delivery properties of polysaccharide-based multilayered films. **Thin Solid Films**. doi:10.1016/j.tsf.2019.06.039

Basílio, N., & Pina, F. (2016). Chemistry and photochemistry of anthocyanins and related compounds: A thermodynamic and kinetic approach. **Molecules**, 21(11), 1502, doi.org/10.3390/molecules21111502

Bonnaillie, L. M., Zhang, H., Akkurt, S., Yam, K. L., & Tomasula, P. M. (2014). Casein films: The effects of formulation, environmental conditions and the addition of citric pectin on the structure and mechanical properties. **Polymers**, 6(7), 2018–2036. <https://doi.org/10.3390/polym6072018>

Brooks, M. S-L.; & Celli, G. B. (2019). Anthocyanins from Natural Sources: Exploiting Targeted Delivery for Improved Health. **Royal Society of Chemistry**, 1^a Ed, p.333, ISBN: 1788012151.

Born, M. (1920). Volumen und Hydratationswärme der Ionen. **Zeitschrift Für Physik**, 1(1), 45–48. <https://doi.org/10.1007/BF01881023>

Cazón, P., Vázquez, M., & Velazquez, G. (2018). Cellulose-glycerol-polyvinyl alcohol composite films for food packaging: Evaluation of water adsorption, mechanical properties, light-barrier properties and transparency. **Carbohydrate Polymers**, 195, 423-443. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.04.120>

Chambi, H. N. M., & Grosso, C. R. F. (2011). Mechanical and water vapor permeability properties of biodegradables films based on methylcellulose, glucomannan, pectin and gelatin. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, 31(3), 739–746. <https://doi.org/10.1590/s0101-20612011000300029>

Crinnion W. J. (2010). Toxic effects of the easily avoidable phthalates and parabens. **Alternative medicine review: a journal of clinical therapeutic**, 15(3), 190–196.

Dangles, O., Elhabiri, M., & Brouillard, R. (1994). Kinetic and thermodynamic investigation of the aluminium-anthocyanin complexation in aqueous solution. **Journal of the Chemical Society Perkin Transactions**, 2, 12, 2587–2596. doi.org/10.1039/p29940002587

Dangles, O., & Fenger, J.-A. (2018). The Chemical Reactivity of Anthocyanins and Its Consequences in Food Science and Nutrition. **Molecules**, 23(8), 1970. doi:10.3390/molecules23081970

Du, R., Zhao, F., Peng, Q., Zhou, Z., & Han, Y. (2018). Production and characterization of bacterial cellulose produced by *Gluconacetobacter xylinus* isolated from Chinese persimmon vinegar. **Carbohydrate Polymers**, 194, 200-207. https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.04.041

Dubas, S. T., & Schlenoff, J. B. (1999). Factors Controlling the Growth of Polyelectrolyte Multilayers. **Macromolecules**, 32(24), 8153–8160. doi:10.1021/ma981927a

Esteban, C., Donati, I., Pantano, S., Villegas, M., Benegas, J., & Paoletti, S. (2018). Dissecting the conformational determinants of chitosan and chitlac oligomers. **Biopolymers**, 109(6), e23221. doi:10.1002/bip.23221

Fadeeva, I. V., Trofimchuk, E. S., Dedushenko, S. K., Fomin, A. S., Davydova, G. A., Selezneva, I. I., Perfiliev, Y. D., & Barinov, S. M. (2019). Methylcellulose films partially crosslinked by iron compounds for medical applications. **Materials Today Communications**, 18, 54–59. https://doi.org/10.1016/j.mtcomm.2018.10.008

FENGER, J.-A., Moloney, M. P., Robbins, R., Collins, T., & Dangles, O. (2019). The influence of acylation, metal binding and natural antioxidants on the thermal stability of red cabbage anthocyanins in neutral solution. **Food & Function**. doi:10.1039/c9fo01884k

Filipini, G. Da S., Romani, V. P., & Martins, V. G. (2020). Biodegradable and active-intelligent films based on methylcellulose and jambolão (*Syzygium cumini*) skins extract for food packaging. **Food Hydrocolloids**, 106139. doi:10.1016/j.foodhyd.2020.106139

Gill, Y. Q., Abid, U., & Song, M. (2020). High performance Nylon12/clay nanocomposites for potential packaging applications. **Journal of Applied Polymer Science**, 49247. doi:10.1002/app.49247

Geyer, R., Jambeck, J. R., & Law, K. L. (2017). Production, use, and fate of synthetic polymers. **In Plastic Waste and Recycling**, 3(7), e1700782. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-817880-5.00002-5>

Ghadermazi, R., Hamdipour, S., Sadeghi, K., Ghadermazi, R., & Khosrowshahi Asl, A. (2019). Effect of various additives on the properties of the films and coatings derived from hydroxypropyl methylcellulose - A review. **Food Science and Nutrition**, 7(11), 3363–3377. <https://doi.org/10.1002/fsn3.1206>

Halim, A. L. A., Kamari, A., & Phillip, E. (2018). Chitosan, gelatin and methylcellulose films incorporated with tannic acid for food packaging. **International Journal of Biological Macromolecules**, 120, 1119–1126. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.08.169>

Helbert, W., Sugiyama, J., Ishihara, M., & Yamanaka, S. (1997). Characterization of native crystalline cellulose in the cell walls of Oomycota. **Journal of Biotechnology**, 57, 29-37. [https://doi.org/10.1016/S0168-1656\(97\)00084-9](https://doi.org/10.1016/S0168-1656(97)00084-9)

Hirrien, M., Desbrières, J., & Rinaudo, M. (1996). Physical properties of methylcelluloses in relation with the conditions for cellulose modification. **Carbohydrate Polymers**, 31(4), 243–252. doi:10.1016/S0144-8617(96)00118-X

Imre, B., & Pukánszky, B. (2013). Compatibilization in bio-based and biodegradable polymer blends. **European Polymer Journal**, 49(6), 1215–1233. doi:10.1016/j.eurpolymj.2013.01.019

Junior, S. V. C. (2002). **Ciência dos polímeros: um texto básico para tecnólogos e engenheiros**. 3ª ed. São Paulo: Editora Artliber. ISBN: 85-88098-10-5.

Junior, F. W. B. (1984). **Textbook of polymer science**. New York: Wiley Interscience, 3ª Ed, 578p, ISBN: 9780471031963.

Kalkan, S., Otağ, M. R., & Engin, M. S. (2020). Physicochemical and bioactive properties of edible methylcellulose films containing *Rheum ribes* L. extract. **Food Chemistry**, 307, 125524. doi:10.1016/j.foodchem.2019.125524

Kumar, S., & Walia, Y. K. (2014). Harnessing economic potential of methylcellulose from Wheat Straw: A Review. **Asian Journal Of Advanced Basic Sciences**, 2(3), 12-22.

Lee, S., Lei, Y., Wang, D., Li, C., Cheng, J., Wang, J., Meng, W., & Liu, M. (2019). The study of zeolitic imidazolate framework (zif-8) doped polyvinyl alcohol/starch/methyl cellulose blend film. **Polymers**, 11(12). Doi:10.3390/polym11121986

Lewis, G. N.; Randall, M.; Pitzer, K. S.; Brewer, L. (1961). **Thermodynamics**. New York, N.Y.: McGraw Hill, p. 723, ISBN: 0070376220 9780070376229.

Li, X.-D., Li, J., Wang, M., & Jiang, H. (2016). Copigmentation effects and thermal degradation kinetics of purple sweet potato anthocyanins with metal ions and sugars. **Applied Biological Chemistry**, 59(1), 15–24. doi:10.1007/s13765-015-0140-9

Liebeck, B. M., Hidalgo, N., Roth, G., Popescu, C., & Böker, A. (2017). Synthesis and Characterization of Methyl Cellulose/Keratin Hydrolysate Composite Membranes. **Polymers**, 9(12), 91-113. doi:10.3390/polym9030091

Lieberman, E.R., & Gilbert, S. G. (1973). Gas permeation of collagen films as affected by cross-linkage, moisture, and plasticizer content. **Journal of Polymer Science**, 41, 33-43.

Lin, S. Y., Wang, S. L., Wei, Y. S., & Li, M. J. (2007). Temperature effect on water desorption from methylcellulose films studied by thermal FT-IR microspectroscopy. **Surface Science**, 601(3), 781–785. doi:10.1016/j.susc.2006.11.006

Liu, H., Liu, C., Peng, S., Pan, B., & Lu, C. (2018). Effect of polyethyleneimine modified graphene on the mechanical and water vapor barrier properties of methyl cellulose composite films. **Carbohydrate Polymers**, 182, 52–60. doi:10.1016/j.carbpol.2017.11.008

Matta, E., Tavera-Quiroz, M. J., & Bertola, N. (2019). Active edible films of methylcellulose with extracts of green apple (Granny Smith) skin. **International Journal of Biological Macromolecules**, 124, 1292–1298. doi:10.1016/j.ijbiomac.2018.12.114

Mokrzycki, W. S., & Tatol, M. (2011). Color difference Delta E - A survey. **Machine Graphic & Vision**, 20, 383-411.

Mollaamin, F., & Monajjemi, M. (2020). Thermodynamic and IR Spectral Study of Metal Cations–Anthocyanin Chelation: Mechanism of Formation of Pigments. **Russian Journal of Physical Chemistry A**, 94(9), 1887–1901. doi:10.1134/s0036024420090204

Muscariello, R., Rendina, D., Giannettino, R., Ippolito, S., Romano, O., Coretti, F., De Vita, S., Martino, R. S., Sepe, C., Nuzzo, V. (2020). Calcium daily intake and the efficacy of a training intervention on optimizing calcium supplementation therapy: a clinical audit. **Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases**. doi:10.1016/j.numecd.2020.08.005

Nasatto, P. L., Pignon, F., Silveira, J. L. M., Duarte, M. E. R., Nosedá, M. D., & Rinaudo, M. (2015). Methylcellulose, a cellulose derivative with original physical properties and extended applications. **Polymers**, 7(5), 777–803. doi:10.3390/polym7050777

Nopwinyuwong, A., Trevanich, S., & Suppakul, P. (2010). Development of a novel colorimetric indicator label for monitoring freshness of intermediate-moisture dessert spoilage. **Talanta**, 81(3), 1126–1132. doi:10.1016/j.talanta.2010.02.008

Noronha, C. M., De Carvalho, S. M., Lino, R. C., & Barreto, P. L. M. (2014). Characterization of antioxidant methylcellulose film incorporated with α -tocopherol nanocapsules. **Food Chemistry**, 159, 529–535. doi:10.1016/j.foodchem.2014.02.159

Nunes, M. R., Castilho, M. S. M., Veeck, A. P. L., da Rosa, C. G., Noronha, C. M., Maciel, M. V. O. B., & Barreto, P. M. (2018). Antioxidant and antimicrobial methylcellulose films containing *Lippia alba* extract and silver nanoparticles. **Carbohydrate Polymers**, 192, 37–43. doi:10.1016/j.carbpol.2018.03.014

Pola, C. C., Medeiros, E. A. A., Pereira, O. L., Souza, V. G. L., Otoni, C. G., Camilloto, G. P., & Soares, N. F. F. (2016). Cellulose acetate active films incorporated with oregano (*Origanum vulgare*) essential oil and organophilic montmorillonite clay control the growth of phytopathogenic fungi. **Food Packaging and Shelf Life**, 9, 69–78. doi:10.1016/j.fpsl.2016.07.001

Razavi, S. M. A., Amini, A. M., & Zahedi, Y. (2015). Characterisation of a new biodegradable edible film based on sage seed gum: Influence of plasticiser type and concentration. **Food Hydrocolloids**, 43, 290–298. doi:10.1016/j.foodhyd.2014.05.028

Robertson, G. L. (2012). **Food Packaging Principles and Practice**. Taylor & Francis Group, 3^a ed., CRC Press, 733p.

Rocha, J. C. G., Procópio, F. R., Mendonça, A. C., Vieira, L. M., Perrone, Í. T., de Barros, F. A. R., & Stringheta, P. C. (2018). Optimization of ultrasound-assisted

extraction of phenolic compounds from jussara (*Euterpe edulis* M.) and blueberry (*Vaccinium myrtillus*) fruits. **Food Science and Technology**, 38(1), 45–53. doi.org/10.1590/1678-457x.36316

Rosa, G. S., Vanga, S., Gariepy, Y., & Raghavan, V. (2019). The effect of drying on the mechanical properties and structure of biodegradable films. **Editorial Universitat Politècnica de València**. 675-682. doi:10.4995/IDS2018.2018.7624

Roşu, M. C., Páll, E., Socaci, C., Măgeruşan, L., Pogăcean, F., Coroş, M., Turza, A., & Pruneanu, S. (2017). Cytotoxicity of methylcellulose-based films containing graphenes and curcumin on human lung fibroblasts. **Process Biochemistry**, 52, 243–249. doi:10.1016/j.procbio.2016.10.002

Rukchon, C., Nopwinyuwong, A., Trevanich, S., Jinkarn, T., & Suppakul, P. (2014). Development of a food spoilage indicator for monitoring freshness of skinless chicken breast. **Talanta**, 130, 547–554. doi:10.1016/j.talanta.2014.07.048

Saha, N. R., Roy, I., Sarkar, G., Bhattacharyya, A., Das, R., Rana, D., Banerjee, R., Paul, A. K., Mishra, R., & Chattopadhyay, D. (2018). Development of active packaging material based on cellulose acetate butyrate/polyethylene glycol/aryl ammonium cation modified clay. **Carbohydrate Polymers**, 187, 8-18. doi:10.1016/j.carbpol.2018.01.065

Salari, M., Khiabani, M. S., Mokarram, R. R., Ghanbarzadeh, B., & Kafil, H. S. (2018). Development and evaluation of chitosan based active nanocomposite films containing bacterial cellulose nanocrystals and silver nanoparticles. **Food Hydrocolloids**, 84, 414–423. doi:10.1016/j.foodhyd.2018.05.037

Sharma, A., Thakur, M., Bhattacharya, M., Mandal, T., & Goswami, S. (2019). Commercial application of cellulose nano-composites – A review. **Biotechnology Reports**, 21, e00316. doi:10.1016/j.btre.2019.e00316

Silvério, H. A., Neto, W. P. F., Da Silva, I. S. V., Rosa, J. R., Pasquini, D., De Assunção, R. M. N., Da Silva Barud, H., & Ribeiro, S. J. L. (2014). Mechanical, thermal, and barrier

properties of methylcellulose/cellulose nanocrystals nanocomposites. **Polímeros**, 24(6), 683–688. doi:10.1590/0104-1428.1691

Slavutsky, A. M., Bertuzzi, M. A., Armada, M., García, M. G., & Ochoa, N. A. (2014). Preparation and characterization of montmorillonite/brea gum nanocomposites films. **Food Hydrocolloids**, 35, 270–278. doi:10.1016/j.foodhyd.2013.06.008

Sudharsan, K., Mohan, C. C., Babu, P. A. S., Archana, G., Sabina, K., Sivarajan, M., & Sukumar, M. Production and Characterization of Cellulose Reinforced Starch (CRT) Films. (2016). **International Journal of Biological Macromolecules**, 83, 385-395. doi:10.1016/j.ijbiomac.2015.11.037

Tarchoun, A. F., Trache, D., & Klapötke, T. M. (2019). Microcrystalline cellulose from *Posidonia oceanica* brown algae: Extraction and characterization. **International Journal of Biological Macromolecules**, 138, 837-845. doi:10.1016/j.ijbiomac.2019.07.176

Tachibana, N., Kimura, Y., & Ohno, T. (2014). Examination of molecular mechanism for the enhanced thermal stability of anthocyanins by metal cations and polysaccharides. **Food Chemistry**, 143, 452–458. doi:10.1016/j.foodchem.2013.08.017

Tunç, S., & Duman, O. (2011). Preparation of active antimicrobial methyl cellulose/carvacrol/montmorillonite nanocomposite films and investigation of carvacrol release. **LWT - Food Science and Technology**, 44(2), 465–472. doi:10.1016/j.lwt.2010.08.018

Turhan, K. N., & Şahbaz, F. (2001). A simple method for determining light transmittance of polymer films used for packaging foods. **Polymer International**, 50(10), 1138–1142. doi:10.1002/pi.758

Wang, J., Gardner, D. J., Stark, N. M., Bousfield, D. W., Tajvidi, M., & Cai, Z. (2018). Moisture and Oxygen Barrier Properties of Cellulose Nanomaterial-Based Films. **ACS**

Sustainable Chemistry and Engineering, 6(1), 49–70.
doi:10.1021/acssuschemeng.7b03523

Weller, M., Rourke, J., Overton, T., & Armstrong, F. (2017). **Inorganic chemistry**. 6^a ed. Porto Alegre: Bookman Companhia Editora Ltda. Chapter 1. ISBN: 9780199641826.

Wypych, G. (2017). **Handbook of plasticizers**. ChemTec Publishing, 3^a Ed, p.870, ISBN:9781895198973

Yang, X. H., & Zhu, W. L. (2007). Viscosity properties of sodium carboxymethylcellulose solutions. **Cellulose**, 14, 409–417. doi:10.1007/s10570-007-9137-9

Yoshida, K., Mori, M., & Kondo, T. (2009). Blue flower color development by anthocyanins: from chemical structure to cell physiology. **Natural Product Reports**, 26(7), 884. doi:10.1039/b800165k

Yoshida, K., Tojo, K., Mori, M., Yamashita, K., Kitahara, S., Noda, M., & Uchiyama, S. (2015). Chemical mechanism of petal color development of *Nemophila menziesii* by a metalloanthocyanin, nemophilin. **Tetrahedron**, 71(48), 9123–9130. doi:10.1016/j.tet.2015.10.007

Yunos, M. Z. B., & Rahman, W. A. W. A. (2011). Effect of Glycerol on Performance Rice Straw/Starch Based Polymer. **Journal of Applied Sciences**, 11(13), 2456-2459. <https://doi.org/10.3923/jas.2011.2456.2459>

Zhao, Y., & Li, J. (2014). Excellent chemical and material cellulose from tunicates: diversity in cellulose production yield and chemical and morphological structures from different tunicate species. **Cellulose**, 21, 3427-3441. doi:10.1007/s10570-014-0348-6

CAPITULO II

Desenvolvimento de sensores colorimétricos biodegradáveis para monitoramento do frescor de peixes tipo Lambari e avaliação do efeito da força iônica na sensibilidade de detecção

RESUMO

Os alimentos de origem animal, como os pescados, são um dos grupos que mais acometem doenças aos seres humanos. Uma das maneiras úteis de acompanhar o frescor dos peixes é por meio do desenvolvimento de sensores ou embalagens inteligentes que avaliam alguma qualidade físico-química do alimento e comunicam em tempo real com o consumidor. Nesse sentido foram desenvolvidos sensores colorimétricos biodegradáveis para monitorar o frescor de peixes tipo Lambari e avaliado o efeito da força iônica (FI) do sistema na estabilidade colorimétrica e sensibilidade de detecção. Os sensores foram caracterizados por ATR-FTIR, MEV e TGA. O aumento da FI do sistema promoveu o efeito plastificante na matriz polimérica e pode ser empregada para modular a sensibilidade de detecção de NH_3 e nitrogênio de bases voláteis totais (TVB-N). Sensores com alteração de cor reversível ou irreversível podem ser obtidos de acordo com a força iônica empregada na matriz polimérica. Dois tipos de sensores efetivos foram desenvolvidos e capazes de classificar o frescor de peixes Lambari de acordo com normas brasileira e europeia. Modelos matemáticos foram ajustados e podem ser utilizados para prever o nível de TVB-N e/ou pH nos peixes armazenados sob refrigeração. Todos os constituintes utilizados para o desenvolvimento dos sensores são naturais e biodegradáveis, o que possibilita a aplicação segura em alimentos e permite avaliar em tempo real e visível o frescor de peixes.

1. INTRODUÇÃO

A segurança alimentar é um direito humano básico e teve o conceito desenvolvido em meados da década de 1970 em meio à crise alimentar global com o intuito de promover o acesso físico e econômico de todas as pessoas em qualquer momento à comida suficiente para uma vida ativa e saudável (FAO, 2003). Num relatório recente da OMS estimou-se que 420 a 960 milhões de doenças foram

transmitidas por alimentos e 420.000 mortes ocorreram apenas em 2010 (WHO, 2015). Com a preocupação sobre a inocuidade alimentar e, desta vez associada à segurança dos alimentos, a OMS, desenvolve desde 2002, sete estratégias para a reduzir os riscos associados às doenças veiculadas por alimentos. Dentre essas, três abordagens foram direcionadas ao desenvolvimento de tecnologias capazes de avaliarem a qualidade do alimento e comunicar ao consumidor como, por exemplo, por meio da elaboração de sensores ou embalagens inteligentes (WHO, 2009).

Um dos grupos de alimentos que mais acometem doenças aos seres humanos são os produtos de origem animal. Nesse grupo, os pescados são uma das classes mais susceptíveis ao processo de deterioração, pois apresentam um pH próximo à neutralidade, elevada atividade de água, teor de nutrientes e carga inicial microbiana (Zhai *et al.*, 2017; Pasaribu, Buyang, Suryaningsih, Dirpan, & Djalal, 2020). Uma das maneiras úteis de acompanhar a degradação de alimentos com alto teor de proteínas é por meio da quantificação de aminas voláteis, conhecidas como nitrogênio de bases voláteis totais (TVB-N) (Tang, & Ye, 2020). Algumas dessas substâncias voláteis mais comuns são amônia (NH_3), metilamina, dimetilamina ou trimetilamina e são produzidas por decomposição do óxido de trimetilamina (TMAO) por meio do metabolismo microbiano ou por reações provocadas por enzimas endógenas (Nielsen, & Jørgensen, 2004).

A detecção de TVB-N em setores de controle de qualidade de alimentos em indústrias é realizada por meio de técnicas que incluem destilação por arraste de vapor (Zhu, Zhao, Feng, & Gao, 2016), nariz eletrônico (Huang, Zhao, Chen, & Zhang, 2014) e ferramentas instrumentais analíticas (Guo, Huang, Zhu, Guo, & Qin, 2018; Ouyang *et al.*, 2020). No entanto, essas técnicas consomem reagentes, instrumentos sofisticados, tempo, são destrutivas, requerem profissionais com alto nível de qualificação e, portanto, são inviáveis para monitoramento da qualidade do alimento por consumidores em supermercados. Para solucionar este problema alguns pigmentos sensíveis ao pH como antocianinas podem ser utilizadas como detectores, uma vez que o aumento da concentração de TVB-N provoca a alcalinidade no *headspace* das embalagens e, como resposta do pigmento, são produzidas alterações colorimétricas, o que propicia a aplicação em embalagens inteligentes ou sensores (Kang *et al.*, 2019; Freitas, *et al.*, 2020).

As antocianinas são fitopigmentos hidrossolúveis da família dos flavonoides que desempenham papel protetor em plantas, sendo responsáveis pela cor vermelha, azul e roxa em frutas, flores e em algumas partes de plantas (Bendokas *et al.*, 2019). A estrutura química das antocianinas é composta por glicosídeos, ou seja, um grupo glicona (açúcares) e outro aglicona (antocianidinas) no qual são polihidroxílicos ou polimetoxílicos derivados do 2-fenilbenzopirílio (Figura 13) (Tarone, Cazarin, & Marostica Junior, 2020). Até o momento foram identificadas 27 espécies de antocianidinas e, devido à ampla possibilidade de ligações com um ou mais tipo de açúcares, foram descobertas mais de 700 antocianinas na natureza (Wallace, & Giusti, 2019). Contudo, dentre todas as antocianidinas existentes, apenas seis são predominantes e representam aproximadamente 90 % do produzido em frutas e vegetais (Wallace, & Giusti, 2015).

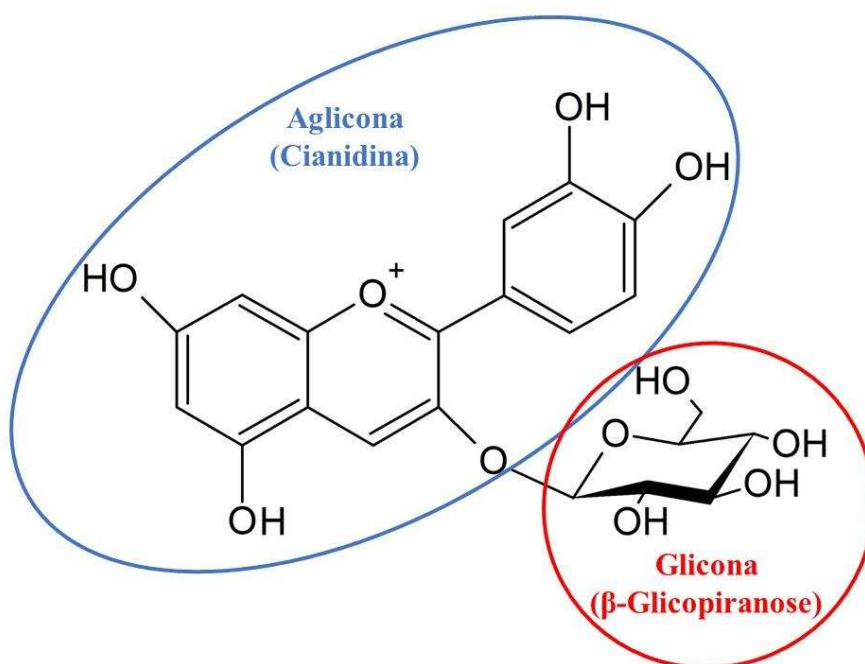


Figura 13. Estrutura química da cianidina-3-glicosídeo com realce do grupo aglicona (cianidina) e glicona (β -glicopiranoose).

O açaí (*Euterpe oleracea* Mart.) é um fruto de uma palmeira tropical nativa da floresta amazônica no Brasil, conhecida como açazeiro (*Euterpe* spp.), rico em antocianinas em especial as cianidina 3-glicosídeo e cianidina 3-rutinosídeo (Garzón, Narváez-Cuenca, Vincken, & Gruppen, 2017; Machado *et al.*, 2019; Vera de Rosso *et al.*, 2008). Desde a última década o interesse pela fruta aumentou em decorrência do alto valor nutritivo que pode desempenhar papel benéfico na prevenção ou controle

de doenças neurodegenerativas, propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias e, também, por possuir o maior teor de antocianinas em relação a outras frutas vermelhas como morango, acerola e framboesa (Peixoto, Roxo, Krstin, Wang, & Wink, 2016; Vera de Rosso *et al.*, 2008).

As antocianinas apresentam características de ampla variação colorimétrica, o que propicia aplicações como corantes naturais em produtos alimentares e o desenvolvimento de sensores (De Rosso, & Mercadante, 2007; Silva, Mastrantonio, Costa, & de Moraes, 2019). Um dos fatores que contribuem para a amplitude de variação no espectro de cores das antocianinas ocorre devido a alterações do pH por meio do equilíbrio químico entre interconversões das espécies: base quinoidal (violeta ao azul), cátion flavílio (vermelho), pseudo-base carbinol ou hemiacetal (incolor), cis-chalcona e trans-chalcona (amarelo e/ou incolor) (Brooks, & Celli, 2019).

Essas cores produzidas pelas antocianinas podem ser estabilizadas, intensificadas ou modificadas por meio da copigmentação, ou seja, interações intermoleculares hidrofóbicas do tipo π - π entre os núcleos polarizáveis com outros compostos orgânicos promovendo efeito batocrômico e/ou hiperacrômico (Santos-Buelga, & González-Panamás, 2018). De fato, foi mostrado que o equilíbrio das antocianinas é influenciado por complexações com íons de alumínio e outros metais obtendo-se metaloantocianinas e que, por sua vez, promovem o deslocamento batocrômico para cores mais violetas (Dangles, Elhabiri, & Brouillard, 1994). Takeda, Yamashita, Takahashi, & Timberlake (1990) mostraram que complexos ternários entre antocianinas/metais/copigmentos podem fortalecer o efeito de pigmentação e, portanto, podem contribuir para novos estudos e aplicações no desenvolvimento de sensores de pH mais estáveis e sensíveis. Diante do exposto, objetivou-se desenvolver sensores colorimétricos biodegradáveis para monitorar o frescor de peixes tipo Lambari e avaliar o efeito da força iônica na estabilidade colorimétrica e sensibilidade de detecção a NH_3 e TVB-N.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material

Acetona e cloreto de cálcio (CaCl_2) foram adquiridos da Vetec (Duque de Caxias, Brasil). Ácido clorídrico (HCl) e álcool etílico foram adquiridos da Neon (Suzano, Brasil). Cloreto de amônio (NH_4Cl), glicerol e hidróxido de sódio (NaOH)

foram comprados da Synth (Diadema, Brasil). Metilcelulose de massa molar média de 40.000, viscosidade de 400 cP e com GS de 1,6 a 1,9 (metoxi/celulose) foi comprada da Sigma-Aldrich (St.Louis, Estados Unidos da América). Os peixes tipo Lambari foram comprados na cidade de Viçosa, Minas Gerais, Brasil.

2.2 Obtenção dos frutos de açaí (*Euterpe oleraceae* Mart.)

Foram utilizados frutos de açaí (*Euterpe oleraceae* Mart.) colhidos em Cametá – Pará (Latitude: 2° 14' 21.8" S e Longitude: 49° 29' 54.3" O). Os frutos foram colhidos, selecionados, lavados e tiveram suas sementes retiradas. As partes restantes (casca e mesocarpo) foram trituradas em *mixer* com adição de água destilada durante 3 minutos, na proporção de 3:1 (m/m) de fruto/água. A polpa homogênea foi congelada em ultrafreezer à temperatura de -60 °C até o momento das análises.

2.3 Obtenção do extrato fenólico de açaí (APE)

A obtenção do APE foi realizada segundo Rocha *et al.* (2018), no qual cerca de 100 g de poupa de açaí foi adicionada num balão contendo 1L de solução etanólica (75 % v/v) e, em seguida, o pH foi corrigido para 2,0 utilizando ácido clorídrico (0,1 N). A extração assistida por ultrassom foi realizada em banho ultrassônico (Ultracleaner 1400A, Unique, Brasil) operando a 40 kHz e na temperatura de 40 °C durante 50 minutos. Após esse período, a mistura foi filtrada a vácuo em funil de Büchner com papel filtro qualitativo Whatman nº 1 e concentrado a vácuo com auxílio de um evaporador rotativo (IKA RV 10 digital), à temperatura máxima de 50 °C para eliminação do álcool até obterem teor de sólidos solúveis totais (SST) de aproximadamente 7 °Brix. O SST foi obtido pela leitura direta em refratômetro marca Leica, modelo AR 200 (New York, USA). O APE foi armazenado em frasco âmbar sob congelamento no ultrafreezer (aproximadamente -60 °C) até a análise.

2.4 Caracterização do APE

2.4.1 Antocianinas totais

A determinação de antocianinas totais foi realizada pelo método único de acordo com o procedimento descrito por Fuleki, & Francis (1968). Realizou-se a leitura em espectrofotômetro UV-VIS 1601Pc (Shimadzu, Kyoto, Japão) no comprimento de

onda de 535 nm. Os resultados foram expressos em mg de antocianinas por 100 g de polpa de açaí.

2.4.2 Fenólicos totais

A determinação de fenólicos totais do APE foi realizada de acordo com metodologia descrita por Singleton, & Rossi (1965). A absorbância foi medida a 760 nm usando um espectrofotômetro UV-VIS 1601Pc (Shimadzu, Kyoto, Japão). Os resultados foram expressos em mg de ácido gálico equivalente por g de polpa de açaí (mg EAG.100 g⁻¹ de polpa de açaí).

2.4.3 Análise colorimétrica

Os APE e as alterações colorimétricas dos sensores foram caracterizados pela leitura direta de reflectância do sistema de coordenadas retangulares “L*”, “a*” e “b*” empregando-se a escala de cor CIELAB por reflectância, com geometria esférica d/8°, iluminante D65 e ângulo de observação de 10 °, com auxílio do colorímetro Colorquest XE (Hunter Lab, Reston, USA). Os valores de Diferença Total de Cor (ΔE^*), índice Chroma (C^*) e ângulo hue (h^*) foram calculados de acordo com as Equações 1, 2 e 3 respectivamente. Todos os parâmetros foram obtidos com três repetições.

$$\Delta E^* = \sqrt{[(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2]} \quad (1)$$

$$C^* = \sqrt{[(a^*)^2 + (b^*)^2]} \quad (2)$$

$$h = \arctan(b^* \times a^{*-1}) \quad (3)$$

2.4.4 Espectro de absorção no UV-Vis do APE e estabilidade com CaCl₂

Os espectros de absorção no UV-Vis do APE com valores de pH entre 1 ao 13 foram obtidos com auxílio do espectrofotômetro UV-Vis modelo UV 1800 (Shimadzu, Japão). Foi ajustada a concentração do APE para 0,1 mL.mL⁻¹ em água milli-Q, obtendo-se SST igual a 18,3 °Brix. Foi investigada a estabilidade no que se refere a absorção UV-Vis do APE contendo 0, 25, 50, 250 e 500 mM de CaCl₂ nos valores de pH igual a 2, 4, 6, 8, 10 e 12 durante cinco dias. A faixa do comprimento de onda utilizada para leitura foi de 350 a 750 nm.

2.5 Desenvolvimento dos sensores

Os sensores foram preparados pelo método de *casting* conforme descrito por Noronha, De Carvalho, Lino, & Barreto (2014) com adaptações. Foram adicionadas as massas de CaCl_2 correspondentes a 25, 50, 250 e 500 mM de FI do sistema num béquer contendo 200 mL de água milli-Q, com valores obtidos a partir da Equação 4, e aquecido à temperatura de $100\text{ }^\circ\text{C} \pm 2\text{ }^\circ\text{C}$. Em seguida dispersou 4 g do polímero MC, nesta solução, sob agitação magnética de 500 rpm por 15 minutos, adicionou o glicerol (20 % m.m⁻¹) em relação a massa do polímero e 4 mL do APE e manteve a agitação por mais 10 minutos. A dispersão formadora de filme foi vertida em placas de vidro com bordas (34 cm x 18.5 cm) e armazenado a 23 °C e 55 % Umidade Relativa (%UR) por 72 horas para evaporação do solvente. Foram preparados dois controles nas mesmas condições supracitadas, sendo um na ausência do APE e outro em ausência de CaCl_2 .

$$\text{FI} = \mu = \frac{\sum_{i=1}^n Z_i^2 * C_i}{2} \quad (4)$$

Em que μ é a FI (mol.L⁻¹), C_i é a concentração do íon (i) (mol.L⁻¹), Z_i é o número da carga elétrica do íon (i).

2.6 Caracterização dos sensores

2.6.1 Espectroscopia no infravermelho médio com transformada de Fourier de refletância total atenuada (ATR-FTIR)

A análise de ATR-FTIR foi realizada num espectrômetro Nicolet 6700 (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, EUA) equipado com acessório ATR com cristal de germânio. Foram coletados espectros numa resolução de 4 cm⁻¹ com número de onda de 4000 a 850 cm⁻¹ e 32 varreduras. Foram realizados os processamentos de normalização da intensidade de absorção e a correção da linha de base.

2.6.2 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

As fotomicrografias da superfície dos filmes de MC e sensores foram obtidas com auxílio do MEV com detector de elétrons secundários, modelo TM3000 (Hitachi High Technologies America, Inc. Schaumburg, IL, EUA). A tensão de aceleração de elétrons usada foi de 15 kV com ampliação das imagens de 100 e 1000x.

2.6.3 Análise termogravimetria (TGA)

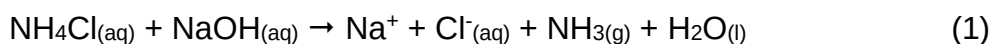
Os eventos de degradação dos constituintes dos materiais foram avaliados pela TGA com auxílio do analisador térmico, modelo DTG-60H (Shimadzu, Japão). Aproximadamente 3 mg de cada tratamento foram aquecidos em cadinhos de alumina até 600 °C, com 10 °C.min⁻¹ de taxa de aquecimento e sob atmosfera de nitrogênio com fluxo de 50 mL.min⁻¹.

2.6.4 Espectro de absorção no UV-Vis dos sensores

Os espectros de absorção no UV-Vis dos sensores poliméricos antes e após 30 minutos de contato com NH₃ foram obtidos com auxílio do espectrofotômetro UV-Vis modelo UV 1800 (Shimadzu, Japão) com comprimento de onda entre 350 a 750 nm.

2.6.5 Alteração colorimétrica dos sensores por contato com amônia volátil (NH₃)

A capacidade de detecção de NH₃ pelos sensores poliméricos foi avaliada de acordo com a metodologia proposta por Freitas *et al.* (2020) com modificações. Os sensores foram dimensionados com área de 9 cm² e mantidos em dessecadores a 25 °C e 51 %UR com uso de solução saturada de Mg(NO₃)₂. A NH₃ foi produzida por meio da Reação direta 1 entre a solução de NH₄Cl (80 mg.mL⁻¹) e ao corrigir o pH para 12 com NaOH (1 N). Em seguida ocorre a Reação de equilíbrio 2 entre NH₃ e água, produzindo NH₄⁺ e OH⁻.



A alteração colorimétrica dos sensores em contato com o ambiente alcalino desenvolvido na superfície do filme foi monitorada nos tempos de 0, 2, 5, 10, 15, 20, 30 e 300 minutos. As coordenadas de cor L*, a*, b* foram obtidas empregando-se a escala de cor CIELAB por reflectância, com geometria esférica d/8°, iluminante D65 e ângulo de observação de 10 °, com auxílio do colorímetro Colorquest XE (Hunter Lab, Reston, USA) e ΔE*, C* e h* foram calculadas com auxílio da Equação 1, 2 e 3 respectivamente.

2.6.6 Reversibilidade colorimétrica após detecção de NH₃

Foi avaliada a estabilidade colorimétrica do sensor após contato com NH₃ durante 2 ou 30 minutos para avaliar a aplicabilidade como sensor reversível ou irreversível e além de estudar o comportamento colorimétrico quando submetidos a possíveis fraudes em embalagens. Os sensores com dimensão de 16 cm² foram armazenados a 25 ± 2 °C e 55 ± 4 %UR na ausência ou presença de luz (LED, potência 36 W) durante 60 dias.

2.6.7 Estabilidade da cor durante o armazenamento

A vida útil do sensor em relação da capacidade de alteração das cores nos ensaios de aplicação em peixes foi avaliada após 60 dias do desenvolvimento do material. Para isso as coordenadas colorimétricas dos sensores foram obtidas no tempo inicial de fabricação (dia 0) e após 60 dias de armazenamento sob ausência de luz a 25 °C, 55 %UR e sem contato com NH₃. Em seguida, os sensores foram utilizados nos ensaios de monitoramento do frescor de peixe e detecção de TVB-N.

2.6.8 Ensaios de monitoramento do frescor de peixes Lambari

Todos os sensores desenvolvidos foram utilizados para monitorar o frescor de peixe tipo Lambari durante o armazenamento sob refrigeração. Foram dimensionados sensores em formato circular com 2 cm de diâmetro e anexados no interior da embalagem de polietileno-náilon contendo $50,0 \pm 0,5$ g de peixe tipo Lambari. A embalagem foi selada e o produto foi mantido a 6 ± 2 °C e 60 ± 5 %UR durante 6 dias. Para simular a interpretação da alteração colorimétrica dos sensores por parte dos consumidores foram obtidas fotografias com câmera de celular e determinadas as coordenadas L, a, b com o aplicativo ColorMeter RGB Colorimeter®. A câmera foi posicionada a distância padronizada de 150 mm e no ângulo de 90 ° em relação à amostra. A cada 24 horas foram realizadas fotografias sem que os sensores fossem retirados da embalagem em 15 repetições. Para o controle realizou o mesmo procedimento e condições de armazenamento, porém em ausência do peixe.

2.6.9 Determinação de pH e TVB-N dos peixes Lambari

A quantificação de TVB-N foi realizada pelo método de destilação por arraste a vapor com titulação ácida, de acordo com Qiao, Tang, & Dong (2017) com modificações. Os peixes contidos em cada bandeja foram triturados e 10 g foram adicionadas num béquer com 200 mL de água milli-Q e homogeneizado. Em seguida foram transferidos para um balão de vidro contendo 2 g de óxido de magnésio. Procedeu a destilação por 30 minutos num destilador Quimis modelo M25008 e o destilado foi recolhido num Erlenmeyer contendo 25 mL de solução aquosa de ácido bórico 4 % (m.v⁻¹) e três gotas do indicador misto de vermelho de metila (0,1 g) e verde de bromocresol (0,5 g). A solução de ácido bórico foi titulada com solução de ácido clorídrico 0,1 N até a viragem da cor verde para azul acinzentado. Os valores de TVB-N foram determinados com auxílio da Equação 5.

$$\text{TVB} - \text{N} (\text{mg. } 100 \text{ g}^{-1}) = \frac{(V_1 - V_2) \times n \times f \times 1400}{p} \times 100 \quad (5)$$

Em que, V_1 é o volume gasto na titulação da amostra (mL), V_2 é o volume gasto na titulação do branco (mL), n é a normalidade do HCl (0,1 N), f é o fator de correção da solução de HCl, p é o peso da amostra de peixe (g) e 1400 é o equivalente de nitrogênio multiplicado para 100 g de peixe.

A determinação do pH nas amostras de peixes foram realizadas após a homogeneização de 10 g de peixe triturado com 5 mL de água milli-Q. As análises de TVB-N e pH foram feitas em 3 replicatas e 3 repetições a cada 24 horas.

2.6.10 Desenvolvimento de modelos de predição multivariados

Para o desenvolvimento dos modelos de regressão linear multivariada foram selecionadas as variáveis preditoras por meio do teste de multicolinearidade. A adequacidade do modelo estimado foi avaliada por meio da análise de variância (ANOVA) ($\alpha = 0,05$), além do coeficiente de determinação ajustado R^2_{aj} e das estimativas dos coeficientes do modelo por meio da probabilidade de F e do teste t de Student, respectivamente. O modelo ajustado foi composto apenas pelos parâmetros significativos ($p < 0,05$).

2.7 Análise estatística

Os experimentos foram realizados seguindo um delineamento inteiramente casualizado (DIC) com um fator em estudo da FI do sal de CaCl_2 em 0 mM, 25 mM, 50 mM, 250 mM e 500 mM. Os dados de estabilidade colorimétrica foram submetidos à Análise de Variância (ANOVA) e ao teste de comparação de média de Tukey ($\alpha = 0,05$). Todas as análises estatísticas foram realizadas com os programas MINITAB versão 17 e OriginPro 8.5.

A análise de componentes principais (PCA) foi conduzida por meio dos parâmetros L^* , a^* , b^* , h^* , C^* e ΔE^* dos sensores durante os seis dias de degradação do peixe para avaliar a viabilidade de classificação e separação dos níveis de frescor dos peixes Lambari. A matriz de dados continha 210 respostas em 15 repetições ao longo de seis dias. A análise discriminante linear (LDA) foi empregada para confrontar a classificação estruturada com a classificação não supervisionada do PCA por meio dos parâmetros de qualidade do peixe (TVB-N). Essas análises foram realizadas com auxílio do programa MINITAB versão 17.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Caracterização do extrato fenólico de açaí (APE)

3.1.1 Antocianinas e fenólicos totais

Rogez, Pompeu, Akwie, & Larondelle (2011) estudaram a acumulação de antocianinas totais ao longo do amadurecimento do açaí (*Euterpe oleracea* Mart) e verificaram que o conteúdo de antocianinas variou entre 1.090 a 1.650 mg.kg^{-1} de fruta, o que indica o açaí como uma fruta rica em antocianinas. O método de extração de antocianinas empregado neste trabalho mostrou-se altamente eficiente, pois alcançou valores maiores em relação a faixa supracitada e resultados próximos em relação ao método de extração otimizada (2130 a 2681 mg.kg^{-1}) por Pompeu, Silva, & Rogez (2009). Os resultados das coordenadas colorimétricas, antocianinas e fenólicos totais do APE são mostrados na Tabela 3.

Tabela 3. Coordenadas colorimétricas, antocianinas e fenólicos totais do APE.

Análises	L^*	a^*	b^*	C^*	h^*	AT	FT
APE	23,54 (0,45)	2,24 (0,33)	-0,11 (0,09)	2,24 (0,33)	357,04 (2,51)	204,3 (6,70)	625,05 (52,11)

* Resultados de antocianinas totais (AT) expressos em mg de antocianina.100 g⁻¹ de polpa de açaí e de fenólicos totais (FT) em mg equivalente de ácido gálico.100 g⁻¹ de polpa de açaí. Valores em média de três repetições e desvio padrão (DP).

Diversos trabalhos indicaram que a constituição majoritária das antocianinas do açaí no Brasil são as cianidina-3-rutinosídeo e cianidina-3-glicosídeo (Carvalho, Da Silveira, Mattietto, De Oliveira, & Godoy, 2016; Dias *et al.*, 2012; Fragoso *et al.*, 2018; Vera de Rosso *et al.*, 2008). Entretanto, já foram relatadas outras antocianinas majoritárias devido aos inúmeros fatores associados ao desenvolvimento do açaí pela palmeira como: cianidina-3-arabinosídeo e a cianidina-3-arabinosilarabinosídeo por Bobbio, Druzian, Abrão, Bobbio, & Fadelli (2000) e além da peonidina-3-(6"-malonilglucosídeo) e delfinidina-3-(6"-acetolil)-glicosídeo (Hogan *et al.*, 2010). Outras antocianinas em níveis de traços foram identificadas como as cianidina-di-O-glicosídeo; pelargonidina-3-glucosídeo; peonidin-3-glucoside e peonidin-3-rutinoside (Dias *et al.*, 2012).

3.1.2 Espectro de absorção no UV-Vis do APE e dos sensores

As alterações colorimétricas do APE em função do pH 2 ao 13 e o espectro de absorção no UV-Vis dos sensores, antes e após o contato com NH₃, são mostrados na Figura 14a, b. No pH 2 o APE tornou-se rosa com comprimento de onda de máxima absorbância ($\lambda_{\text{máx}}$) em 512 nm. O aumento da alcalinidade até o pH 4 reduziu a intensidade de absorção, enquanto no pH 5 houve um maior espalhamento de luz ao longo de todo o espectro e sem alterações significativas no $\lambda_{\text{máx}}$. Quando o pH aumentou de 5 para 9 houve o deslocamento batocrômico gradual do $\lambda_{\text{máx}}$ para 580 nm, o que proporcionou cores com baixa saturação. No pH 10 e 11 a cor mudou para o marrom escuro e houve a redução da intensidade de absorção com a perda do formato de um pico característico (achatamento da curva). No pH 12 e 13 a cor aproximou-se do marrom claro com a redução da intensidade de absorção, o que ficou evidente o direcionamento para a cor amarela devido a formação das estruturas cis-chalcona e trans-chalcona como principais espécies nessa região de pH (Basílio & Pina, 2016). Semelhantes variações colorimétricas das antocianinas do açaí induzidas por pH também foram relatadas por Silva, Mastrantonio, Costa, & de Moraes (2019).

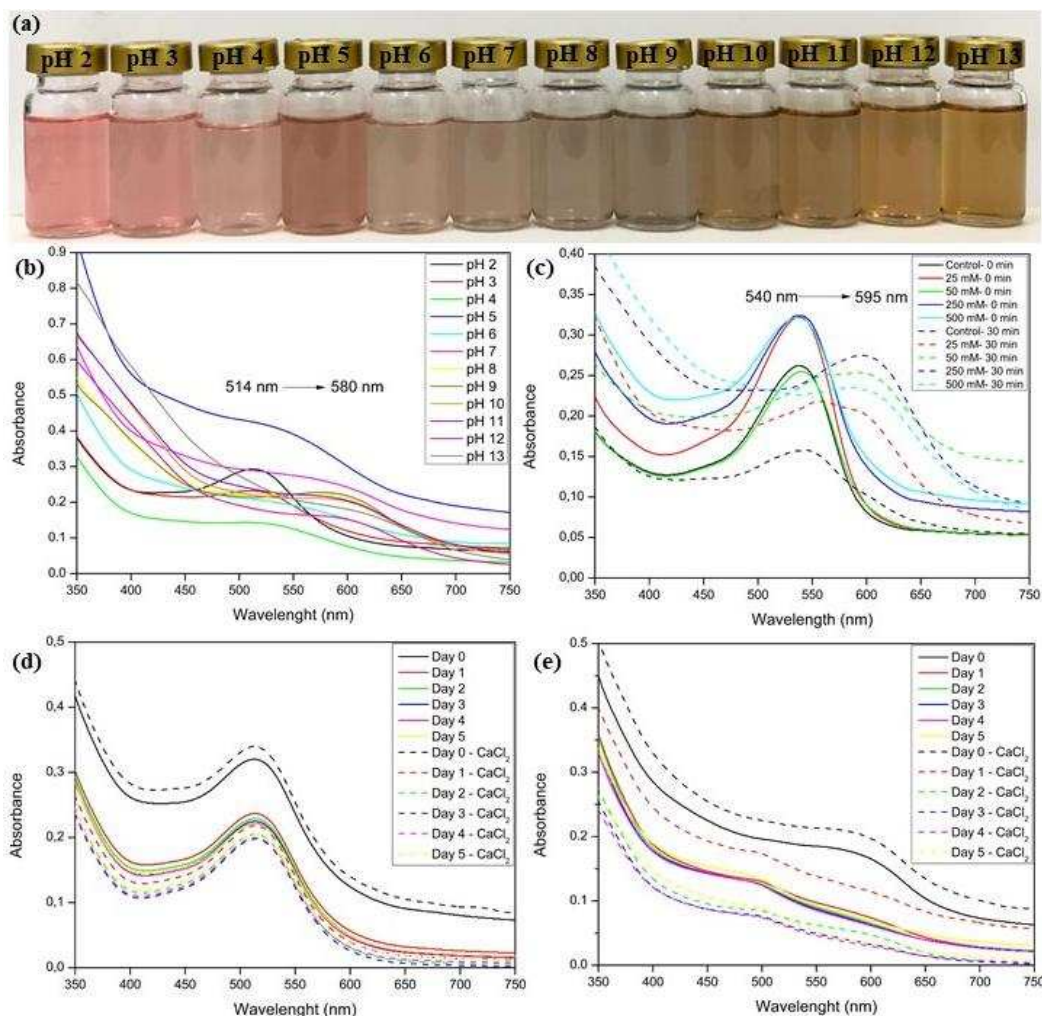


Figura 14. Fotografia do APE em solução aquosa no pH 2 ao 13 (a) e os respectivos espectros no UV-Vis (b). Espectros UV-Vis dos filmes antes e após o contato com NH_3 durante 30 minutos (c). Espectros UV-Vis da solução de APE no pH 2 (d) e 8 (e) com 0 e 500 mM corrigida com CaCl_2 ao longo de cinco dias.

Foram obtidos espectros UV-Vis dos sensores antes e após 30 minutos de contato com NH_3 e observado a maior amplitude de variação das cores em relação às antocianinas em solução (Figura 14c). Isso pode ser justificado pela formação de copigmentos entre a antocianina, cálcio e/ou MC, visto que as interações ternárias podem promover deslocamento batocrômico e aumento da intensidade de absorção (Dangles, Elhabiri, & Brouillard, 1994; Ratanapoompinyo, Nguyen, Devkota, & Shrestha, 2017). Aliado a isso, foi visto que ao incorporar o APE no polímero de MC houve a manutenção da estabilidade colorimétrica das antocianinas por até 60 dias contra os cinco dias em solução aquosa, o que também indica a formação de copigmentos (Figura 22).

A formação de copigmentos pode ter ocorrido pela interação íon-dipolo entre os íons de cálcio e as hidroxilas das antocianinas de modo que auxilie na formação de estruturas de empilhamento intra ou intermolecular de caráter hidrofóbico com outros compostos, como a MC ou fenólicos presentes no APE (Trouillas *et al.*, 2016). Segundo Brouillard, Wigand, & Cheminat (1990), a formação desses copigmentos com interações π - π protegem as regiões mais propícias ao ataque nucleofílico pela água, o que por sua vez diminui a constante de hidratação e estabiliza as estruturas do cátion flavílio.

A adição de 500 mM de FI de CaCl_2 em solução contendo antocianinas reduz o pH da solução e, como resposta, observa-se o efeito hipercrômico, ou seja, o aumento da intensidade de absorção ao longo de todo o espectro UV-Vis (Figura 14d). Isso provavelmente acontece devido à conversão de espécies incolores das antocianinas em formas que absorvem e/ou refletem radiação. Aliado a isso, a interação íon-dipolo entre cálcio e as hidroxilas das antocianinas, também, podem contribuir para o efeito hipercrômico observado. Trouillas *et al.* (2016) mostraram que a proteção por autoassociação de bases quinoidais em pH próximo ao neutro é mais forte do que a produzida pelo cátion flavílio, devido à repulsão eletrostática imposta por essas espécies. Isso justifica a maior estabilidade das antocianinas no pH 8 em relação aos demais valores de pH, conforme visto na Figura 14e.

Os demais espectros UV-Vis da solução de APE na ausência e presença de 500 mM de CaCl_2 e nos valores de pH 4, 6, 10 e 12 estão disponíveis no material suplementar. Li, Li, Wang, & Jiang, 2016 mostraram que o maior efeito hipercrômico acontece para os íons metálicos com cargas elétricas +3, pois são mais facilmente combinados com as hidroxilas livres no anel B das antocianinas do que em relação as cargas +2 e depois +1. Ratanapoompinyo, Nguyen, Devkota, & Shrestha (2017) avaliaram a cinética de degradação das antocianinas em solução aquosa na presença de íons metálicos (Al^{+3} , Ca^{+2} , Fe^{+3} e Sn^{+2}) e verificaram a redução do tempo de meia vida ao comparar com o controle (sem íons metálicos), com exceção do alumínio que apresentou o mesmo tempo de meia vida.

O mecanismo das reações de degradação das antocianinas sob influência de íons metálicos é complexo e ainda não foram completamente elucidados, contudo apresentamos a seguir uma hipótese sobre os possíveis motivos da desestabilização. Verificamos que a redução do pH ocorre por meio da dissociação de CaCl_2 . Uma vez

que os íons de cloro (Cl^-) em solução levam à formação de ligações covalentes com prótons H^+ , obtendo-se ácido clorídrico (HCl). Ao tentar restabelecer o equilíbrio do sistema por meio do princípio de Le Chatelier, algumas substâncias contidas no APE, como as espécies das antocianinas em equilíbrio, podem doar H^+ para o sistema e reduzir o pH. A desprotonação dessas espécies contribui para a conversão espécies incolores (hemiacetal) e, também, para redução da estabilidade dessas estruturas como resultado da precipitação das antocianinas ao complexar com metais (Mollaamin, & Monajjemi 2020). Entretanto é necessário a condução de investigações adicionais para compreensão dos mecanismos e da cinética de desestabilização.

3.2 Caracterização dos sensores

3.2.1 Espectroscopia na região do infravermelho médio (FTIR)

As modificações na intensidade e a presença de picos característicos no FTIR confirmou a presença dos constituintes e os tipos de interações intermoleculares ocorridas nos filmes e sensores. Na Figura 15a é mostrado o espectro de FTIR para efeito de comparação da adição do APE nos filmes de MC controle e com 500 mM de CaCl_2 , enquanto o efeito da FI é mostrado na Figura 15b.

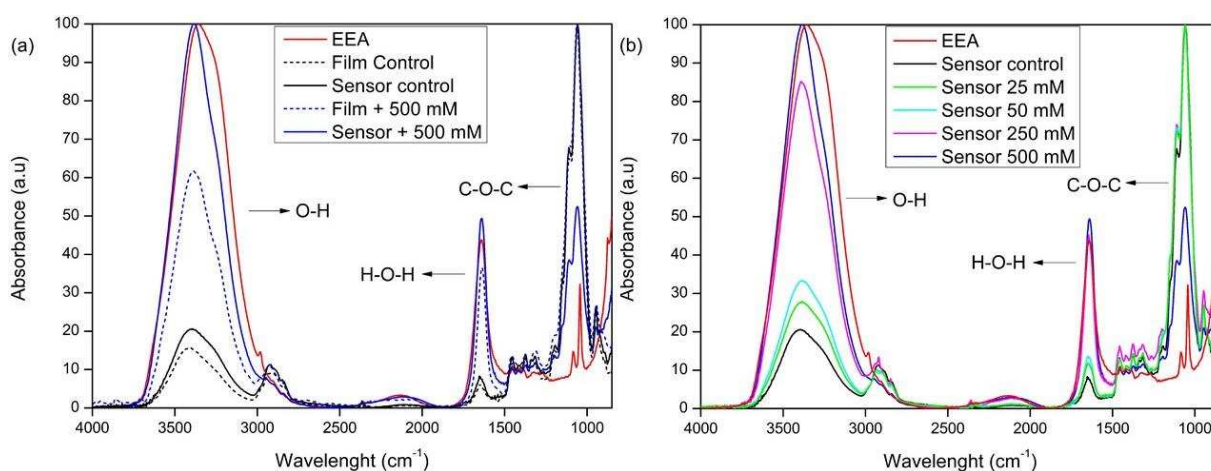


Figura 15. Espectros de ATR-FTIR do APE (vermelho), dos filmes controle com 0 e 500 mM corrigida com CaCl_2 na presença (linha contínua) ou ausência de APE (linha tracejada) (a). Espectros de ATR-FTIR dos sensores com FI de 0, 25, 50, 250 e 500 mM corrigida com CaCl_2 (b).

A adição de APE nos filmes de MC (linhas contínuas) provocou o aumento da intensidade da banda referente ao estiramento de O-H entre 3700 a 3000 cm^{-1} em

relação aos filmes sem APE (linhas tracejadas) devido à presença de hidroxilas nos compostos fenólicos, como as antocianinas (Qin *et al.*, 2019). Nesse mesmo espectro foi verificado o aumento da intensidade do pico referente à deformação angular da água em 1640 cm^{-1} e, portanto, indica a presença de água no APE (Lin, Wang, Wei, & Li, 2007; Qin *et al.*, 2019). Os picos em 1108 cm^{-1} e 1058 cm^{-1} são provenientes das bandas de estiramento simétrico de éter presente na estrutura da MC e nas antocianinas (Barbosa, 2007).

O pico situado entre 3000 e 2800 cm^{-1} é derivado das ramificações alquilas, como o estiramento CH_3 assimétrico da MC. Um pequeno pico em 2981 cm^{-1} no espectro APE é relacionado aos radicais do tipo OCH_3 que estão presentes em compostos fenólicos, como ácido sinápico, ácido vanílico e a peonidina, extraídos do açaí (*Euterpe oleracea* Mart) (Garzón, Narváez-Cuenca, Vincken, & Gruppen, 2017). Os demais picos situados na região entre 1450 a 1200 cm^{-1} são derivados de um complexo de bandas de estiramento e deformação do esqueleto carbônico, região conhecida como impressão digital e, por isto, são pouco utilizadas para diagnósticos (Barbosa, 2007).

Na Figura 15b é visto que o aumento da FI nos filmes provocou a incorporação de água na matriz polimérica, uma vez houve o aumento significativo das bandas de estiramento da hidroxila (3700 cm^{-1}) e de deformação angular da água (1640 cm^{-1}), enquanto os demais picos não tiveram alterações significativas (Barbosa, 2007). A incorporação de água no sensor polimérico pode contribuir para o efeito plastificante, o que provoca a redução da temperatura de degradação e a maior mobilidade dos aditivos entre as cadeias poliméricas, tornando-os mais susceptíveis a interações com fatores externos.

Karbowiak *et al.* (2006) mostraram que a quantidade de moléculas de água contida na matriz polimérica influencia na mobilidade de aditivos, no qual o coeficiente de difusão da fluoresceína aumentou em 2 ordens de magnitude quando a atividade de água do filme alterou de 0,544 para 0,980. Aliado a isto, inevitavelmente mais moléculas de água estão em contato com as antocianinas que, por conseguinte, aumentam a cinética das reações de hidrólise nas estruturas do cátion flavílio e justificam a redução da estabilidade das cores após o contato com NH_3 , conforme visto na Figura 22.

3.2.2 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A morfologia e heterogeneidade na superfície dos filmes em função da adição de CaCl_2 e do APE foi investigada por MEV e mostrada na Figura 16. Foi possível notar que os polímeros de MC não foram completamente dispersos e formaram aglomerados brancos (indicados pela seta preta), contudo esses aglomerados foram reduzidos de tamanho e quantidade com o aumento da FI nos filmes. A obtenção de filmes lisos e sem rachaduras na superfície ocorreu com o aumento da FI e corrobora com a explicação do efeito plastificante supracitado. Esse efeito promove o aumento do volume livre e, portanto, pode melhorar a dispersão entre as cadeias poliméricas, além de reduzir a formação de aglomerados.

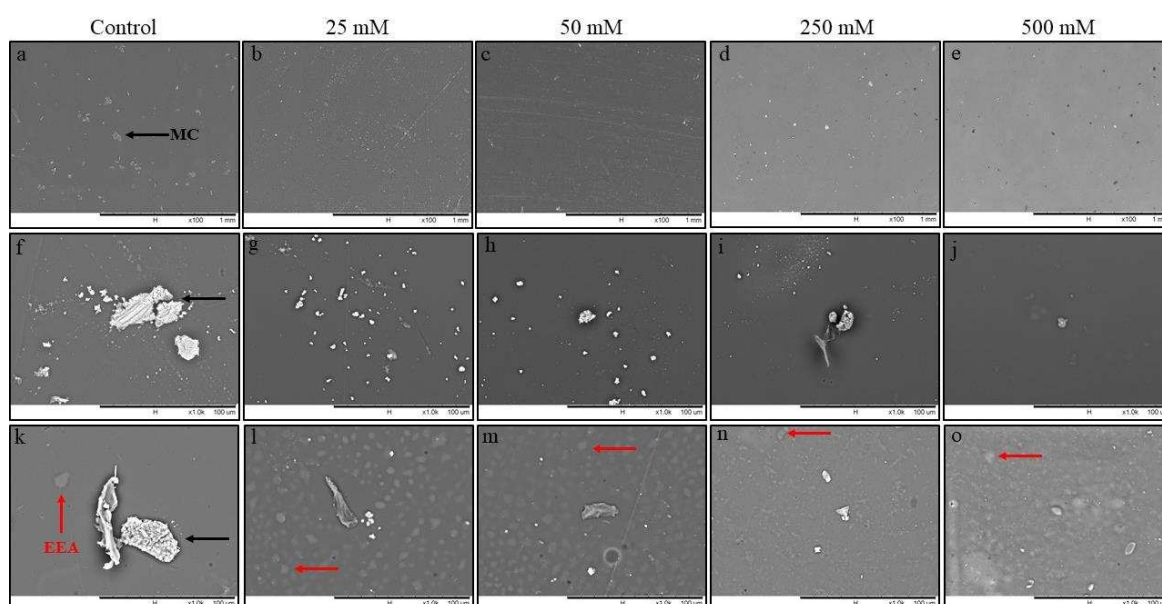


Figura 16. Imagens MEV dos filmes sem APE na magnificação de 100x para: (a) Controle; (b) 25 mM; (c) 50 mM; (d) 250 mM; (e) 500 mM e na magnificação de 1000x para: (f) Controle; (g) 25 mM; (h) 50 mM; (i) 250 mM; (j) 500 mM e sensores na magnificação de 1000x para: (k) Controle; (l) 25 mM; (m) 50 mM; (n) 250 mM e (o) 500 mM. A seta preta indica os aglomerados de MC, a seta vermelha indica a segregação de fase de alguns compostos presentes no APE.

Nas imagens de MEV dos filmes contendo APE, foram verificadas a maior heterogeneidade na superfície com o aumento da FI e pode indicar a segregação de fase de alguns compostos presentes no APE com o polímero. Esses compostos provavelmente são impurezas do extrato e substâncias de menor caráter hidrofílico,

visto que o aumento da quantidade de água nos filmes provocou a maior agregação destes constituintes. Koosha & Hamed (2019) também mostraram a presença de aglomerados na superfície de filmes hidrofílicos de quitosana/PVA e vinculou a presença de impurezas no extrato de antocianinas.

Para confirmar que substâncias contidas no APE provocaram esse efeito, foram mostradas as imagens de MEV dos filmes contendo os mesmos constituintes com exceção do APE e verificado uma superfície lisa e homogênea (Figura 16f. até Figura 16j). Na Figura 18 é visto que as cores produzidas pelas antocianinas antes e após o contato com NH_3 foram homogêneas e, portanto, a superfície heterogênea ao nível microscópico não comprometeu a visualização da alteração colorimétrica ao olho nu, mantendo a funcionalidade dos sensores.

3.2.3 Análise termogravimetria (TGA)

A estabilidade térmica dos filmes sob influência da adição do APE e da FI de CaCl_2 foi analisada por termogravimetria e as curvas foram dispostas na Figura 17a. A temperatura de início de degradação (T_{onset}) da MC foi reduzida de 290 °C no filme controle para 215 °C nos filmes com 500 mM de CaCl_2 e sem APE (linhas contínuas), o que valida a teoria sobre o efeito plastificante do CaCl_2 .

A incorporação do APE nos filmes provocou a redução da temperatura de degradação da MC e do glicerol, pois os compostos presentes no extrato também atuam como espaçadores físicos e podem reduzir as interações entre MC-MC e MC-Glicerol. Silva-Pereira, Teixeira, Pereira-Júnior, & Stefani (2015) verificaram o mesmo comportamento de redução da estabilidade térmica ao incorporar extrato do repolho roxo em filmes com blenda de quitosana e amido.

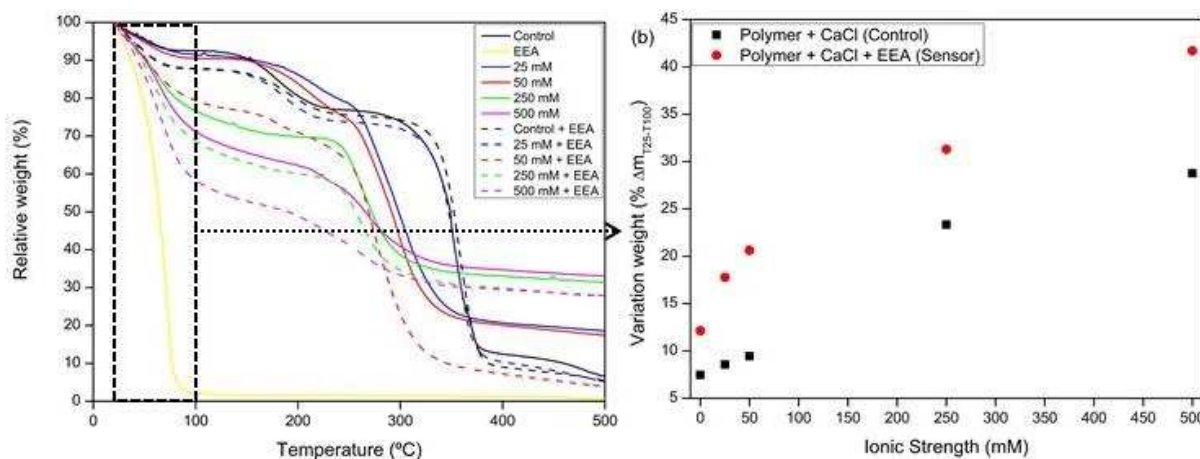


Figura 17. Curvas termogravimétricas dos filmes sem APE (linhas contínuas), dos sensores (linhas tracejadas) e do APE (a). Gráfico de porcentagem da variação de massa entre 25 a 100 °C para os filmes com e sem APE (b).

A incorporação do APE nos filmes foi comprovada por meio da maior porcentagem da perda de massa na região entre 25 a 100 °C em relação aos filmes sem APE, visto que o APE tem 98,0 % de perda de massa até 100 °C (Figura 17b). Freitas *et al.* (2020) justificaram a presença do extrato de repolho roxo em filmes de acetato de celulose por meio da redução da perda de massa do polímero, o que também é observado neste trabalho. A massa residual dos filmes em até 500 °C foi acrescida com o aumento da FI, uma vez que está associada ao CaCl_2 remanescente e que possui temperatura de decomposição próxima a 1600 °C. Apesar da redução da estabilidade térmica dos filmes de MC, a análise de TGA permitiu confirmar o efeito plastificante promovido pela FI e APE na matriz polimérica, contribuindo para a compreensão dos comportamentos colorimétricos diferenciais dos sensores.

3.2.4 Alteração de cor dos sensores em contato com NH_3

A modificação colorimétrica dos sensores após a detecção NH_3 foi avaliada por meio dos parâmetros L^* , a^* , b^* , C^* , h^* e ΔE^* durante 30 minutos de acondicionamento em dessecadores contendo solução NH_4Cl . A exposição a NH_3 provocou comportamentos colorimétricos diferenciais em função da FI do sistema (Figura 18). No sensor controle a cor alterou do púrpura ao violeta e apresentou a menor variação colorimétrica do parâmetro h^* (matiz). Nos sensores com FI de 25 ou 50 mM houve alteração da cor púrpura ao violeta e depois azul, enquanto com 250 ou 500 mM a

modificação da cor aconteceu do púrpura ao violeta, depois ao azul até o verde acinzentado.

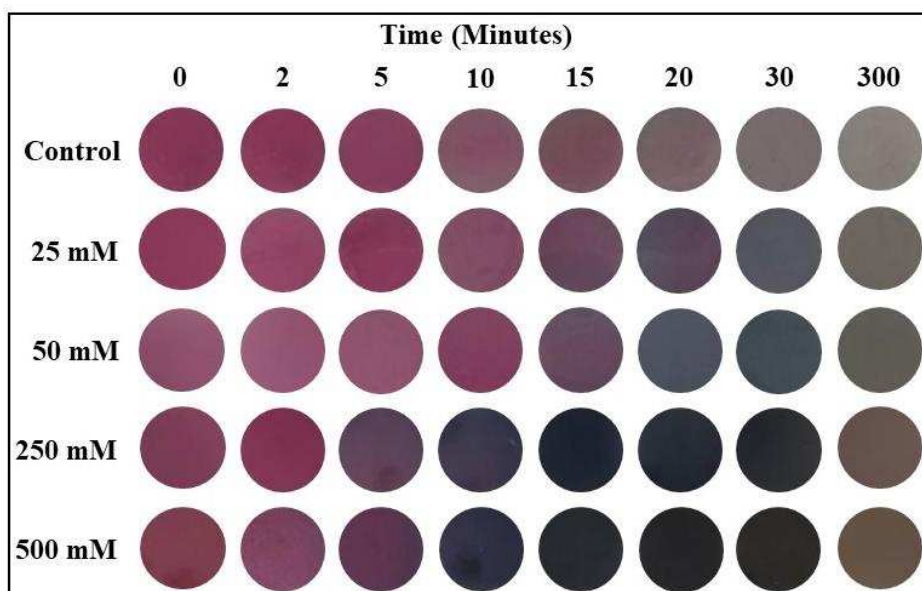


Figura 18. Fotografias dos sensores no tempo inicial e ao longo do tempo de contato com NH_3 por até 300 minutos.

Os gráficos com as coordenadas L^* e b^* não apresentaram comportamento em função do tempo de contato com NH_3 e, portanto, não foram disponibilizadas. Os valores da coordenada a^* iniciaram próximo ao 40 (vermelho) e reduziu até convergir aproximadamente a -5 (verde) (Figura 19a). Essa convergência da coordenada a^* pelos sensores contendo 250 e 500 mM de CaCl_2 ocorreu em apenas 15 minutos e indica a maior sensibilidade a NH_3 em relação aos demais tratamentos. O ganho de sensibilidade a NH_3 pelos sensores é justificado por dois fatores inerentes ao aumento da FI do sistema: acréscimo da quantidade de moléculas de água no sensor e pelo aumento do efeito plastificante.

O aumento do efeito plastificante nos filmes de MC contribui para a maior mobilidade de aditivos hidrofílicos presentes na matriz polimérica, pois eleva a dispersão desses aditivos (aumento da entropia dos aditivos no sistema) e ocorre o acréscimo do volume livre (Wypych, 2017). Esses efeitos facilitam a interação entre as antocianinas com fatores extrínsecos ao sensor como o pH. Dessa forma, nas matrizes com maior volume livre é esperado o maior do coeficiente de difusão das espécies básicas, o que causa o aumento da interação com as antocianinas e resulta

no ganho de sensibilidade dos sensores em ordem crescente de FI ($0 < 25 < 50 < 250 < 500$ mM).

A maior contribuição para o aumento da sensibilidade provavelmente é relacionada à quantidade de moléculas de água total contida nos sensores, pois podem promover o deslocamento do equilíbrio, mostrado na Reação 2, para a formação de espécies básicas (OH^-), de acordo com o princípio de Le Chatelier. Liang, Sun, Cao, Li, & Wang (2019) mostraram a dependência entre a alteração de cores de filmes inteligentes contendo antocianinas do repolho roxo com a umidade do ambiente, no qual o aumento da %UR promoveu a formação de íons OH^- e produziu alterações colorimétricas significativas. O desenvolvimento do ambiente alcalino produz alterações nas estruturas das antocianinas por meio de mecanismos de transferência de prótons, hidratação, tautomerização e isomerização, o que proporciona a variação colorimétrica e possibilita aplicações para o monitorar a qualidade de alimentos por meio do pH (Brouillard, & Dubois, 1977).

Foi verificado pelo princípio de Le Chatelier que o aumento da FI provoca o acréscimo nos valores de pH dos sensores quando em contato com NH_3 e, por isso, justifica a maior sensibilidade dos sensores com 500 mM. Porém, outra contribuição para a ampla variação colorimétrica dos sensores provavelmente deve-se ao fato da formação de copigmentos entre as antocianinas, íons de cálcio e/ou MC. Isso foi confirmado ao variar o pH e verificar o maior deslocamento batocrômico no espectro UV-Vis do APE incorporado nos filmes de MC em relação ao espectro do APE quando presente em solução (Figura 14b, c).

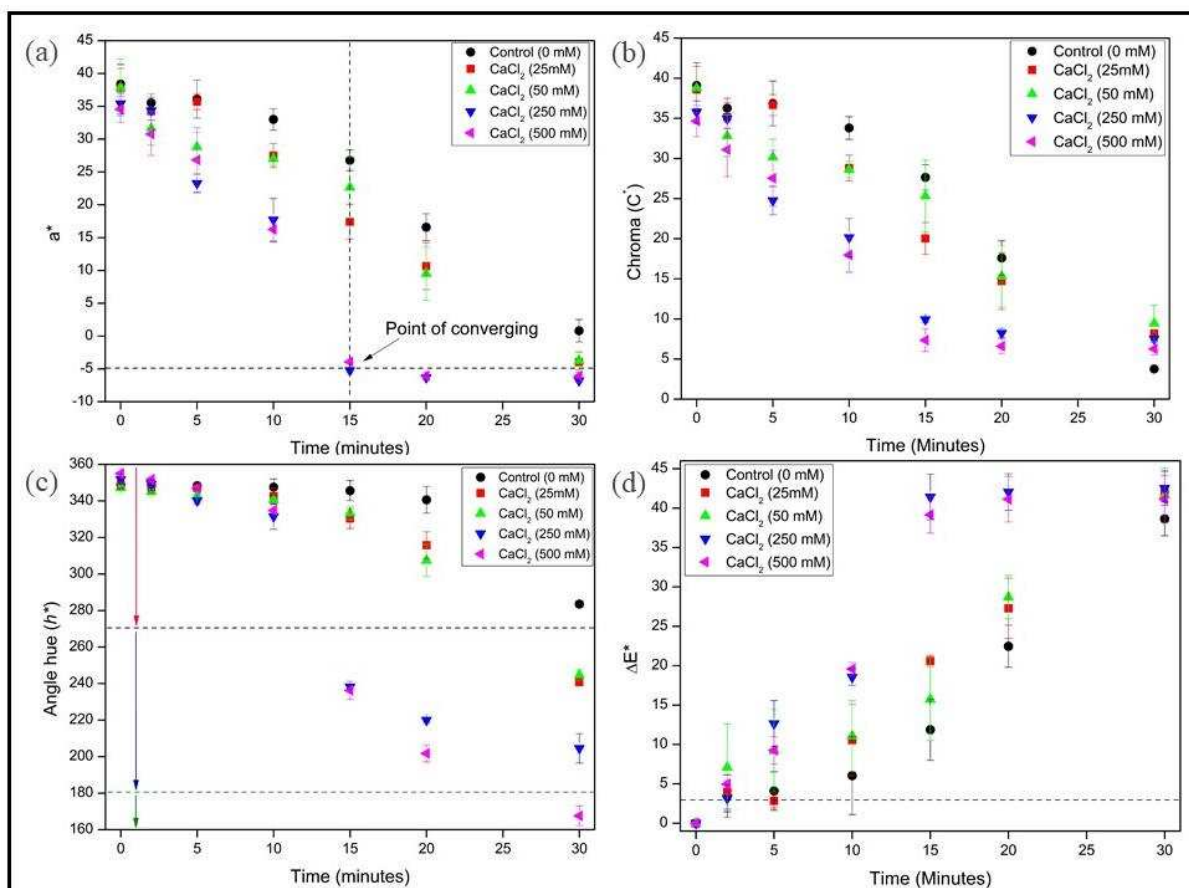


Figura 19. Variação das propriedades de cor a^* (a); C^* (b); h^* (c) e ΔE^* (d) dos sensores durante 30 minutos sob contato com NH_3 nos ensaios in vitro.

Foi observada, em todos os tratamentos, a tendência de redução da saturação das cores (C^*) para valores próximos ao zero ao longo do tempo, ou seja, diminuição dos valores da razão entre a intensidade de uma cor verdadeira em relação à cor cinza (Figura 19b). Essa ocorrência era esperada visto que o aumento do pH reduz a quantidade das espécies do cátion flavílio para formação das estruturas de base quinoidal, hemiacetal e chalconas (Trouillas *et al.*, 2016). Essas estruturas estão em equilíbrio dinâmico e possuem cores que variam entre azul, roxo, verde e amarelo, sendo por meio dessas combinações que ocorre a redução da pureza da cor (C^*).

Ao verificar os valores de h^* dos sensores é confirmado que o acréscimo da FI amplia o espectro das cores nos sensores ao longo do tempo de contato com NH_3 . As linhas tracejadas na Figura 19c mostra o limiar da região que uma cor primaria distingue da outra e confirma que os sensores com 500 mM de FI foram os únicos a alcançarem a cor verde em até 30 minutos. Silva, Mastrantonio, Costa, & de Moraes (2019) incorporaram as antocianinas do mesmo fruto (*Euterpe oleracea* Mart) para

produção de sensores de pH com fibras a base de policaprolactona e óxido de polietileno. Entretanto, foi observado a menor variação de h^* ($61,99^\circ$) em relação a variação produzida pelos sensores com 500 mM de CaCl_2 neste trabalho ($187,42^\circ$).

Sugerimos que essa maior variação colorimétrica dos sensores ao aumentar gradativamente a FI é atribuída a presença de copigmentos desenvolvidos por meio das ligações coordenadas dos cátions metálicos. Tendo em vista que mesmo com a longa exposição do sensor controle a NH_3 (300 minutos) não foi o suficiente para o desenvolvimento de cores próximas ao verde, o que de fato contribui fortemente para a hipótese de formação de copigmentos e/ou complexos ternários. Na Figura 20, mostramos três tipos de copigmentos desenvolvidos pela presença de cátions metálicos e a possibilidade de coexistência desses copigmentos numa única estrutura de antocianina. Dentre as possibilidades de copigmentação, o Cálcio como cátion metálico, por exemplo, pode realizar ligações coordenadas com as antocianinas para produção de metaloantocianinas (chamamos de copigmento Tipo I). Outras possibilidades são a formação de copigmentos ou complexos ternários desenvolvidos por meio de ligações coordenadas entre a antocianina, Cálcio e a MC (copigmentos do Tipo II) ou quando realizam ligações entre antocianinas, Cálcio e compostos fenólicos presentes no APE como o ácido vanílico (copigmento Tipo III).

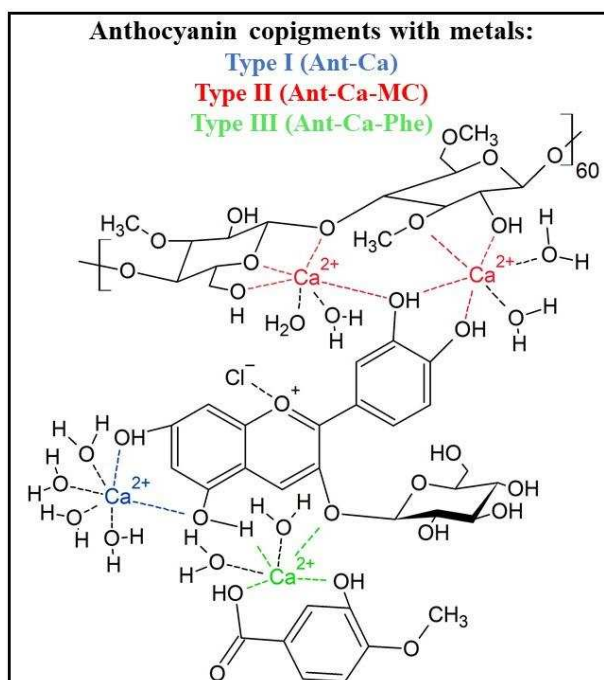


Figura 20. Estruturas de copigmentação das antocianinas com Cálcio (tipo I), Cálcio, antocianinas e MC (tipo II), e/ou Cálcio, antocianinas e compostos fenólicos (tipo III).

De fato, a formação de copigmentos com metais também foram observados por Li *et al.* (2019), no qual mostraram a maior amplitude de variação do espectro de cor da 3-O-glucosil-delfinidina quando houve a formação de complexos binários e ternários com Al (III), em comparação com as cores produzidas pelas antocianinas sem os íons metálicos. O raio iônico e a força de coordenação do íon metálico são outras propriedades que influenciam nos modos de empilhamento molecular dos copigmentos (horário ou anti-horário) e afetam no desenvolvimento da cor e na estabilidade das metaloantocianinas (Yoshida *et al.*, 2015). Aliado a isso, a interação entre íons metálicos e antocianinas também podem ocorrer em grupos carbonilas, além das hidroxilas, o que pode ser importante para a estabilização de um complexo supramolecular com solubilidade aquosa (Tomaya-Kato, Kondo, & Yoshida, 2007).

Um dos requisitos que valida o desenvolvimento efetivo de sensores colorimétricos ópticos é a capacidade do ser humano em reconhecer a alteração da cor após a detecção do analito do interesse. Para isso, a percepção de cores distintas pelo ser humano pode ser correlacionada com a diferença total de cor (ΔE^*) obtida por meio de instrumentos colorimétricos. Mokrzycki & Tatol (2011) sugeriram que a faixa de valores de ΔE^* entre 3,5 e 5,0 são valores que torna possível a percepção de modificação da cor por um observador inexperiente, enquanto valores da $\Delta E^* > 5,0$ indicam a percepção de duas cores distintas.

Os valores de ΔE^* dos sensores foram calculados em relação à cor inicial, ou seja, antes do contato com NH_3 e são mostrados na Figura 19d. Nos ensaios de detecção a NH_3 *in vitro*, os sensores com FI ≥ 50 mM produziram alterações colorimétricas perceptíveis por observadores não treinados em até 5 minutos. Enquanto, nos sensores com FI de 0 e 25 mM foi necessário o tempo de 15 e 10 minutos respectivamente. Essa diferença no tempo de percepção de cores distintas é relacionada a sensibilidade do sensor e pode ser modulada a partir da FI para permitir aplicações no qual é exigida alta, baixa ou específica sensibilidade a NH_3 .

3.2.5 Reversibilidade colorimétrica após a detecção de NH_3

A compreensão do efeito da FI na estabilidade colorimétrica dos sensores ao longo de sete dias após a detecção do analito é imprescindível para avaliar a aplicabilidade como sensor reversível ou irreversível. Para isso foram acompanhadas as variações das coordenadas colorimétricas após o contato com NH_3 por 2 ou 30

minutos durante sete dias sob a presença ou ausência de luz. As alterações colorimétricas dos sensores foram mais significativas na presença da radiação emitida por uma lâmpada de LED. Por isso, mostramos o comportamento de variação da coordenada a^* e o parâmetro ΔE^* sob luz durante sete dias na Figura 21.

O parâmetro a^* mostrou tendência decrescente dos seus valores ao longo do tempo de contato com NH_3 para qualquer tratamento, o que era esperado, visto que o aumento do pH no ambiente provoca a diminuição da quantidade de espécies de cátion flavílio. A ΔE^* foi calculada em relação à cor inicial dos sensores e observados dois diferentes comportamentos ao longo dos sete dias. Os sensores que permaneceram sob dois minutos de contato com NH_3 mostraram a tendência crescente da ΔE^* , enquanto nos sensores expostos durante 30 minutos tiveram a redução dos valores até o primeiro dia e depois a manutenção ao longo dos sete dias.

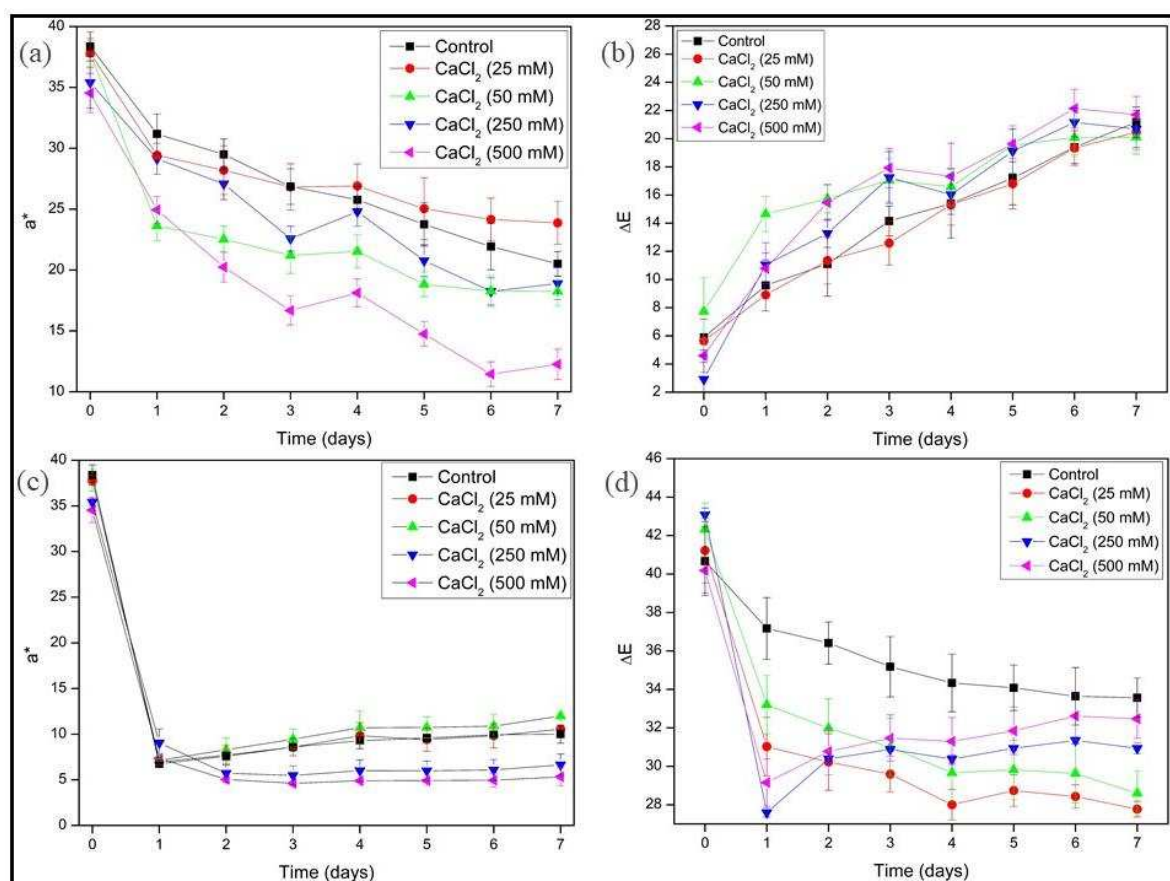


Figura 21. Variação da coordenada a^* durante sete dias sob luz após 2 minutos (a) ou 30 minutos de contato dos sensores com NH_3 (c). Variação do ΔE^* durante sete dias sob luz após 2 minutos (b) ou 30 minutos de contato dos sensores com NH_3 (d).

Ao comparar as fotografias dos sensores no dia 7 e 60 é observado que a quantidade de água na matriz polimérica promovida pela FI é um dos principais fatores, além da alteração do pH, para conversão das espécies de antocianinas no sensor (Figura 22). A exposição dos sensores com FI entre 0 e 50 mM a NH_3 por 2 ou 30 minutos não foram suficientes para alcançar cores próximas ao amarelo/marrom, mesmo após os 60 dias de tempo de equilíbrio no ambiente. Enquanto, nos sensores com FI entre 250 e 500 mM foram observadas cores próximas ao amarelo/marrom, independentemente do tempo de contato com NH_3 . Esses resultados comprovam que a quantidade de moléculas de água contida nos sensores é um fator que influencia na estabilidade das antocianinas em sensores poliméricos.

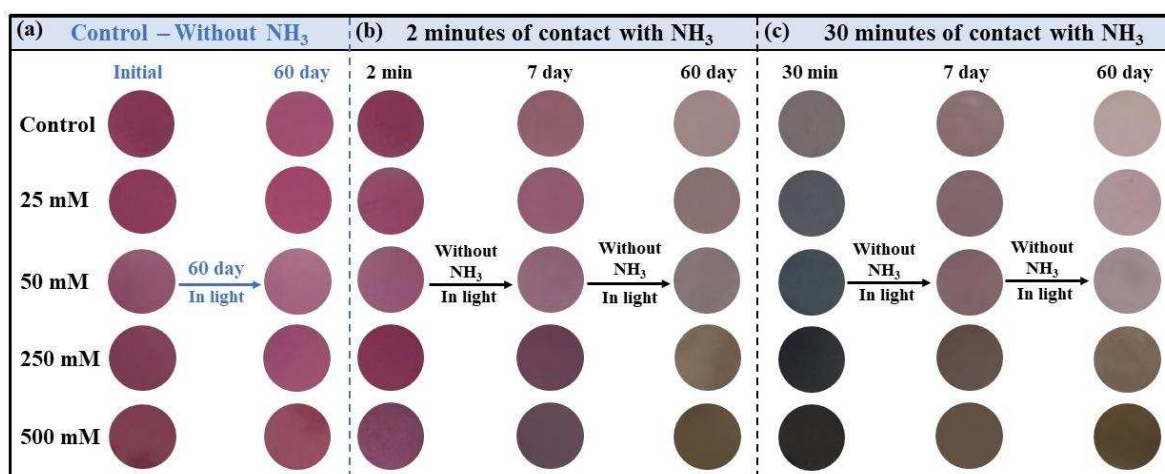


Figura 22. Fotografia dos sensores no tempo inicial e após 60 dias sem contato com NH_3 (a) no sétimo e 60º dia após a exposição dos sensores a NH_3 por 2 (b) ou 30 minutos (c).

Mendoza *et al.* (2017) mostraram que, exceto em meio muito ácido, a hidratação do cátion flavílio acontece na escala de tempo de segundos/minutos e, portanto, é a etapa determinante para a velocidade de conversão entre as espécies cátion flavílio, hemiacetal e cis-chalcona. Isso justifica a menor formação de espécies chalconas, associadas à cor amarelo/marrom, nos sensores com FI ≤ 50 mM mesmo quando exposto a 30 minutos de contato com NH_3 e após 60 dias. Uma vez que nesses sensores existe menor quantidade de moléculas de água e, portanto, a intensidade de um ambiente básico é menor. Enquanto, os sensores com FI de 250 ou 500 mM desenvolveram cor amarelo/marrom quando expostos ao menor tempo de contato com NH_3 e após os 60 dias. Essas diferenças confirmam que a quantidade de

água é o fator limitante para a velocidade de formação das espécies chalconas nos sensores e que os sensores com FI ≥ 250 mM atingem irreversibilidade colorimétrica e alta sensibilidade a espécies básicas (OH^-).

A estabilidade das cores dos sensores após a detecção de NH_3 também foi influenciada pela presença ou ausência da radiação visível. Os sensores armazenados no escuro apresentavam valores de ΔE^* significativamente ($\alpha = 0,05$) menor em relação aos que foram submetidos a luz (Tabela 4). De Rosso & Mercadante (2007) mostraram a existência da dependência entre as antocianinas totais do açaí (*Euterpe oleracea* Mart.) e a radiação visível, no qual houve a redução do tempo de meia vida das antocianinas em solução tampão (pH 2,5) de 6456,2 horas na ausência de luz para 909,1 horas quando expostos à luz.

Tabela 4. Comparação da ΔE^* entre os sensores após 2 ou 30 minutos de contato com NH_3 e submetidos a presença de luz visível ou ausência após sete dias.

Armazenamento*	Controle	25 mM	50 mM	250 mM	500 mM
L2	21,17 ^c	20,46 ^b	20,11 ^d	20,68 ^c	21,70 ^b
	(2,0)	(1,2)	(0,2)	(1,3)	(1,2)
D2	11,91 ^b	4,84 ^c	13,73 ^c	11,26 ^d	18,42 ^b
	(2,4)	(0,6)	(1,5)	(2,9)	(1,3)
L30	34,12 ^a	31,25 ^a	34,81 ^a	39,90 ^a	35,53 ^a
	(2,2)	(2,2)	(1,3)	(2,4)	(0,9)
D30	33,57 ^a	27,77 ^a	28,59 ^b	30,93 ^b	32,46 ^a
	(2,0)	(2,4)	(1,4)	(0,2)	(1,0)

* Sensores submetidos a 2 minutos (L2) ou 30 minutos (L30) de contato com NH_3 e expostos a luz durante sete dias. Sensores submetidos a 2 minutos (D2) ou 30 minutos (D30) de contato com NH_3 e armazenados no escuro durante sete dias. Valores em média de três repetições e desvio padrão (DP). Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si, de acordo com o teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

3.2.6 Principais fatores de desestabilização colorimétrica após detecção de NH_3

A estatística dos efeitos principais foi empregada para determinar a magnitude, direção e a importância dos efeitos na desestabilização da cor após 30 minutos de contato com NH_3 . Os fatores avaliados foram: FI (0 ou 500 mM), tempo de equilíbrio (0 ou 60 dias) e radiação visível (presença - nível 0 ou ausência - nível 1). O tempo de equilíbrio significa a condição ambiente no qual os sensores foram expostos ao

longo dos 60 dias e sem a presença de NH_3 . Os resultados são mostrados no gráfico de probabilidade normal dos efeitos padronizados na Figura 23.

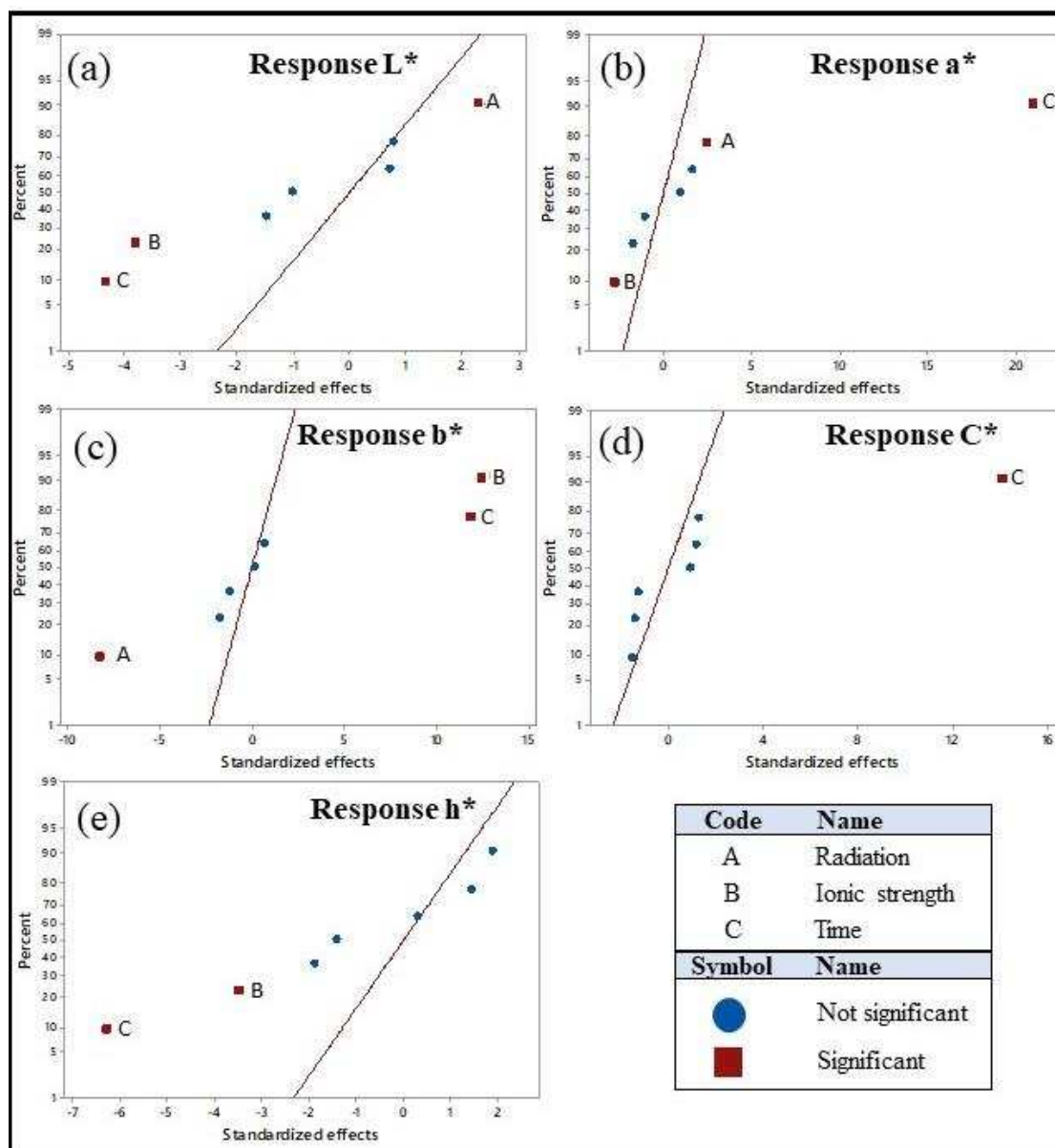


Figura 23. Gráfico normal dos efeitos padronizados para os parâmetros colorimétricos L^* (a), a^* (b), b^* (c), h^* (d) e C^* (e).

Todos os efeitos avaliados apresentaram impacto significativo em alguma propriedade colorimétrica. Especificamente os efeitos de FI (B) e tempo de equilíbrio (C) afetaram todos os parâmetros colorimétricos, com exceção do índice C^* para a FI. Enquanto, o efeito da presença da radiação visível (A) influenciou nos parâmetros L^* , a^* e b^* . A direção dos efeitos nas respostas é avaliada por meio do sinal positivo ou

negativo dos efeitos padronizados em relação ao eixo das abcissas. O valor negativo indica que, à medida que o nível do fator cresce, ocorre a redução da resposta avaliada, enquanto os valores positivos proporcionam o aumento dos valores da resposta. Isso permitiu identificar que o aumento nos níveis do tempo de equilíbrio (60 dias) e da FI (500 mM) reduz os valores do parâmetro L^* e h^* , enquanto aumenta o valor da coordenada b^* .

Em relação à coordenada a^* é visto que a redução da FI produz o aumento dos valores de a^* . Isso mostra coerência ao verificar que os sensores com FI ≤ 50 mM não possuem cores próximas ao verde mesmo após 60 dias. Enquanto, a presença da radiação (nível 0) provocou a redução significativa dos valores de L^* e a^* além do aumento nos valores de b^* . Essas observações estão de acordo com as fotografias obtidas dos sensores ao longo do tempo (Figura 22) e exemplificam a compreensão de cada efeito sob os parâmetros colorimétricos.

A principal informação obtida por essa análise é em relação a magnitude de influência dos efeitos nas respostas colorimétricas. Os principais efeitos são aqueles que possuem a maior distância dos valores de efeitos padronizados em relação ao eixo zero das abcissas (em módulo). Considerando o impacto geral de todos os efeitos nos parâmetros colorimétricos, concluímos que o tempo de equilíbrio (C) é o principal fator para desestabilização das cores após a detecção de NH_3 , seguido pela FI e depois pela presença da radiação visível. Essa análise permitiu compreender quais são os principais fatores que contribuem para a irreversibilidade das cores dos sensores com o intuito avaliar a potencial aplicação em sistemas que possam existir fraudes como, por exemplo, ao romper embalagens liberando as espécies básicas acumuladas no *headspace*.

3.2.7 Estabilidade colorimétrica durante o armazenamento

A alteração colorimétrica do sensor foi avaliada após 60 dias de armazenamento no escuro, sem contato com NH_3 e depois foram utilizados na aplicação em peixes para confirmar a manutenção da funcionalidade colorimétrica. Foram verificadas alterações significativas em quase as propriedades colorimétricas avaliadas (L^* , a^* , b^*) após os 60 dias de armazenamento sob escuro (Tabela 5).

Tabela 5. Parâmetros colorimétricos no primeiro dia de desenvolvimento do sensor (dia 0) e após 60 dias de armazenamento sob escuro.

Sensor	Dia	L*	a*	b*	ΔE^*
Controle	0	71,2 ^a (2,0)	36,8 ^a (2,7)	-7,5 ^b (0,5)	-
	60	55,2 ^b (2,1)	22,9 ^b (2,7)	2,0 ^a (0,5)	23,5 (1,4)
25 mM	0	69,4 ^a (2,3)	38,6 ^a (3,2)	-7,6 ^b (1,1)	-
	60	51,4 ^b (2,6)	33,5 ^a (6,8)	1,2 ^a (0,6)	22,5 (3,7)
50 mM	0	73,0 ^a (2,9)	35,6 ^a (5,5)	-8,4 ^b (0,8)	-
	60	56,5 ^b (4,5)	24,8 ^b (2,9)	1,5 ^a (0,2)	22,3 (3,0)
250 mM	0	68,5 ^a (3,8)	35,1 ^a (2,6)	-5,3 ^b (1,2)	-
	60	48,6 ^b (3,0)	25,8 ^b (1,2)	2,0 ^a (0,1)	19,6 (4,3)
500 mM	0	65,7 ^a (2,3)	35,7 ^a (2,2)	-2,9 ^b (0,1)	-
	60	54,8 ^b (2,7)	21,1 ^b (0,7)	2,5 ^a (1,1)	15,8 (2,4)

*Valores em média com três repetições e desvio padrão (DP). Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si de acordo com o teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

À medida que houve o aumento da FI observou-se a redução da ΔE^* dos sensores ao longo de 60 dias. Entretanto, nos sensores com maior FI era esperado a maior desestabilização das antocianinas e das cores, uma vez que água contribui para a desestabilização das espécies de cátion flavílio. Portanto, esses resultados reforçam a hipótese de que o aumento da FI nos sensores junto com a presença da MC pode contribuir para formação de copigmentos ternários, pois sem essa proteção deveria ser observado a maior ΔE^* dos sensores. Li, Li, Wang, & Jiang (2016) mostraram que os polímeros de maltodextrina, glucomanano konjac e carboximetilcelulose realizaram copigmentação com as antocianinas da batata roxa doce, o que aumentou o tempo de meia vida das antocianinas nos estudos de degradação térmica em temperaturas de 80, 90 e 100 °C.

3.2.8 Aplicação em peixe Lambari

Microrganismos e enzimas endógenas são os responsáveis pela produção de TVB-N e pelo aumento nos valores de pH durante o processo de deterioração de peixes (Vareltzis, Koufidis, Gavrilidou, Papavergou, & Vasiliadou, 1997; Prabhakar, Srivastav, & Pathak, 2019). Esses gases acumulam no *headspace* da embalagem e são responsáveis pela rejeição sensorial e sabores estranhos de produtos de origem animal estragados. O acúmulo dessas aminas voláteis promove o aumento da alcalinidade do ambiente e pode ser correlacionado com o frescor dos peixes. Para

isso, foi monitorada as coordenadas colorimétricas dos sensores ao longo do tempo de degradação peixes tipo Lambari em condições de refrigeração (6 °C e 60 %UR). Os sensores foram fixados na parte superior e interna da embalagem de polietileno-nylon e sem entrar em contato físico com os peixes.

Os resultados dos testes *in situ* indicaram boa correlação entre TVB-N, pH e alterações colorimétricas dos sensores ao longo dos 6 dias de degradação do peixe. Por outro lado, os sensores nas bandejas de controle não mostraram nenhuma alteração de cor significativa mesmo após o armazenamento durante 20 dias (fotografias disponíveis na Figura 2sII do material suplementar). Na Figura 23, mostramos a variação das respostas de TVB-N, pH e o comportamento das coordenadas a^* , b^* e ΔE^* do sensor controle em função do tempo de degradação dos peixes. O valor inicial médio de TVB-N do peixe Lambari foi de 12,52 mg.100 g⁻¹ e atingiu o valor de 38,37 mg.100 g⁻¹ no sexto dia.

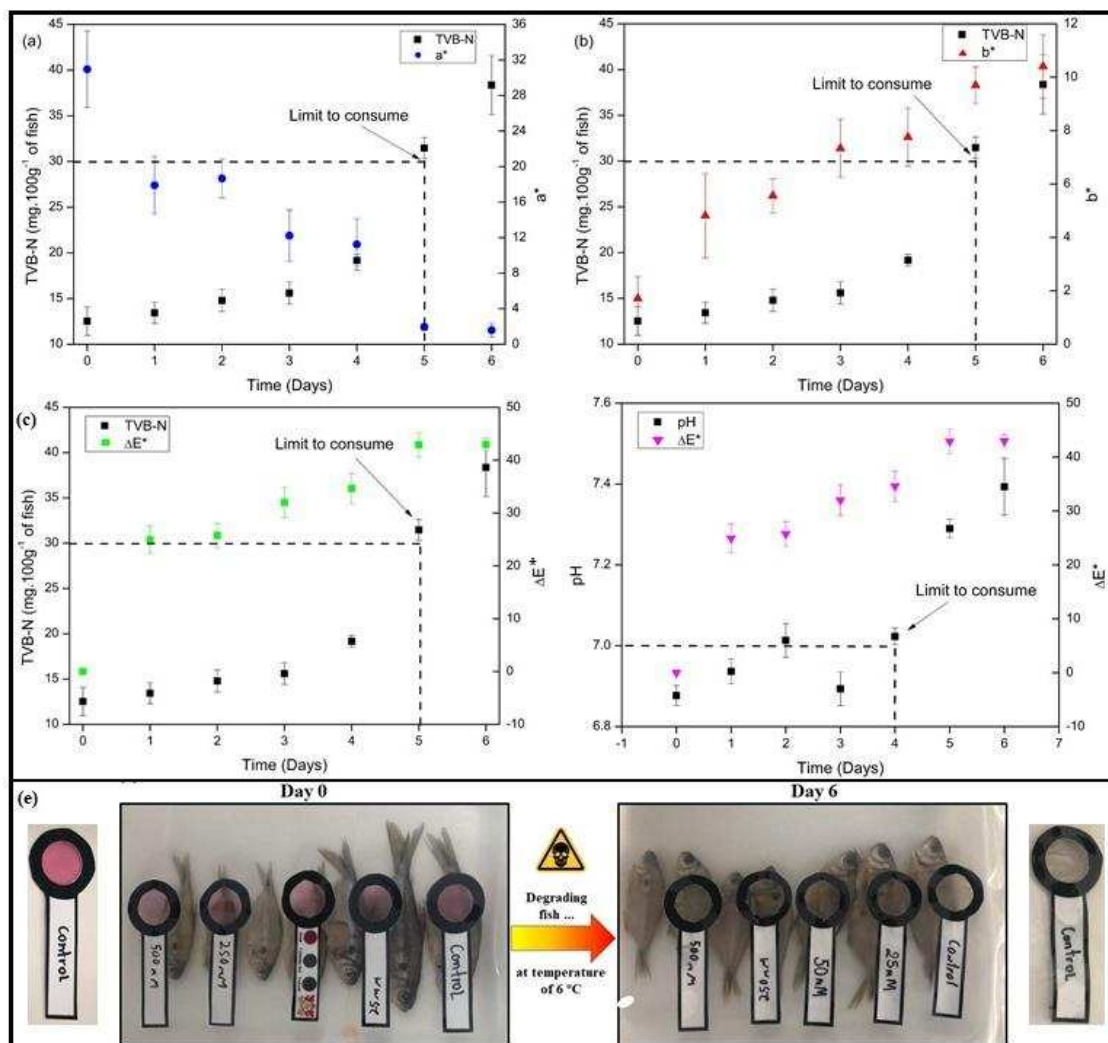


Figura 24. Índice de TVB-N dos peixes e parâmetros a^* (a) ou b^* (b) ou ΔE^* (c) do sensor controle ao longo de seis dias. Valores de pH dos peixes e parâmetro ΔE^* do sensor controle ao longo de seis dias de degradação (d). Fotografia dos peixes Lambari e dos sensores no tempo inicial e após seis dias de armazenamento (e).

O limite superior para o nível de TVB-N de peixes congelados da família Characidae é de 30 mg.100 g⁻¹ de tecido muscular de acordo com o padrão brasileiro estabelecido pelo ministro da agricultura, pecuária e abastecimento (MAPA) e também pelo padrão da União Europeia (Regulamento (CE) nº 2074/2005 (Anexo II) alterado pelo Regulamento (CE) nº 1022/2008). Aliado a isso, o padrão brasileiro estabelecido pelo MAPA indica que o pH máximo para o consumo deve ser de 7,00. Considerando os dois parâmetros de qualidade do peixe, verificamos que o valor de pH indica inadequação para consumo no quarto dia e o TVB-N no quinto dia. Entretanto, o TVB-N é considerado como método padrão para controle de qualidade de peixes e,

também, mostrou a maior correlação com análises sensoriais, em relação ao pH, sendo o mais apropriado para indicar a deterioração da pescados (Antonacopoulos & Vyncke, 1989; Ruiz-Capillas & Moral, 2001).

Ao longo dos seis dias de degradação dos peixes, o parâmetro a^* indicou a tendência de redução dos seus valores, enquanto o parâmetro b^* aumentou. A cor produzida pelo sensor controle no tempo inicial foi rosa e no sexto dia sob efeito de TVB-N foi cinza/marrom (Figura 23e). Em relação ao ΔE^* , o sensor controle produziu diferença significativa (25,2) já após o primeiro dia de contato com o peixe, o que revela o início da alcalinidade no *headspace* da embalagem. A rápida alteração colorimétrica logo após o primeiro dia é uma condição desejada para indicar o frescor dos peixes em estágios iniciais de armazenamento, o que também foi observado por Zhai *et al.* (2017). A distinção de cor no sensor controle ($\Delta E^* > 5,0$) pode ser novamente evidenciada por consumidores somente após o quarto dia, ou seja, quando o alimento superou o limite máximo de TVB-N. Portanto, esse sensor colorimétrico pode ser utilizado como uma tecnologia eficaz no para monitorar, a olho nu e em tempo real, a deterioração de peixes. Aliado a isso, os resultados indicaram a possível separação de três classes colorimétricas e que podem ser correlacionadas com o frescor dos peixes.

3.2.9 Análise de componentes principais (PCA) e discriminante linear (LDA)

A análise de PCA foi realizada para compreender quais dos sensores desenvolvidos possuem capacidade de classificar o frescor dos peixes de acordo com a alteração de cores. Em todas as PCA foi visto que os dois primeiros componentes principais (PCs) explicaram pelo menos 95% da variância dos dados e, portanto, foram suficientes para explicar a variação máxima em todos os dados originais. Na figura 24e é mostrado o gráfico de *loadings* do sensor controle, pois é o tipo de sensor que possui a melhor separação e classificação dos dados colorimétricos em relação ao frescor dos peixes. A coordenada h^* é a variável com maior efeito em PC1 e as variáveis ΔE^* e L^* em PC2.

Os sensores com 0 ou 25 mM foram capazes de separar três grupos por meio da PC1 e associados ao frescor dos peixes do tipo: fresco, meio fresco e estragado. Os dados no dia 0 foram remetidos ao grupo "fresco", enquanto nos dias 1 ao 4 formaram outro grupo como "meio fresco" e os dados restantes nos dias 5 e 6

agruparam o grupo "estragado" de acordo com parâmetros de TVB-N. A PCA confirmou que somente os sensores com FI ≤ 25 mM possuíam capacidade de separar o frescor dos peixes de acordo com as normas brasileiras e europeia (Figura 24a, b).

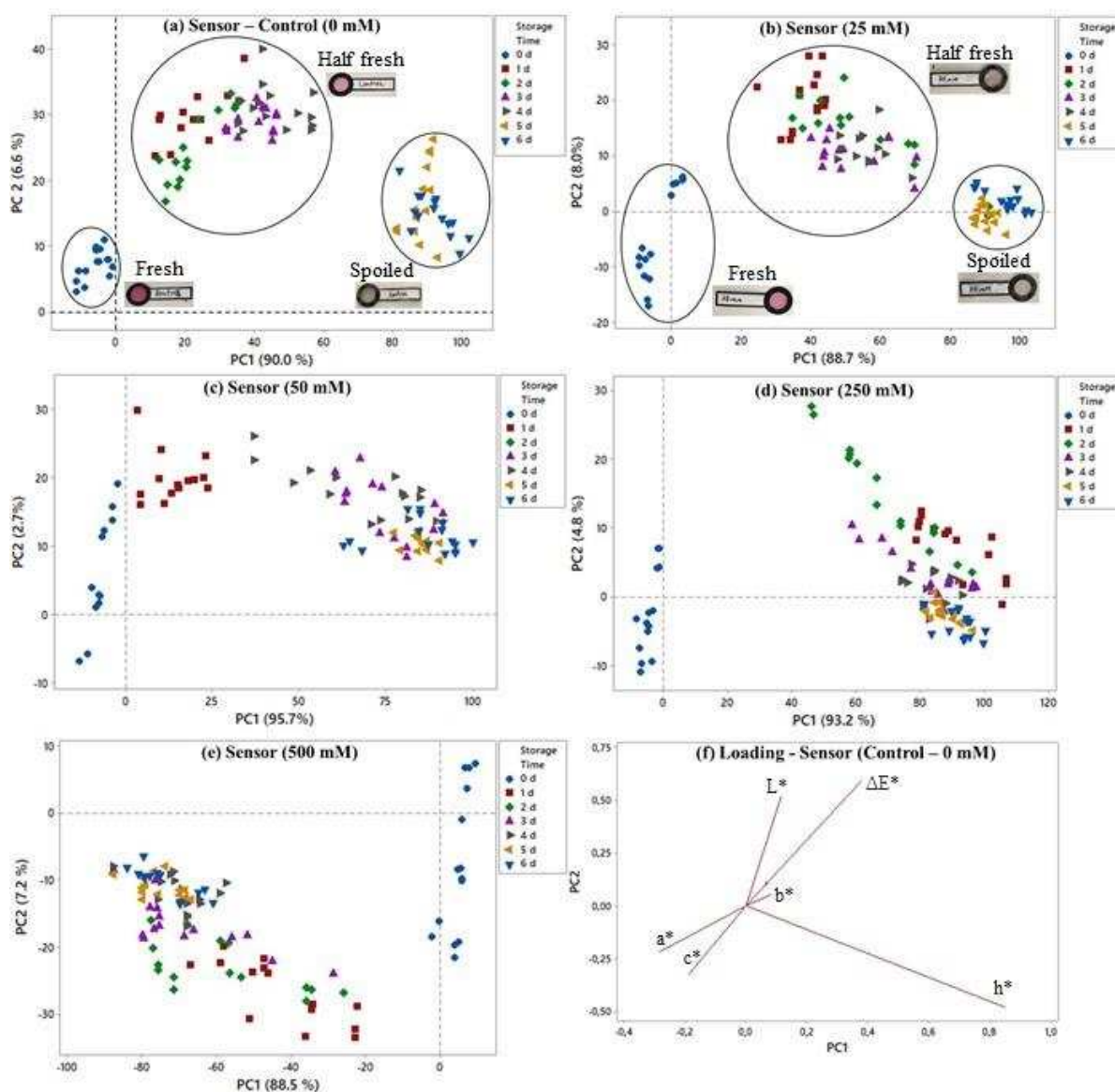


Figura 25. Gráfico de pontuação de análise de componentes principais (PCA) de Lambari em armazenamento refrigerado ao longo do tempo (0, 1, 2, 3, 4, 5, e 6 dias). PCA realizada por meio das coordenadas L^* , a^* , b^* , C^* , h^* e ΔE^* dos sensores com FI de 0 (a), 25 (b), 50 (c), 250 (d) e 500 mM (e). Gráfico de *loading* do sensor controle (f).

Ao aumentar a FI nos sensores, foi observado a menor separação espacial das coordenadas colorimétricas no gráfico de PCA. Isso confirma que os sensores com FI ≥ 50 mM apresentaram alta sensibilidade e são inapropriados para aplicações de monitoramento do frescor de peixes. Visto que a alteração colorimétrica dos sensores ocorreu antes do limite de TVB-N estabelecido por normas brasileiras e europeias ($30 \text{ mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$). Zhai *et al.* (2017) mostraram que a redução na velocidade de alteração colorimétrica pode ser realizada com o aumento no teor de antocianinas incorporadas nos filmes. Entretanto, o inverso não é válido, uma vez que baixas concentrações de antocianinas na matriz polimérica não geram cores com matiz o suficiente para serem observadas alterações a olho nu.

Portanto, mostramos que o emprego da FI é uma opção válida para aumentar a sensibilidade e ampliar a variação do espectro de cores de sensores colorimétricos contendo antocianinas. Um balanço de proporção entre a FI e a concentração das antocianinas utilizando ferramentas estatísticas como a metodologia de superfície de respostas (MSR) podem ser utilizados para adequar a alteração de cores dos sensores próximos ao limite de TVB-N estabelecido em cada legislação.

Realizamos a análise discriminante linear (LDA) para confirmar a exequibilidade de aplicação dos sensores com FI ≤ 25 mM, sendo mostrada a classificação com validação cruzada na Tabela 6. No sensor controle foi observado que 100 % das observações foram colocadas nos grupos corretos e no sensor com 25 mM atingiu-se 98,0 % de proporção correta, enquanto o aumento da FI até 500 mM provocou a redução até 71,8 %.

Tabela 6. Validação cruzada para classificação do frescor de peixes em função da FI dos sensores colorimétricos.

Grupo Designado	Grupo verdadeiro			Proporção total correta
	Fresco	Não fresco	Estragado	
Sensor controle				
Fresco	15	0	0	1,000
Não fresco	0	57	0	
Estragado	0	0	16	
N correto	15	57	16	
Proporção correta	1,000	1,000	1,000	
(Sensor 25 mM)				
Fresco	15	0	0	0,980

Não fresco	0	56	0	
Estragado	0	2	29	
N correto	15	56	29	
Proporção correta	1,000	0,966	1,000	
(Sensor 50 mM)				
Fresco	12	0	0	
Não fresco	0	50	2	
Estragado	0	10	28	0,839
N correto	12	50	28	
Proporção correta	1,000	0,833	0,933	
(Sensor 250 mM)				
Fresco	15	0	0	
Não fresco	0	42	2	
Estragado	0	18	28	0,810
N correto	15	42	28	
Proporção correta	1,000	0,700	0,933	
(Sensor 500 mM)				
Fresco	15	1	0	
Não fresco	0	36	5	
Estragado	0	1	23	0,718
N correto	15	36	23	
Proporção correta	1,000	0,600	0,821	

3.10 Predição de TVB-N e pH por regressão linear múltipla

Anteriormente Moradi, Tajik, Almasi, Forough, & Ezati, (2019) relataram a correlação positiva entre TVB-N de peixes (*Oncorhynchus mykiss* e *Cyprinus carpio*) e ΔE^* de sensores indicadores, obtendo-se modelos polinomiais lineares com $R > 0,815$. De forma semelhante, desenvolvemos modelos com capacidade de predição dos valores atuais de TVB-N e pH em peixe Lambari refrigerado (6 °C / 60 %UR). Para isso, foram avaliados todos os parâmetros colorimétricos dos sensores controle, entretanto somente b^* e h^* tiveram coeficientes significativos para o ajuste do modelo (Tabela 7).

Tabela 7. Regressão multivariada para predição de TVB-N e pH por parâmetros colorimétricos do sensor controle.

Modelo multivariado ^a	p-valor*			R_{aj}^2
	β_b	β_h	Modelo	
TVB-N = 12,46 + 0,387*b – 0,101*h + 0,00418*h ²	0,047	0,000	<0,001	0,964
pH = 6,9036 + 0,02203*b + 0,008216*h	0,000	0,000	<0,001	0,819

^a Os valores obtidos para construção do modelo são médias de 15 repetições.

* Valores-p para o modelo multivariado e para coeficientes de regressão usando o teste t de Student ($\alpha = 0,05$).

Esses modelos multivariados desenvolvidos podem ser empregados em aplicativos de celular, por consumidores, para avaliação do atual nível de frescor dos peixes sem a necessidade de abrir as embalagens. Entretanto, é necessário desenvolver modelos mais robustos por meio da adição de variáveis que alteram as propriedades colorimétricas, como tipo de polímero empregado na embalagem, iluminação local, tipo de celular e condições de armazenamento do peixe (luz, tempo, temperatura e umidade).

4. CONCLUSÃO

Conclui-se que o aumento da força iônica nos sensores promoveu o efeito plastificante na matriz polimérica e pode ser empregada para modular a sensibilidade de detecção de NH_3 e TVB-N. Sugerimos a formação de copigmentos ternários entre antocianinas/cálcio/metilcelulose como um fator para estabilização e ampliação do espectro de cores nos sensores. O tempo de equilíbrio foi o principal fator para desestabilização das cores após a detecção de NH_3 seguido pela força iônica e depois pela presença da radiação visível. Descobrimos que sensores com alteração de cor reversível ou irreversível podem ser obtidos de acordo com a força iônica empregada na matriz polimérica. A vida útil do sensor em relação a capacidade de modificar as cores após a detecção de TVB-N foi mantida por no mínimo 60 dias. Desenvolvemos dois tipos de sensores efetivos para monitorar e classificar o frescor de peixes Lambari de acordo com normas brasileira e europeia. Modelos matemáticos foram ajustados e podem ser utilizados para prever o nível de TVB-N e/ou pH nos peixes Lambari armazenados sob refrigeração. Todos os constituintes utilizados para o desenvolvimento do sensor são naturais e biodegradáveis, o que possibilita a aplicação segura em alimentos e permite avaliar em tempo real e a olho nu o frescor de peixes.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Antonacopoulos, N., & Vyncke, W. (1989). Determination of volatile basic nitrogen in fish: A third collaborative study by the West European Fish Technologists' Association (WEFTA). **Zeitschrift Für Lebensmittel-Untersuchung Und-Forschung**, 189(4), 309–316. doi.org/10.1007/BF01683206

Barbosa, L. C. A. (2007). **Espectroscopia no infravermelho na caracterização de compostos orgânicos**. 1ª ed. Viçosa: Editora UFV. ISBN: 978-85-7269-280-9.

Basílio, N., & Pina, F. (2016). Chemistry and photochemistry of anthocyanins and related compounds: A thermodynamic and kinetic approach. **Molecules**, 21(11), 1502, doi.org/10.3390/molecules21111502

Bendokas, V., Skemiene, K., Trumbeckaite, S., Stanys, V., Passamonti, S., Borutaite, V., & Liobikas, J. (2019). Anthocyanins: From plant pigments to health benefits at mitochondrial level. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, 0(0), 1–14. doi.org/10.1080/10408398.2019.1687421

Bobbio, F. O., Druzian, J. I., Abrão, P. A., Bobbio, P. A., & Fadelli, S. (2000). Identificação e quantificação das antocianinas do fruto do açaizeiro (*Euterpe oleracea* Mart.). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, 20, 388–390.

Brooks, M. S-L.; & Celli, G. B. (2019). Anthocyanins from Natural Sources: Exploiting Targeted Delivery for Improved Health. **Royal Society of Chemistry**, 1ª Ed, p.333, ISBN: 1788012151.

Brouillard, R., & Dubois, J. E. (1977). Mechanism of the Structural Transformations of Anthocyanins in Acidic Media. **Journal of the American Chemical Society**, 99 (5), 1359-1364. doi:10.1021/ja00447a012

Brouillard, R., Wigand, M-C., & Cheminat, A. (1990). Loss of colour, a prerequisite to plant pigmentation by flavonoids. **Phytochemistry**, 29, 3457-60.

Carvalho, A. V., Da Silveira, T. F. F., T., Mattietto, R. de A., De Oliveira, M. do S. P., & Godoy, H. T. (2016). Chemical composition and antioxidant capacity of açai (*Euterpe oleracea*) genotypes and commercial pulps. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, 97(5), 1467–1474. doi.org/10.1002/jsfa.7886

Dangles, O., Elhabiri, M., & Brouillard, R. (1994). Kinetic and thermodynamic investigation of the aluminium-anthocyanin complexation in aqueous solution. **Journal of the Chemical Society Perkin Transactions**, 2, 12, 2587–2596. doi.org/10.1039/p29940002587

De Rosso, V. V., & Mercadante, A. Z. (2007). Evaluation of colour and stability of anthocyanins from tropical fruits in an isotonic soft drink system. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, 8(3), 347–352. doi.org/10.1016/j.ifset.2007.03.008

Dias, A. L. S., Rozet, E., Chataigné, G., Oliveira, A. C., Rabelo, C. A. S., Hubert, P., Rogez, H., & Quetin-Leclercq, J. (2012). A rapid validated UHPLC-PDA method for anthocyanins quantification from *Euterpe oleracea* fruits. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, 907, 108–116. doi.org/10.1016/j.jchromb.2012.09.015

FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. (2003). **Trade Reforms and Food Security**. Chapter 2. Food Security: Concepts and Measurement, 1-315, Available: <http://www.fao.org/3/a-y4671e.pdf> (accessed 03.11.2020).

Fragoso, M. F., Romualdo, G. R., Vanderveer, L. A., Franco-Barraza, J., Cukierman, E., Clapper, M. L., Carvalho, R. F., & Barbisan, L. F. (2018). Lyophilized açai pulp (*Euterpe oleracea* Mart) attenuates colitis-associated colon carcinogenesis while its main anthocyanin has the potential to affect the motility of colon cancer cells. **Food and Chemical Toxicology**, 121, 237–245. doi.org/10.1016/j.fct.2018.08.078

Freitas, P. A. V., Silva, R. R. A., de Oliveira, T. V., Soares, R. R. A., Junior, N. S., Moraes, A. R. F., Pires, A. C. dos S., & Soares, N. F. F. (2020). Development and

characterization of intelligent cellulose acetate-based films using red cabbage extract for visual detection of volatile bases. **LWT - Food Science and Technology**, 132, 109780. doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109780

Fuleki, T., & Francis, F. J. (1968). Quantitative Methods for Anthocyanins. 2. Determination of Total Anthocyanin and Degradation Index for Cranberry Juice. **Journal of Food Science**, 33, 78–83. doi:10.1111/j.1365-2621.1968.tb00888.x

Garzón, G. A., Narváez-Cuenca, C. E., Vincken, J. P., & Gruppen, H. (2017). Polyphenolic composition and antioxidant activity of açai (*Euterpe oleracea* Mart.) from Colombia. **Food Chemistry**, 217, 364–372. doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.08.107

Guo, T., Huang, M., Zhu, Q., Guo, Y., & Qin, J. (2018). Hyperspectral image-based multi-feature integration for TVB-N measurement in pork. **Journal of Food Engineering**, 218, 61–68. doi:10.1016/j.jfoodeng.2017.09.003

Hogan, S., Chung, H., Zhang, L., Li, J., Lee, Y., Dai, Y., & Zhou, K. (2010). Antiproliferative and antioxidant properties of anthocyanin-rich extract from açai. **Food Chemistry**, 118(2), 208–214. doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.04.099

Huang, L., Zhao, J., Chen, Q., & Zhang, Y. (2014). Nondestructive measurement of total volatile basic nitrogen (TVB-N) in pork meat by integrating near infrared spectroscopy, computer vision and electronic nose techniques. **Food Chemistry**, 145, 228–236. doi:10.1016/j.foodchem.2013.06.073

Kang, S., Wang, H., Xia, L., Chen, M., Li, L., Cheng, J., Li, X., Jiang, S. (2019). Colorimetric film based on polyvinyl alcohol/okra mucilage polysaccharide incorporated with rose anthocyanins for shrimp freshness monitoring. **Carbohydrate Polymers**, 115402. doi:10.1016/j.carbpol.2019.115402

Karbowiak, T., Hervet, H., Léger, L., Champion, D., Debeaufort, F., & Voilley, A. (2006). Effect of Plasticizers (Water and Glycerol) on the Diffusion of a Small Molecule in Iota-

Carrageenan Biopolymer Films for Edible Coating Application. **Biomacromolecules**, 7(6), 2011–2019. doi:10.1021/bm060179r

Koossha, M.; Hamed, S. (2019). Intelligent Chitosan/PVA nanocomposite films containing black carrot anthocyanin and bentonite nanoclays with improved mechanical, thermal and antibacterial properties. **Progress in Organic Coatings**, v. 127, p. 338-347. doi:10.1016/j.porgcoat.2018.11.028

Lewis, G. N.; Randall, M.; Pitzer, K. S.; Brewer, L. (1961). **Thermodynamics**. New York, N.Y.: McGraw Hill, p. 723, ISBN: 0070376220 9780070376229.

Li, X., Siddique, F., Silva, G. T. de M., Quina, F., Lischka, H., & Aquino, A. (2019). Quantum Chemical Evidence for the Origin of the Red/Blue Colors of Hydrangea macrophylla Sepals. **New Journal of Chemistry**. doi:10.1039/c9nj00237e

Li, X.-D., Li, J., Wang, M., & Jiang, H. (2016). Copigmentation effects and thermal degradation kinetics of purple sweet potato anthocyanins with metal ions and sugars. **Applied Biological Chemistry**, 59(1), 15–24. doi:10.1007/s13765-015-0140-9

Liang, T., Sun, G., Cao, L., Li, J., & Wang, L. (2019). A pH and NH₃ sensing intelligent film based on Artemisia sphaerocephala Krasch. gum and red cabbage anthocyanins anchored by carboxymethyl cellulose sodium added as a host complex. **Food Hydrocolloids**, 87, 858–868. doi.org/10.1016/j.foodhyd.2018.08.028

Lin, S.-Y., Wang, S.-L., Wei, Y.-S., & Li, M.-J. (2007). Temperature effect on water desorption from methylcellulose films studied by thermal FT-IR microspectroscopy. **Surface Science**, 601(3), 781–785. doi:10.1016/j.susc.2006.11.006

Machado, A. K., Cadoná, F. C., Assmann, C. E., Andreazza, A. C., Duarte, M. M. M. F., dos Santos Branco, C., Zhou, X., de Souza, D. V., Ribeiro, E. E., & da Cruz, I. B. M. (2019). Açaí (*Euterpe oleracea* Mart.) has anti-inflammatory potential through NLRP3-inflammasome modulation. **Journal of Functional Foods**, 56, 364–371. doi.org/10.1016/j.jff.2019.03.034

Mendoza, J., Basílio, N., Dangles, O., Mora, N., Al Bittar, S., & Pina, F. (2017). Binding of the five multistate species of the anthocyanin analog 7- β -D-glucopyranosyloxy-4'-hydroxyflavylium to the β -cyclodextrin derivative captisol. **Dyes and Pigments**, 143, 479–487. doi.org/10.1016/j.dyepig.2017.04.061

Mokrzycki, W. S., & Tatol, M. (2011). Color difference Delta E - A survey. **Machine Graphic & Vision**, 20, 383-411.

Mollaamin, F., & Monajjemi, M. (2020). Thermodynamic and IR Spectral Study of Metal Cations–Anthocyanin Chelation: Mechanism of Formation of Pigments. **Russian Journal of Physical Chemistry A**, 94(9), 1887–1901. doi:10.1134/s0036024420090204

Moradi, M., Tajik, H., Almasi, H., Forough, M., & Ezati, P. (2019). A novel pH-sensing indicator based on bacterial cellulose nanofibers and black carrot anthocyanins for monitoring fish freshness. **Carbohydrate Polymers**, 222, 115030. doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.115030

Nielsen, M. K., & Jørgensen, B. M. (2004). Quantitative: Relationship between trimethylamine oxide aldolase activity and formaldehyde accumulation in white muscle from gadiform fish during frozen storage. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 52(12), 3814–3822. doi.org/10.1021/jf035169l

Noronha, C. M., De Carvalho, S. M., Lino, R. C., & Barreto, P. L. M. (2014). Characterization of antioxidant methylcellulose film incorporated with α -tocopherol nanocapsules. **Food Chemistry**, 159, 529–535. doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.02.159

Ouyang, Q., Wang, L., Zareef, M., Chen, Q., Guo, Z., & Li, H. (2020). A feasibility of nondestructive rapid detection of total volatile basic nitrogen content in frozen pork based on portable near-infrared spectroscopy. **Microchemical Journal**, 105020. doi:10.1016/j.microc.2020.105020

Pasaribu, Y. P., Buyang, Y., Suryaningsih, N. L. S., Dirpan, A., & Djalal, M. (2020). Effect of steaming and pressurized boiling process to the nutrient profile of Papuan cork fish *Channa striata* as potential protein-rich food to prevent stunting. **Medicina Clinica Practica**, 3, 100120. doi.org/10.1016/j.mcpsp.2020.100120

Peixoto, H., Roxo, M., Krstin, S., Wang, X., & Wink, M. (2016). Anthocyanin-rich extract of Acai (*Euterpe precatoria* Mart.) mediates neuroprotective activities in *Caenorhabditis elegans*. **Journal of Functional Foods**, 26, 385–393. doi.org/10.1016/j.jff.2016.08.012

Pompeu, D. R., Silva, E. M., & Rogez, H. (2009). Optimisation of the solvent extraction of phenolic antioxidants from fruits of *Euterpe oleracea* using Response Surface Methodology. **Bioresource Technology**, 100(23), 6076–6082. doi.org/10.1016/j.biortech.2009.03.083

Prabhakar, P. K., Srivastav, P. P., & Pathak, S. S. (2019). Kinetics of Total Volatile Basic Nitrogen and Trimethylamine Formation in Stored Rohu (*Labeo rohita*) Fish. **Journal of Aquatic Food Product Technology**, 28(5), 452–464. doi.org/10.1080/10498850.2019.1604598

Qiao, L., Tang, X., & Dong, J. (2017). A feasibility quantification study of total volatile basic nitrogen (TVB-N) content in duck meat for freshness evaluation. **Food Chemistry**, 237, 1179–1185. doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.06.031

Qin, Y., Liu, Y., Yong, H., Liu, J., Zhang, X., & Liu, J. (2019). Preparation and characterization of active and intelligent packaging films based on cassava starch and anthocyanins from *Lycium ruthenicum* Murr. **International Journal of Biological Macromolecules**, 134, 80–90. doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.05.029

Ratanapoompinyo, J., Nguyen, L. T., Devkota, L., & Shrestha, P. (2017). The effects of selected metal ions on the stability of red cabbage anthocyanins and total phenolic

compounds subjected to encapsulation process. **Journal of Food Processing and Preservation**, 41(6). doi.org/10.1111/jfpp.13234

Rocha, J. C. G., Procópio, F. R., Mendonça, A. C., Vieira, L. M., Perrone, Í. T., de Barros, F. A. R., & Stringheta, P. C. (2018). Optimization of ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds from jussara (*Euterpe edulis* M.) and blueberry (*Vaccinium myrtillus*) fruits. **Food Science and Technology**, 38(1), 45–53. doi.org/10.1590/1678-457x.36316

Rogez, H., Pompeu, D. R., Akwie, S. N. T., & Larondelle, Y. (2011). Sigmoidal kinetics of anthocyanin accumulation during fruit ripening: A comparison between açai fruits (*Euterpe oleracea*) and other anthocyanin-rich fruits. **Journal of Food Composition and Analysis**, 24(6), 796–800. doi.org/10.1016/j.jfca.2011.03.015

Ruiz-Capillas, C., & Moral, A. (2001). Correlation between biochemical and sensory quality indices in hake stored in ice. **Food Research International**, 34(5), 441–447. doi:10.1016/s0963-9969(00)00189-7

Santos-Buelga, C., & González-Paramás. (2018). Anthocyanins. **Reference Module in Food Science**, 1–12. doi.org/10.1016/B978-0-12-814026-0.21609-0

Silva, C. K., Mastrantonio, D. J. S., Costa, J. A. V., & de Moraes, M. G. (2019). Innovative pH sensors developed from ultrafine fibers containing açai (*Euterpe oleracea*) extract. **Food Chemistry**, 294, 397–404. doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.05.059

Silva-Pereira, M. C., Teixeira, J. A., Pereira-Júnior, V. A., & Stefani, R. (2015). Chitosan/corn starch blend films with extract from *Brassica oleraceae* (red cabbage) as a visual indicator of fish deterioration. **LWT - Food Science and Technology**, 61(1), 258–262. doi:10.1016/j.lwt.2014.11.041

Singleton, V. L., & Rossi, J. A. J. (1965). Colorimetry of Total Phenolics with Phosmolybdc-phosphotungstic Acid Reagents. **American Journal of Enology and Viticulture**, 16, 144–158.

Takeda, K., Yamashita, T., Takahashi, A., & Timberlake, C. F. (1990). Stable blue complexes of anthocyanin-aluminium-3-p-coumaroyl- or 3-caffeoyl-quinic acid involved in the blueing of Hydrangea flower. **Phytochemistry**, 29(4), 1089–1091. doi.org/10.1016/0031-9422(90)85409-9

Tang, X., & Ye, Z. (2020). Rapid evaluation of chicken meat freshness using gas sensor array and signal analysis considering total volatile basic nitrogen. **International Journal of Food Properties**, 23 (1), 297–305. doi.org/10.1080/10942912.2020.1716797

Tarone, A. G., Cazarin, C. B. B., & Marostica Junior, M. R. (2020). Anthocyanins: New techniques and challenges in microencapsulation. **Food Research International**, 133. doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109092

Tomaya-Kato, Y., Kondo, T., & Yoshida, K. (2007). Synthesis of designed acylquinic acid derivatives involved in blue color development of hydrangea and their co-pigmentation effect. **Heterocycles**, 72, 239–254. doi.org/10.3987/com-06-s(k)6

Trouillas, P., Sancho-García, J. C., De Freitas, V., Gierschner, J., Otyepka, M., & Dangles, O. (2016). Stabilizing and modulating color by copigmentation: Insights from theory and experiment. **Chemical Reviews**, 116(9), 4937–4982. doi.org/10.1021/acs.chemrev.5b00507

Vareltzis, K., Koufidis, D., Gavriilidou, E., Papavergou, E., & Vasiliadou, S. (1997). Effectiveness of a natural Rosemary (*Rosmarinus officinalis*) extract on the stability of filleted and minced fish during frozen storage. **European Food Research and Technology**, 205(2), 93–96. doi.org/10.1007/s002170050131

Vera de Rosso, V., Hillebrand, S., Cuevas Montilla, E., Bobbio, F. O., Winterhalter, P., & Mercadante, A. Z. (2008). Determination of anthocyanins from acerola (*Malpighia emarginata* DC.) and açai (*Euterpe oleracea* Mart.) by HPLC-PDA-MS/MS. **Journal of Food Composition and Analysis**, 21(4), 291–299. doi.org/10.1016/j.jfca.2008.01.001

Wallace, T. C. (2015). Anthocyanins. **Advances in Nutrition**, 6(5), 620–622. doi.org/10.3945/an.115.009233.Clinical

Wallace, T. C., & Giusti, M. M. (2019). Anthocyanins - nature's bold, beautiful, and health-promoting colors. **Foods**, 8(11), 10–13. doi.org/10.3390/foods8110550

WHO. World Health Organization. (2009). **Implementation of the WHO Global Strategy for Food Safety**. Food And agriculture Organization of The United Nations, 1-7. Available: https://www.who.int/foodsafety/fs_management/No_03_strategy_may09_en.pdf (accessed 03.11.2020).

WHO. World Health Organization. (2015). **Estimates of the global burden of foodborne diseases - Foodborne diseases burden epidemiology reference group 2007-2015**. 1-255. Available: https://www.who.int/foodsafety/publications/foodborne_disease/fergreport/en/ (accessed 03.11.2020).

Wypych, G. (2017). **Handbook of plasticizers**. ChemTec Publishing, 3^a Ed, p.870, ISBN:9781895198973

Yoshida, K., Tojo, K., Mori, M., Yamashita, K., Kitahara, S., Noda, M., & Uchiyama, S. (2015). Chemical mechanism of petal color development of *Nemophila menziesii* by a metalloanthocyanin, nemophilin. **Tetrahedron**, 71(48), 9123–9130. doi:10.1016/j.tet.2015.10.007

Zhai, X., Shi, J., Zou, X., Wang, S., Jiang, C., Zhang, J., Huang, X., Zhang, W., & Holmes, M. (2017). Novel colorimetric films based on starch/polyvinyl alcohol incorporated with roselle anthocyanins for fish freshness monitoring. **Food Hydrocolloids**, 69, 308–317. doi.org/10.1016/j.foodhyd.2017.02.014

Zhu, J., Zhao, A., Feng, L., & Gao, H. (2016). Quorum sensing signals affect spoilage of refrigerated large yellow croaker (*Pseudosciaena crocea*) by *Shewanella báltica*. **International Journal of Food Microbiology**, 217, 146–155. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2015.10.020

MATERIAL SUPLEMENTAR CAPÍTULO I

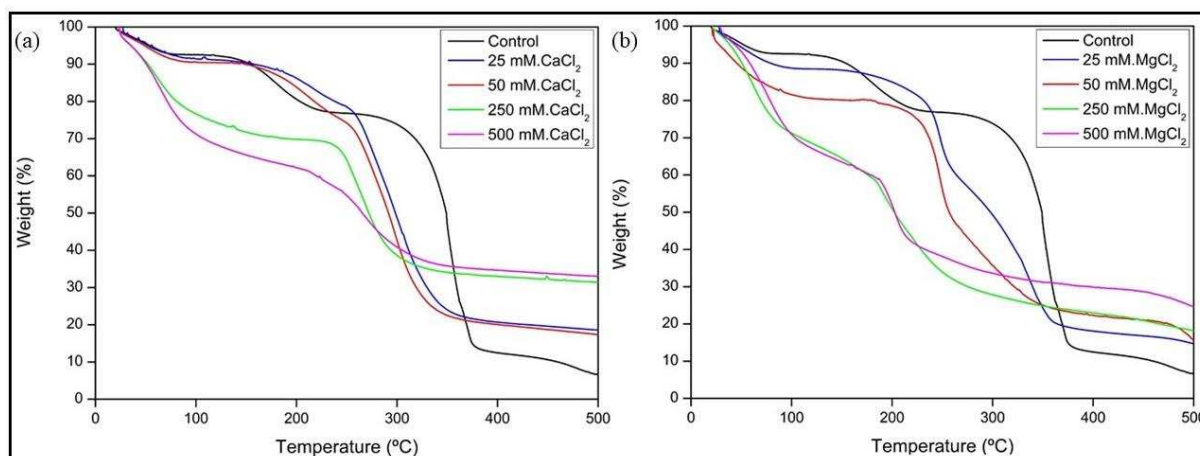


Figura 1sl. Curvas termogravimétricas dos filmes de MC contendo 0, 25, 50, 250 e 500 mM corrigida com CaCl_2 (a) ou MgCl_2 (b).

Tabela 1sl. Equações de regressão ajustadas, valores de falta de ajuste (F_{aj}) e coeficiente de determinação ajustado (R^2_{aj}) para ângulo de contato e propriedades mecânicas de filmes contendo FI de 0, 25, 50, 250 e 500 mM corrigida com CaCl_2 .

Propriedades ^a	Equação ^b	F_{aj} ^c	R^2_{aj} [*]
AC (θ)	$Y_{ac} = 72,02 + 0,1047FI - 0,000139FI^2$	0,845	0,931
Esp(mm)	$Y_{Esp} \times 10^{-4} = 789,9 + 1,971FI$	0,643	0,956
RMT (MPa)	$Y_{ts} = 2,93004 + 41,1202 \times 0,99427^{FI}$	0,095	0,961
EB (%)	$Y_{eb} = 32,68 + 0,4215FI - 0,000493FI^2$	0,111	0,927
YM (MPa)	$Y_{ym} = 3,39367 + 1071,6 \times 0,98673^{FI}$	0,530	0,985

^a AC: Ângulo de contato; Esp: Espessura; TS: Resistência máxima a tração; EB: Elongação percentual até a ruptura; YM: Modulo de elasticidade (Young's).

^b Equações ajustadas significativas ($p < 0,05$) pela ANOVA.

^c F_{aj} : p- valor da falta de ajuste do modelo estatístico.

^{*} R^2_{aj} : Coeficiente de determinação ajustado.

Tabela 2sl. Equações de regressão ajustadas, valores de falta de ajuste (F_{aj}) e coeficiente de determinação ajustado (R^2_{aj}) para ângulo de contato e propriedades mecânicas de filmes com FI de 0, 25, 50, 250 e 500 mM corrigida com MgCl_2 .

Propriedades ^a	Equação ^b	F_{aj} ^c	R^2_{aj} [*]
AC (θ)	$Y_{ac} = 70,38 + 0,1471FI - 0,000177FI^2$	0,807	0,963

Esp(mm)	$Y_{Esp} \times 10^{-4} = 770,7 + 3,002FI$	0,378	0,964
RMT (MPa)	$Y_{ts} = 0,91335 + 40,5993 \times 0,99272^{FI}$	0,019	0,943
EB (%)	$Y_{eb} = 29,94 + 0,5520FI - 0,000753FI^2$	0,010	0,938
YM (MPa)	$Y_{ym} = 1,52567 + 1132,18 \times 0,97956^{FI}$	0,059	0,968

^a AC: Ângulo de contato; Esp: Espessura; TS: Resistência máxima a tração; EB: Elongação percentual até a ruptura; YM: Modulo de elasticidade (Young's).

^b Equações ajustadas significativas ($p < 0,05$) pela ANOVA.

^c F_{aj} : p- valor da falta de ajuste do modelo estatístico.

* R^2_{aj} : Coeficiente de determinação ajustado.

Tabela 3sl. Valores médios das coordenadas de cor L *, a *, b *, Chroma, ângulo Hue e ΔE^* dos filmes contendo EPA contendo FI de 0, 25, 50, 250 e 500 mM corrigida com $CaCl_2$, no tempo inicial (T0) e após contato com NH_3 durante 30 minutos (T30).

Tratamento	L*	a*	b*	C*	H*	ΔE^*
Controle - T0	70,14 (2,50)	38,37 (2,99)	-7,46 (0,52)	39,09 (2,84)	348,91 (1,58)	-
25 mM - T0	70,73 (2,25)	37,83 (2,93)	-7,60 (1,20)	38,60 (2,86)	350,80 (2,02)	-
50 mM - T0	73,39 (1,81)	37,82 (1,15)	-8,50 (0,43)	38,77 (1,01)	347,21 (1,22)	-
250 mM - T0	68,94 (1,06)	37,79 (4,30)	-4,79 (1,15)	35,78 (1,38)	351,78 (2,72)	-
500 mM - T0	67,34 (1,99)	34,53 (1,03)	-3,02 (1,71)	34,66 (1,24)	354,97 (2,66)	-
Control – T30	77,68 (5,61)	1,64 (1,29)	-3,26 (0,77)	3,80 (0,10)	297,05 (22,92)	39,60 (1,85)
25 mM – T30	72,74 (3,81)	-3,98 (1,55)	-7,04 (0,48)	8,18 (0,39)	240,80 (11,16)	41,62 (3,47)
50 mM – T30	73,86 (1,79)	-3,74 (1,34)	-8,51 (2,73)	9,44 (2,24)	244,57 (12,30)	41,62 (3,47)
250 mM – T30	64,44 (2,02)	-6,79 (0,22)	-3,15 (1,05)	7,50 (0,23)	204,51 (8,04)	42,52 (2,16)
500 mM – T30	62,96 (1,89)	-6,10 (0,96)	1,26 (0,75)	6,27 (0,77)	167,56 (8,67)	41,13 (2,98)

Tabela 4sl. Valores médios das coordenadas de cor L *, a *, b *, Chroma, ângulo Hue e ΔE^* dos filmes contendo EPA contendo FI de 0, 25, 50, 250 e 500 mM corrigida com $MgCl_2$, no tempo inicial (T0) e após contato com NH_3 durante 30 minutos (T30).

Tratamento	L*	a*	b*	C*	H*	ΔE^*
Controle - T0	70,14 (2,50)	38,37 (2,99)	-7,46 (0,52)	39,09 (2,84)	348,91 (1,58)	-
25 mM - T0	70,73 (2,25)	37,83 (2,93)	-7,60 (1,20)	38,60 (2,86)	350,80 (2,02)	-
50 mM - T0	73,39 (1,81)	37,82 (1,15)	-8,50 (0,43)	38,77 (1,01)	347,21 (1,22)	-
250 mM - T0	68,94 (1,06)	37,79 (4,30)	-4,79 (1,15)	35,78 (1,38)	351,78 (2,72)	-
500 mM - T0	67,34 (1,99)	34,53 (1,03)	-3,02 (1,71)	34,66 (1,24)	354,97 (2,66)	-
Control – T30	77,68 (5,61)	1,64 (1,29)	-3,265 (0,77)	3,80 (0,10)	297,05 (22,92)	39,60 (1,85)
25 mM – T30	20,23 (0,25)	-4,81 (0,77)	1,51 (0,57)	5,05 (0,90)	162,86 (3,63)	34,67 (0,77)
50 mM – T30	28,39 (0,09)	-3,94 (0,31)	2,31 (0,36)	4,57 (0,45)	149,65 (1,93)	32,99 (2,96)
250 mM – T30	27,04 (2,21)	-2,83 (0,26)	1,78 (0,35)	3,34 (0,40)	148,04 (2,76)	27,55 (2,00)
500 mM – T30	26,80 (0,50)	-1,26 (0,15)	2,35 (0,07)	2,67 (0,14)	118,09 (2,15)	49,98 (1,94)

MATERIAL SUPLEMENTAR CAPITULO II

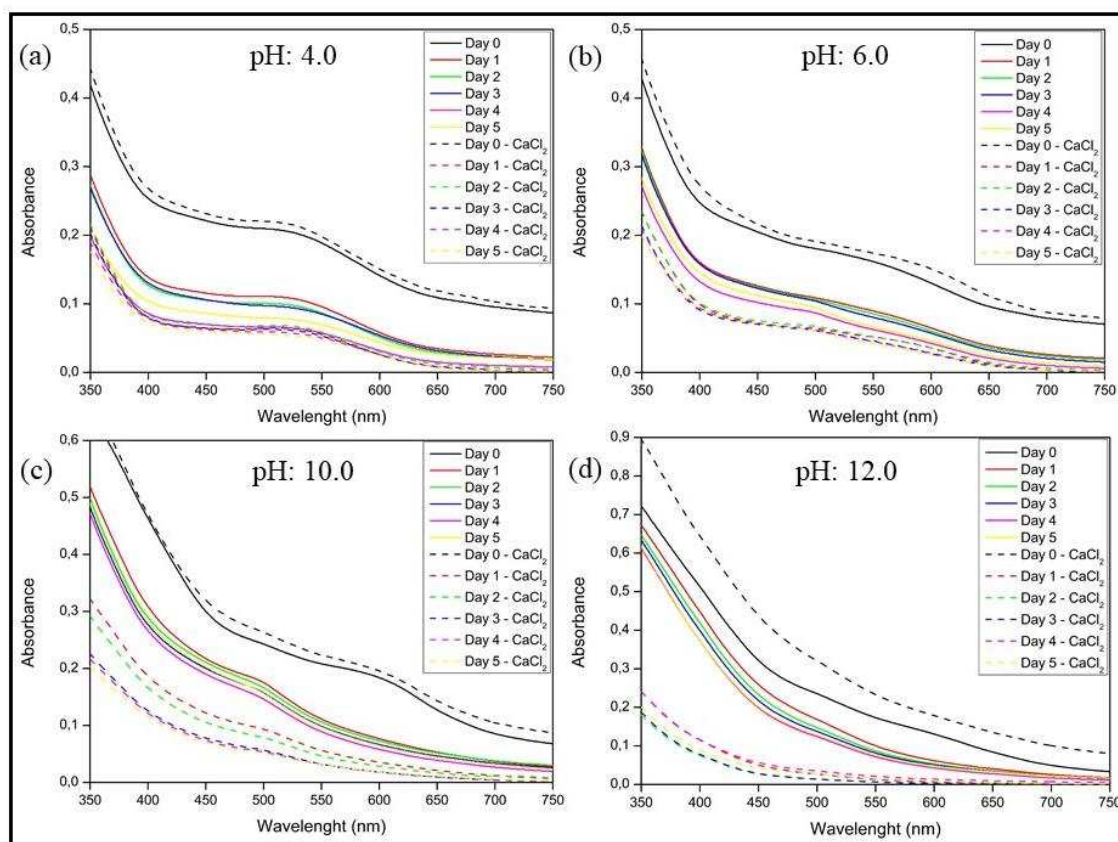


Figura 1sII. Espectros UV-Vis da solução de APE no pH 4 (a), 6 (b), 8 (c) e 10 (d) com 0 ou 500 mM corrigida com CaCl_2 ao longo de 5 dias

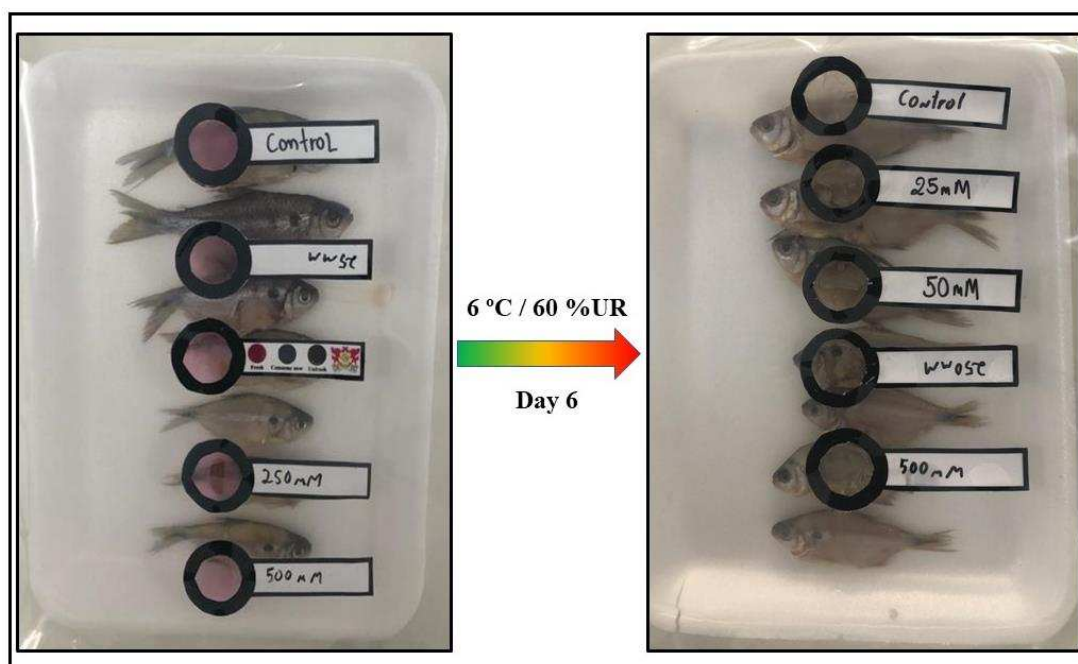
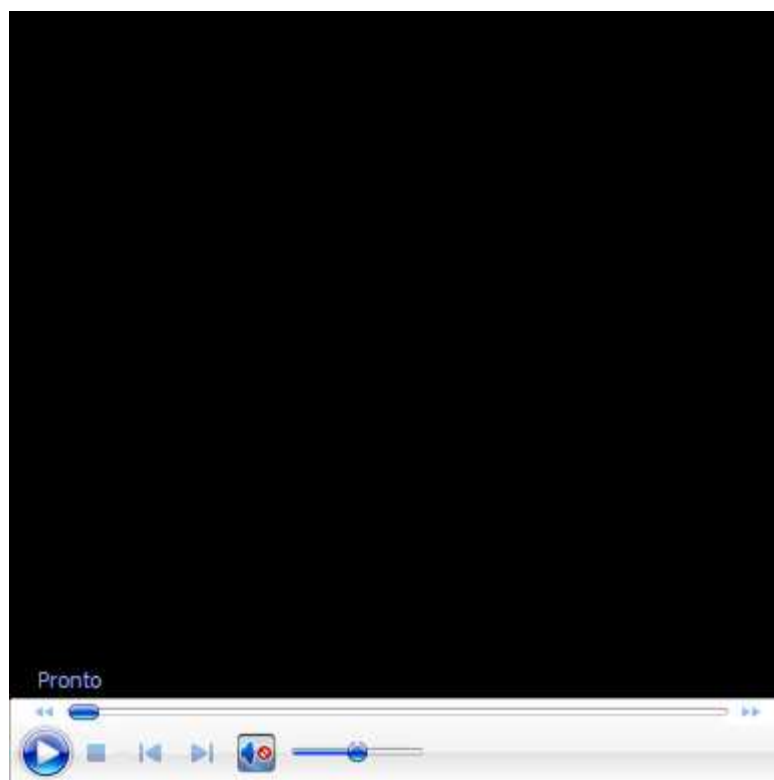


Figura 2sII. Fotografia dos sensores em bandejas de poliestireno contendo peixe tipo Lambari no dia 0 e após seis dias sob armazenamento sob 6 °C e 60 %UR.

ANEXO I



Vídeo 1. Vídeo acelerado da alteração colorimétrica dos sensores contendo 500 mM do sistema corrigido com MgCl_2 (esquerda) e controle (direita) sob contato com NH_3 durante 25 minutos.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

No capítulo I foi compreendido o impacto da força iônica do sistema e raio iônico de sais divalentes nas propriedades físico-químicas dos filmes de metilcelulose. Dentre a faixa de valores da força iônica estudada, foi observado dois comportamentos distintos: um efeito plastificante e outro de reticulação. Quando incorporado sais para obtenção da força iônica de 50 mM do sistema indicamos a formação de reticulação entre as cadeias de metilcelulose, enquanto ao aumentar significativamente a força iônica (250 e 500 mM) foi verificado o efeito plastificante por meio da absorção e retenção de moléculas de água na matriz polimérica. Mostramos que a alteração da FI nos polímeros funcionalizados com antocianinas pode ser utilizada para modular a sensibilidade de detecção a NH_3 e que, possivelmente, pode ser uma estratégia para melhorar a difusão ou atividade de outros compostos ativos em embalagens ativas.

No capítulo II foi desenvolvido e caracterizado sensores colorimétricos para monitorar o frescor de peixes Lambari. A incorporação de cloreto de cálcio nesses sensores aumentou a sensibilidade de detecção a amônia e, como resposta, produziu alterações colorimétricas em menor tempo. Indicamos o cálcio como elemento essencial para a formação de copigmentos ternários entre antocianinas/cálcio/metilcelulose e, devido a isso, houve a ampliação do espectro de cores dos sensores. O desenvolvimento de sensores reversíveis ou irreversíveis pode ser obtido em função da força iônica empregada na matriz polimérica. Ferramentas estatísticas multivariadas validaram a aplicação dos sensores para o monitoramento do frescor de peixes.

De forma geral, mostramos a importância em compreender e controlar os fatores extrínsecos à matriz polimérica para assegurar o desenvolvimento de materiais com propriedades homogêneas e de interesse. Aliado a isso, todos os materiais desenvolvidos neste trabalho possuem natureza renovável, sustentável e biodegradável, o que sugere excelente potencial para aplicação em alimentos e contribui para a redução do impacto ambiental no planeta.

PERSPECTIVAS FUTURAS

1. Avaliar o impacto dos sais clorados em outros biopolímeros susceptíveis a interações eletrostáticas como na carboximetilcelulose de sódio e também em biopolímeros proteicos como queratina e zeína e no qual podem afetar a conformação das proteínas por meio da força iônica.
2. Dispersar polímeros como a metilcelulose em valores de pH acima e abaixo do pKa e avaliar o efeito da força iônica nas propriedades físico-químicas dos filmes e no desenvolvimento de filmes ativos e inteligentes. Além disso, indicamos que a ordem de adição do plastificante, seja antes ou depois dos sais, podem desenvolver interações intermoleculares diferenciais, sendo apropriado compreender esse impacto nas propriedades físico-química dos filmes.
3. Foi observado a alteração na viscosidade da suspensão dos polímeros com diferente força e raio iônico (percepção visual humana). Portanto, surge a oportunidade de avaliar e correlacionar as propriedades reológicas da dispersão contendo metilcelulose e os sais clorados com as propriedades físicas e mecânicas dos filmes.
4. Foi mostrado e indicado a possível formação de copigmentos. Diante disso, sugerimos avaliar o ganho de estabilidade das antocianinas, cinética de degradação e o potencial de copigmentação entre metilcelulose, antocianinas e sais metálicos (cálcio, magnésio, sódio). Tendo em vista que a metilcelulose é comumente utilizada como espessantes em alimentos e pode ser uma alternativa para o aumento da estabilidade de corantes naturais e, por conseguinte, substituição de corantes sintéticos.
5. Para confirmar que a estabilidade das antocianinas está majoritariamente associada a quantidade de moléculas de água e não a possíveis interações com resíduos carregados da matriz polimérica, indicamos que novos experimentos com polímeros não carregados sejam realizados. Aliado a isso, é importante que haja variação da quantidade de moléculas de água na matriz polimérica para que seja compreendido esse efeito.
6. Realizar análise sensorial por meio de observadores treinados e não treinados aplicada na visualização de cores em sensores para determinar o valor limiar que distingue duas cores. Trabalhos envolvendo especificamente as cores de sensores não foram encontradas na literatura e são importantes para validar o desenvolvimento de sensores colorimétricos.
7. Estudar o comportamento de variação colorimétrica dos sensores e desenvolver modelos mais robustos para prever o frescor e o índice de TVB-N de produtos cárneos em função de variáveis de armazenamento, como temperatura, umidade e longo tempo de armazenamento.