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

SENSOR COLORIMÉTRICO COM ANTOCIANINAS APLICADO A EMBALAGENS INTELIGENTES PARA DETECÇÃO DO ESTADO DE CONSERVAÇÃO DE CARNES SUÍNAS VIA ALTERAÇÃO DO pH

ISABELA DE FÁTIMA SILVA VIDAL

OURO BRANCO - MG
2021

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

SENSOR COLORIMÉTRICO COM ANTOCIANINAS APLICADO A EMBALAGENS INTELIGENTES PARA DETECÇÃO DO ESTADO DE CONSERVAÇÃO DE CARNES SUÍNAS VIA ALTERAÇÃO DO pH

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de São João Del-Rei, em caráter de defesa, como pré-requisito para a obtenção do grau de mestre.

Orientador:
Prof. Dr. Igor José Boggione Santos

OURO BRANCO – MG
2021

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

NOMEAÇÃO DE BANCA EXAMINADORA Nº 3 / 2021 - PPGEQ (13.13)

Nº do Protocolo: 23122.003384/2021-74

Ouro Branco-MG, 05 de fevereiro de 2021.

MEMBROS DA BANCA EXAMINADORA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE **ISABELA DE FÁTIMA SILVA VIDAL**, APRESENTADA AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO JOÃO DEL-REI, EM 05 DE FEVEREIRO DE 2021.

BANCA EXAMINADORA:

"Assinado por concordância com Ata de Defesa realizada por videoconferência"

Prof. Dr. José Antônio de Queiroz Júnior

DEQ/UFV

(Assinado digitalmente em 06/02/2021 13:26)
DALILA MOREIRA DA SILVEIRA
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR
COENQ (12.57)
Matrícula: 1615536

(Assinado digitalmente em 08/02/2021 14:07)
IGOR JOSE BOGGIONE SANTOS
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR
CEBIO (12.50)
Matrícula: 2255060

(Assinado digitalmente em 08/02/2021 14:09)
PATRICIA DA LUZ MESQUITA
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR
DEQUI (12.29)
Matrícula: 1810303

Para verificar a autenticidade deste documento entre em **https://sipac.ufsj.edu.br/public/documentos/index.jsp** informando seu número: **3**, ano: **2021**, tipo: **NOMEAÇÃO DE BANCA EXAMINADORA**, data de emissão: **05/02/2021** e o código de verificação: **d4d95ffdb8**

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

V648s

Vidal, Isabela de Fátima Silva.
Sensor Colorimétrico com Antocianinas Aplicado a Embalagens Inteligentes para Detecção do Estado de Conservação de Carnes Suínas via Alteração do pH / Isabela de Fátima Silva Vidal ; orientador Igor José Boggione Santos. -- Ouro Branco, 2021.
83 p.

Dissertação (Mestrado - Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química) -- Universidade Federal de São João del-Rei, 2021.

1. Embalagens Inteligentes. 2. Sensores Colorimétricos. 3. Indicadores de pH. I. Santos, Igor José Boggione , orient. II. Título.

Agradecimentos

Agradeço a Deus, que mesmo diante de uma jornada tão conturbada e com tanto barulho interno, silenciou e aquietou meu coração para que o trabalho fosse finalizado.

Agradeço aos meus pais e irmão, que foram suporte, alento e compreensão nos dias mais exaustivos e nos momentos em que pensei em desistir. Eles são a razão dessa caminhada vitoriosa rumo ao título de mestra.

Ao meu orientador, Dr. Igor Boggione, pela sabedoria repassada e toda a paciência demonstrada diante do momento difícil que enfrentei ao longo dessa jornada.

Aos amigos do Nanotec, pelo apoio, receptividade e carinho que comigo tiveram, desde meu ingresso no grupo até o fim do mestrado.

Agradeço ainda aos meus amigos do peito, que tantas vezes ouviram meus lamentos e me ampararam nos momentos de maior desgaste emocional.

Aos membros da banca, que se dispuseram a entender essa pesquisa e acrescentar seus valorosos conhecimentos para que a excelência no trabalho fosse alcançada.

Aos laboratórios da Universidade Federal de Viçosa e Universidade Federal de São João del-Rei, que colaboraram para que não faltassem os insumos necessários ao desenvolvimento da pesquisa e possibilitaram a realização de análises e caracterizações do material desenvolvido.

À CAPES, por sua importância no fomento da pesquisa brasileira, em especial, nos programas de pós-graduação das universidades públicas.

Enfim, agradeço a cada um que colaborou para que o estudo fosse desenvolvido e essa dissertação tomasse corpo, pois ela é uma parte de mim: do meu suor, do meu esforço e, principalmente, da minha resiliência.

Resumo

A carne suína, atualmente, é uma das proteínas de origem animal mais consumidas no mundo devido ao seu alto valor nutricional e baixo custo. No entanto, trata-se de um alimento perecível, apresentando prazo de validade reduzido diante de condições favoráveis ao crescimento microbiano. Nesse sentido, a embalagem inteligente surge como alternativa capaz de aumentar a conservação e proteção do produto e evitar alterações em suas propriedades organolépticas, validando a segurança de consumo. A incorporação de pigmentos em materiais para a produção de embalagens inteligentes se apresenta como alternativa para identificação de alterações no estado de conservação de um alimento, pela mudança de coloração da embalagem. Nesse estudo, um filme colorimétrico aplicado a embalagens inteligentes foi produzido com composição de carboximetilcelulose, glicerol e antocianinas extraídas do subproduto do arroz negro, para detecção do estado de conservação de carnes suínas. Sistemas filme/carne foram expostos a duas condições distintas: temperatura ambiente (25 °C) e refrigeração, a fim de se investigar alterações na coloração dos filmes em função da deterioração da carne. Parâmetros colorimétricos foram determinados para avaliação do comportamento dos filmes e mudanças visuais foram claramente perceptíveis à medida que o processo de degradação do alimento avançava. Para os sistemas expostos à 25 °C, o filme de coloração avermelhada em um pH de 6,05 ± 0,01, tornou-se roxo-azulado em um pH de 6,52 ± 0,01 e amarelo para um pH de 7,00 ± 0,08. Os filmes armazenados à 4 °C mudaram da coloração avermelhada em um pH de 6,01 ± 0,02 para roxo-azulado em um pH de 6,58 ± 0,01 e tornaram-se amarelados em um pH de 7,12 ± 0,01. Posteriormente, foram realizados testes de caracterização do filme desenvolvido, com valores médios de resistência à tração de 20,28 ± 2,53 MPa, deformação na ruptura de 28,66 ± 0,05%, modulo de elasticidade de 76,32 ± 16,51 MPa e espessura entre 118,80 ± 17,94 e 192,60 ± 8,52 µm. Gramatura e permeabilidade ao vapor d'água apresentaram valores médios de 176,05 ± 2,30 $g \cdot m^{-2}$ e 2,30 ± 0,06 $g \cdot mm \cdot dia^{-1} \cdot kPa^{-1} \cdot m^{-2}$, respectivamente. As análises térmicas de termogravimetria e calorimetria exploratória diferencial demonstraram que o material apresenta estabilidade térmica. O sensor produzido demonstra potencial aplicação em embalagens inteligentes para indicação do estado de preservação de carnes suínas.

Palavras-chaves: *embalagem inteligente, preservação, deterioração, filme colorimétrico, antocianinas.*

Abstract

Nowadays, pork is one of the most consumed animal proteins in the world due its high nutritional value and low cost. However, it is a perishable food which has a shorter shelf life due the favorable conditions for microorganism growth. In this sense, intelligent packaging emerges as an alternative to improve preservation and protection and avoid property alterations in food, ensuring its security. The incorporation of pigments in materials to produce intelligent packaging, is an alternative to identify changes in food conservation conditions by color modification in packaging. In this work, a colorimetric film applied to intelligent packaging was produced based in carboxymethylcellulose, glycerol, and anthocyanins extracted from black rice byproduct to detect freshness condition of pork. Systems film/meat were exposed to room temperature and refrigeration to investigate coloring film changes in function of pork loin deterioration. Colorimetric parameters were defined to study film behavior and it was possible to clearly perceive visual alterations according to the progress in the pork decomposition process. To the systems exposed to 25 °C, the reddish film at a pH of 6.05 ± 0.01 became bluish-purple at a pH of 6.52 ± 0.01 and yellow at a pH of 7.00 ± 0.08. Films stored at 4 °C turned from reddish at a pH of 6.01 ± 0.02 to bluish-purple at a pH of 6.58 ± 0.01 and then to yellowish at a pH of 7.12 ± 0.01. Posteriorly, some characterization tests were performed with average values to tensile strength of 20.28 ± 2.53 MPa, elongation of 28.66 ± 0.05%, elastic modulus of 76.32 ± 16.51 MPa, and thickness between 118.80 ± 17.94 and 192.60 ± 8.52 µm. Grammage and water vapor permeability exhibited average values of 176.05 ± 2.30 $g \cdot m^{-2}$ e 2.30 ± 0.06 $g \cdot mm \cdot dia^{-1} \cdot kPa^{-1} \cdot m^{-2}$, respectively. Thermal analyzes like thermogravimetry and differential exploratory calorimetry have shown that the material has thermal stability. The developed sensor demonstrated potential application to indicate preservation conditions of pork in intelligent packaging.

Keywords**:** *intelligent packaging, preservation, deterioration, colorimetric film, anthocyanins.*

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS ..... **IV**

LISTA DE TABELAS ..... **VII**

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS ..... **VII**

1. INTRODUÇÃO **8**

2. OBJETIVOS **10**

2.1. Objetivo Geral **10**

2.2. Objetivos Específicos **10**

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA **11**

3.1. Função das Embalagens de Alimentos **11**

3.2. Embalagens Sustentáveis **12**

3.3. Embalagens Ativas e Inteligentes **14**

3.3.1. Embalagens Ativas **14**

3.3.2. Embalagens Inteligentes **15**

3.4. Embalagens Inteligentes na Indústria das Carnes **20**

3.4.1. Indicadores de Crescimento Microbiano em Carnes **22**

3.5. Deterioração das Carnes **23**

3.6. Corantes Naturais como Sensores Colorimétricos **25**

3.7. Produção de Filmes Poliméricos **26**

3.8. Carboximetilcelulose (CMC) **29**

3.9. Antocianinas **31**

3.9.1. Influência do pH **33**

3.9.2. Influência da Temperatura **34**

3.9.3. Antocianinas no Arroz Negro **35**

3.9.4. Método de Extração de Antocianinas em Soluções Aquosas de Polímeros ...36

3.9.5. Antocianinas em Embalagens Inteligentes para Alimentos 37

4. MATERIAIS E MÉTODOS 41

4.1. Materiais 41

4.2. Métodos 41

4.2.1. Extração por polímero da antocianina a partir do subproduto de arroz negro.....41

4.2.1.1. Preparo das amostras do subproduto de arroz negro.....41

4.2.1.2. Extração de antocianinas com solução polimérica.....42

4.2.1.3. Preparo da solução de carboximetilcelulose.....42

4.2.2. Produção do biofilme para a embalagem 42

4.2.2.1. Etapa preliminar: avaliação da composição ótima para produção do biofilme.....42

4.2.2.2. Etapa intermediária: definição da composição ótima para produção do biofilme.....44

4.2.2.3. Etapa final: produção do biofilme.....45

4.2.3. Caracterização do biofilme.....45

4.2.3.1. Espessura.....45

4.2.3.2. Propriedades mecânicas.....45

4.2.3.3. Gramatura.....46

4.2.3.4. Permeabilidade ao vapor d'água.....46

4.2.3.5. Análises térmicas.....46

4.2.4. Aplicação do biofilme à carne suína.....47

4.2.4.1. Fracionamento da carne.....47

4.2.4.2. Testes de interação com o biofilme.....47

4.2.4.3. Análise de imagem das superfícies dos biofilmes.....47

4.2.4.4. Medição do pH da carne suína.....47

4.2.5. Análise estatística.....48

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....49

5.1. Produção do biofilme para embalagem.....49

5.2. Caracterização do biofilme.....52

5.2.1. Espessura.....52

5.2.2. Propriedades mecânicas.....54

5.2.3. Gramatura.....55

5.2.4. Permeabilidade ao vapor d'água.....55

5.2.5. Análises térmicas.....57

5.3. Aplicação do biofilme à carne suína.....61

5.3.1. Medição do pH da carne em temperatura ambiente 61

5.3.2. Teste de interação entre biofilme e carne à temperatura ambiente.....62

5.3.3. Medição do pH da carne à 4 °C.....67

5.3.4. Teste de interação entre biofilme e carne armazenados no refrigerador.....68

6. CONCLUSÃO.....74

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 75

Lista de Figuras

Figura 1. Mudanças de coloração em etiquetas TTI da Vitsab Checkpoint® (Adaptado de FANG *et al*., 2017).....21
Figura 2. Alguns modelos de códigos de barra utilizados em embalagens de carne (Adaptado de FANG *et al*., 2017).....21
Figura 3. Reação esquemática de obtenção da carboximetilcelulose de sódio (Adaptado de CERRUTTI, 2010).....29
Figura 4. Estrutura básica do cátion flavílium (Adaptado de FERNANDES, 2018).....31
Figura 5. Estrutura geral das antocianinas (Adaptado de FERNANDES, 2018).....32
Figura 6. Estruturas das principais formas químicas das antocianinas em diferentes valores de pH (Adaptado de BORDIGNON *et al*., 2009).....34
Figura 7. Fórmula estrutural do polímero polióxido de etileno (Adaptado de DAI; TAM, 2005) 37
Figura 8. Biofilmes com diferentes composições para a solução polimérica de antocianinas, goma carboximetilcelulósica e glicerol, produzidos a partir do 1º delineamento experimental.....49
Figura 9. Biofilmes com diferentes composições para a solução polimérica de antocianinas, goma carboximetilcelulósica e glicerol, produzidos a partir do 2º delineamento experimental.....51
Figura 10. Aspecto visual do biofilme de composição ótima.....52
Figura 11. Análise termogravimétrica (TGA) e calorimetria exploratória diferencial (DSC) para o biofilme produzido com base em carboximetilcelulose, PEO 1.500, glicerol e antocianinas.....58
Figura 12. Análise termogravimétrica (TGA) e calorimetria exploratória diferencial (DSC) para as amostras puras de soluções de carboximetilcelulose, PEO 1.500 e glicerol.....60
Figura 13. Análise de calorimetria exploratória diferencial (DSC) para a amostra pura de solução de carboximetilcelulose.....60
Figura 14. Análise de calorimetria exploratória diferencial (DSC) para a amostra pura de glicerol.....61
Figura 15. Fatias de carnes suínas submetidas ao teste à temperatura ambiente. **A)** carne fresca, conservada em refrigerador, no dia 0; **B)** carne no início do processo de degradação, no dia 3; **C)** carne em estágio de decomposição avançado, no dia 5.....62

Figura 16. Orientação do ângulo de matiz na escala CIELab* (Figura adaptada de LUCHESE *et al*., 2017).....65
Figura 17. Coloração dos biofilmes em função da variação de pH das carnes expostas à temperatura ambiente.....66
Figura 18. Variação na coloração dos biofilmes em contato com as carnes à 4 ^{0}C.....72
Figura 19. Protótipo de embalagem inteligente para detecção do frescor de carnes suínas desenvolvido a partir dos resultados obtidos nesse trabalho.....73

Lista de Tabelas

Tabela 1. Dispositivos inteligentes e seus princípios de aplicação em embalagens para carnes (Adaptado de FANG *et al*., 2017) 21
Tabela 2. Características das principais antocianinas encontradas na natureza (Adaptado de FERNANDES, 2018) 32
Tabela 3. Teor e proporção de antocianinas em quatro diferentes grupos de arroz (Adaptado de CHEN *et al*., 2012) 36
Tabela 4. 1º Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) desenvolvido para as composições de polióxido de etileno (PEO), carboximetilcelulose (CMC) e glicerol..... 43
Tabela 5. 2º Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) desenvolvido para as composições de polióxido de etileno (PEO), carboximetilcelulose (CMC) e glicerol..... 45
Tabela 6. Valores determinados para o parâmetro a* pela análise colorimétrica CIELab*..... 50
Tabela 7. Valores de espessura para as amostras dos biofilmes produzidos..... 52
Tabela 8. Propriedades mecânicas e gramatura das amostras do biofilme colorimétrico..... 53
Tabela 9. Valores médios da permeabilidade ao vapor d'água (PVA) para triplicatas dos biofilmes colorimétricos medidos a cada 24 h por cinco dias..... 56
Tabela 10. Valores de pH da carne suína submetida à temperatura ambiente por cinco dias..... 61
Tabela 11. Parâmetros colorimétricos (CIELab*) dos biofilmes expostos à temperatura ambiente..... 63
Tabela 12. Parâmetros hab, C* e ΔE dos biofilmes expostos à temperatura ambiente..... 64
Tabela 13. Valores de pH da carne suína estocada à 4 ºC por vinte dias..... 67
Tabela 14. Parâmetros colorimétricos (CIELab*) dos biofilmes expostos à 4 ºC..... 65
Tabela 15. Parâmetros hab, C* e ΔE dos biofilmes expostos à temperatura de 4 ºC..... 69
Tabela 16. Comparação entre resultados obtidos para os experimentos à temperatura ambiente e à 4 ºC..... 71

Lista de Abreviaturas e Símbolos

TTI – Time-temperature indicator ou indicador tempo-temperatura – para monitorar, registrar e indicar cumulativamente a influência global do histórico de temperatura ao qual o alimento foi submetido;

UV – Ultravioleta – região específica de raios de luz;

RFID – Radio-frequency identification ou identificação por rádio frequência – transmite uma informação baseada em separação eletrônica;

PLA – Ácido poliláctico – polímero utilizado na produção de filmes;

PEO – Polióxido de etileno – polímero sintético no estado sólido utilizado na produção de filmes;

CMC – Carboximetilcelulose – biopolímero empregado na fabricação de filmes;

PEG – Políetilenoglicol – polímero sintético no estado líquido utilizado na fabricação de filmes;

PVA – Poliacetato de vinila – polímero sintético utilizado na produção de filmes;

ASTM – American Society for Testing and Materials;

DCCR – Delineamento Composto Central Rotacional – para planejamento experimental;

ANOVA – Análise de variância – método para análise estatística;

TG – Termogravimetria – método de análise térmica;

DSC – Calorimetria Exploratório Diferencial – método de análise térmica;

PVC – Policloreto de vinila – polímero sintético utilizado na produção de materiais rígidos ou flexíveis;

AOAC – Association of Analytical Chemists;

PVA – Permeabilidade ao vapor d’água;

TGA – Análise termogravimétrica;

DSC – Calorimetria exploratória diferencial.

1. INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, tem sido observado o crescimento das indústrias de processamento de alimentos associado ao aumento no número de importações e exportações de produtos relacionados a este setor, bem como o curto tempo para preparação de alimentos frescos e naturais. Como consequência, há uma demanda crescente por parte dos consumidores para que sejam desenvolvidas novas e avançadas tecnologias que ampliem a proteção e preservação dos alimentos, garantindo a segurança de consumo (PARK *et al*., 2015).

No que diz respeito ao mercado de carnes, a carne suína é rica em nutrientes essenciais, sendo a proteína de origem animal mais consumida no mundo. Possui sabor e maciez característicos, além de ser fonte de vitaminas e minerais, mas assim como outros tipos de carne, pode sofrer contaminação e gerar riscos à saúde humana (XIAO-WEI *et al*., 2014). Além disso, por ser um alimento altamente perecível, se não estiver devidamente embalada e preservada, sofre com os efeitos da deterioração. Assim, torna-se uma importante prerrogativa para os consumidores, o conhecimento do estado de conservação do alimento que estão adquirindo (KANG; KIM; KWON, 2009).

A incorporação de sensores a embalagens convencionais dá origem às embalagens inteligentes. Estas podem apresentar a capacidade de extensão da vida útil do alimento e fornecer informações sobre seu estado de conservação e/ou armazenamento, assumindo a importante função de atestar a qualidade do mesmo (MAHALIK, 2009).

O emprego de pigmentos naturais em sensores colorimétricos apresenta-se como um método vantajoso, uma vez que esses pigmentos não reagem quimicamente com a embalagem inteligente. Xiao-Wei e colaboradores (2014) desenvolveram sensores colorimétricos fundamentados em quatro pigmentos naturais distintos, extraídos de rabanete vermelho, espinafre, jasmins e arroz negro. Entre os extratos utilizados, o arroz negro figurou como um extrato sensível à detecção de deterioração em carnes suínas por apresentar moléculas que interagem bem com compostos nitrogenados formados na degradação da proteína por microrganismos.

A fim de se determinar a qualidade da carne por meio de sensores, é imprescindível o entendimento de seus mecanismos de deterioração. Os tecidos da carne suína são compostos primordialmente por proteínas, lipídios, carboidratos, compostos inorgânicos e umidade e, assim, seus mecanismos de degradação são similares (TOLDRÁ, 2008).

Sob condições normais de empacotamento, diversos metabólitos como glicose, ácido lático, CO_2, O_2, compostos nitrogenados voláteis e aminas biogênicas podem ser formados no interior da embalagem do produto. Por esse motivo, esses metabólitos podem ser utilizados como parâmetros indicadores de qualidade e tornam possível que um processo de deterioração seja detectado pela incorporação à embalagem de um sensor capaz de reconhecer esses analitos (DAINTY, 1996).

Diante da crescente demanda de consumidores preocupados com a segurança e conservação dos alimentos, em especial alimentos perecíveis e de alto consumo como as carnes, sensores para embalagens inteligentes configuram-se como tecnologias de extrema relevância para a determinação da qualidade destes alimentos. Indicadores colorimétricos baseados em pigmentos naturais podem sinalizar um processo de deterioração em carnes suínas e se constituem como excelentes alternativas a serem pesquisadas e desenvolvidas para incorporação a esse novo conceito de embalagens.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Produzir e caracterizar um sensor colorimétrico aplicado a embalagens inteligentes capaz de indicar o estado de conservação de carnes suínas diante das alterações no pH do alimento.

2.2. Objetivos Específicos

a. Extrair o corante antocianina do subproduto de arroz negro via matriz polimérica;

b. Produzir o biofilme com o corante inserido via método de *casting* e caracterizá-lo quanto à espessura, gramatura, propriedades mecânicas e térmicas e permeabilidade ao vapor d'água;

c. Determinar a deterioração da carne suína pela medição de pH e correlacioná-la com a mudança de coloração dos biofilmes por análise colorimétrica via teste CIELab.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Função das Embalagens de Alimentos

As embalagens envolvem e protegem o alimento após seu processamento, garantindo sua integridade durante o transporte, distribuição e comercialização e aumentando a segurança de consumo. A principal função de uma embalagem é manter os benefícios dos alimentos processados depois da finalização da produção, permitindo que os produtos sejam transportados de forma segura de seu ponto de origem até o ponto de consumo (PRASAD; KOCHHAR, 2014). As embalagens para alimentos têm evoluído de simples recipientes de armazenamento para agentes capazes de desempenhar um importante papel na qualidade dos produtos. Muitas delas ainda são recipientes básicos, mas já possuem propriedades de proteção intensiva dos alimentos (RISCH, 2009).

Atualmente, as embalagens desempenham papel fundamental na qualidade dos produtos, propiciando proteção contra agentes químicos, físicos e biológicos. Esta proteção pode se dar de maneira simples, como a prevenção à quebra do alimento, até uma forma mais complexa, com a criação de barreiras contra umidade, oxigênio, dióxido de carbono e outros gases, bem como barreiras contra sabores e aromas. As embalagens podem bloquear a entrada de luz, protegendo nutrientes e cores de um produto contra processos de degradação. Além disso, embalagens desenvolvidas em períodos mais recentes atuam na qualidade do alimento criando uma atmosfera apropriada ao seu redor. Novas tendências na indústria de embalagens visam a redução de desperdícios através de uma melhor preservação do alimento e prolongamento de sua vida útil (NURA, 2018).

Alterações nas preferências dos consumidores têm levado ao desenvolvimento de inovações tecnológicas no setor de embalagens. Essas inovações são fruto da busca da sociedade por alimentos mais frescos, aliada ao seu menor tempo disponível para a preparação das refeições (EILERT, 2005). O crescimento de países tradicionalmente menos desenvolvidos economicamente tem elevado os padrões de vida, o que inclui um aumento no consumo de alimentos embalados. Todo esse processo resulta em avanços na indústria de processamento de alimentos, bem como em novas tecnologias para embalagens (NURA, 2018).

Nos últimos anos, o desenvolvimento de embalagens tem ido além de suas funções tradicionais de proteção, alcançando objetivos maiores como extensão da vida útil do produto e informações sobre condições de armazenamento, além de estabelecer e solidificar a imagem da marca (KOUR *et al*., 2013). Este avanço é o resultado do crescimento da demanda de

consumidores por alimentos frescos, com menor índice de conservantes e sabores preservados, prolongando sua validade sem que haja comprometimento da qualidade (DOBRUCKA; CIERPISZEWSKI; KORZENIOWSKI, 2015).

3.2. Embalagens Sustentáveis

Acordos e protocolos no âmbito da sustentabilidade recomendam o uso de materiais biodegradáveis e ambientalmente amigáveis para a produção de embalagens de alimentos, visto que muitas das embalagens tradicionais são responsáveis pela geração de resíduos. Diante disso, o setor de embalagens tem voltado seu foco para o desenvolvimento de embalagens sustentáveis, utilizando uma gama de novos materiais como plásticos de ácido poliláctico (PLA), polpa de cana-de-açúcar, compósitos fibrosos, filmes à base de amido, entre outros (NITAIGOUR, 2014).

Os biopolímeros se encontram presentes no ambiente por um período de tempo muito menor que os polímeros sintéticos, como os plásticos tradicionais. Eles são gerados a partir de fontes naturais renováveis, são geralmente biodegradáveis e não-tóxicos. Biopolímeros podem ser produzidos por sistemas biológicos (microrganismos, plantas e animais) ou sintetizados quimicamente, partindo-se de materiais biológicos como açúcares, amidos, gorduras ou óleos naturais (PAWAR; AACHAL, 2013).

Embalagens sustentáveis representam uma ideia complexa, que deve ser aplicada sob a ótica do pensamento crítico com uma abordagem sistemática. Algumas considerações importantes que devem ser levadas em conta na avaliação de uma embalagem sustentável são: ciclo de vida da embalagem sob a perspectiva do material bruto de produção até sua disposição final, evitando a transferência de problemas de uma fase do ciclo de vida para outra; interações entre a embalagem e o alimento, garantindo que o impacto causado pelo sistema como um todo seja o menor possível; por fim, deve-se considerar ainda os impactos sob o tripé formado por sociedade, meio ambiente e economia. Quatro princípios básicos para a viabilidade de embalagens sustentáveis foram originalmente identificados pela Aliança das Embalagens Sustentáveis sob o direcionamento de efetividade, eficiência, ciclo de vida e natureza da fonte (NURA, 2018).

A Coalisão de Embalagens Sustentáveis, um consórcio internacional que conta com mais de 200 indústrias como membros efetivos, definiu as prerrogativas aceitáveis para esse tipo de embalagem como:

- Devem ser benéficas, seguras e não podem gerar riscos à saúde de indivíduos e comunidades durante todo o seu ciclo de vida;
- Precisam se enquadrar nos critérios de mercado em relação à performance e custos;
- Devem ser obtidas, produzidas, transportadas e recicladas a partir da utilização de fontes renováveis de energia;
- Em sua produção, serão utilizados materiais reciclados ou provenientes de fontes limpas;
- Sua produção também deve envolver tecnologias sustentáveis e boas práticas de fabricação;
- Os materiais utilizados em sua fabricação não podem causar danos à saúde de seres vivos em quaisquer que sejam os possíveis cenários da fase final de seu ciclo de vida;
- Devem ser desenvolvidos no intuito de se otimizar materiais e energia.

Tanto os materiais biodegradáveis quanto os baseados em mecanismos biológicos têm sido investigados como potenciais substitutos para os plásticos provenientes da indústria do petróleo. Essa substituição pode representar não apenas uma vantagem competitiva com a geração da imagem de um produto ambientalmente correto, mas pode também oferecer materiais com propriedades técnicas aperfeiçoadas (VARTIAINEN; VÄHÄ-NISSI; HARLIN, 2014). Polímeros biodegradáveis podem exercer todas as funções requeridas por uma embalagem de alimentos sem causar danos ao meio ambiente. A perspectiva é de que esses polímeros reduzam a necessidade de se produzirem polímeros sintéticos a baixo custo, o que reduziria também a poluição ocasionada pelo processo, gerando um efeito positivo ambiental e econômico (PAWAR; AACHAL, 2013). O desenvolvimento de biopolímeros contendo agentes antimicrobianos naturais e sua comercialização efetiva se apresentam como uma alternativa relevante para aplicações em embalagens de alimentos (NURA, 2018).

Os fatores primordiais que têm direcionado o desenvolvimento do mercado de embalagens biodegradáveis incluem o aumento nos preços do petróleo cru, a necessidade de embalagens que afetem minimamente o meio ambiente, a descoberta de novas aplicações para bioplásticos e o desenvolvimento de novas infraestruturas capazes de receber o bioplástico descartado. Somada a esses fatores, existe ainda a demanda de consumidores por produtos ambientalmente amigáveis, seguros e não-tóxicos. Além de se apresentarem como alternativas biodegradáveis, biopolímeros possuem outras características importantes como permeabilidade a gases, disponibilidade e baixo custo (PAWAR; AACHAL, 2013). Um grande número de

biopolímeros distintos pode ser empregado em embalagens de alimentos, tais quais pectina, amido, quitosana, lignina, hemicelulose e celulose (VARTIAINEN; VÄHÄ-NISSI; HARLIN, 2014).

3.3. Embalagens Ativas e Inteligentes

Mudanças no estilo de vida das pessoas e nas práticas comerciais de varejo têm se apresentado como grandes desafios para a indústria de embalagens de alimentos. Essas mudanças também têm atuado como força motriz para o desenvolvimento de novos e vantajosos conceitos de embalagens que sejam capazes de estender a vida útil dos alimentos, bem como manter e monitorar sua qualidade e segurança de consumo (DOBRUCKA; CIERPISZEWSKI; KORZENIOWSKI, 2015). As inovações tecnológicas no setor de embalagens se limitavam, até então, a um pequeno número de materiais com propriedades de barreira relevantes, com diferentes *designs* que atendiam ao apelo comercial da época. No entanto, diante da demanda da sociedade consumidora e novas exigências do mercado de alimentos, as embalagens não possuem mais apenas um papel passivo de proteção (KUMAR; BUDIN, 2006).

3.3.1. Embalagens Ativas

Uma embalagem ativa compreende um sistema capaz de alterar as condições de armazenamento do alimento e de mantê-las durante todo o período de estocagem, prolongando sua vida útil ou melhorando sua segurança e propriedades sensoriais, enquanto conserva a qualidade de condicionamento (DAINELLI *et al*., 2008). Esse tipo de embalagem permite uma interação direta com o alimento e a atmosfera ao seu redor, podendo alterar a composição e as características organolépticas do produto. A resposta a essa interação pode se configurar como a eliminação de componentes indesejados do alimento e/ou da atmosfera que o cerca ou como a liberação de compostos ativos no produto ou arredores (KOUR *et al*., 2013). O seu princípio de atuação é pautado nas propriedades intrínsecas do polímero utilizado para a confecção da embalagem ou na introdução de substâncias específicas na estrutura polimérica e envolve retardamento em processos de oxidação, impedimento de processos respiratórios, prevenção de crescimento de microrganismos, controle dos níveis de umidade, controle do teor de dióxido de carbono, emissores de sabor, liberação de agentes antioxidantes, entre outros (NURA, 2018).

A embalagem antimicrobiana é um bom exemplo da aplicação e funcionalidade de uma embalagem ativa. Embora grande parte dos produtos alimentícios perecíveis embalados seja esterilizada por meio de processos térmicos ou possua um sistema de autoproteção, a

contaminação microbiana pode ocorrer na superfície ou em área danificada por defeitos na embalagem ou durante o período de armazenamento após sua abertura (BERTAN, 2008).

Fraga e colaboradores (2005) desenvolveram embalagens ativas para a conservação do queijo tipo gorgonzola e verificaram a migração da substância antimicrobiana natamicina incorporada. Os queijos envolvidos com o filme apresentaram boa inibição do crescimento superficial de fungos quando comparados ao filme sem natamicina, durante todo período de maturação avaliado. Porém, os queijos apresentaram um aspecto externo diferente do habitual, com uma coloração esbranquiçada e sem a formação de casca.

Outro exemplo da utilização de embalagens ativas é na prevenção de processos de oxidação. Sangatash e colaboradores (2015) confeccionaram filmes poliméricos incorporados de ascorbato de sódio e álcool etileno-vinílico como agentes antioxidantes para o aumento da vida de prateleira do amendoim. Os resultados obtidos mostraram que a adição do ascorbato de sódio, principalmente, retardou o processo de oxidação e prolongou a vida útil do amendoim.

3.3.2. Embalagens Inteligentes

Embalagens inteligentes são aquelas que, incorporadas de um dispositivo tecnológico, informam ao fabricante, revendedor e consumidor, o estado de conservação do alimento. Embora apresentem um conceito diferente daquele das embalagens ativas, suas características podem ser utilizadas para checar a efetividade e integridade destes sistemas de embalagens (HUTTON, 2003).

As embalagens inteligentes apresentam propriedades de sensibilidade que as permitem atestar a garantia de integridade da embalagem, evidências de falsificação, segurança do produto e, consequentemente, sua qualidade. Além disso, esse tipo de embalagem também tem sido aplicado com funções adicionais, para comprovação da autenticidade de produtos e rastreabilidade destes e como dispositivo antifurto (DOBRUCKA; CIERPISZEWSKI; KORZENIOWSKI, 2015). Sistemas de embalagens inteligentes incluem sensores, indicadores tempo-temperatura, corantes para detecção de gases, indicadores de crescimento microbiano, indicadores de impacto físico em um produto, além de numerosos exemplos de tecnologias antifurto, antifalsificação e inviolabilidade (DAINELLI *et al*., 2008).

A informação transmitida pela embalagem inteligente pode ser revelada pela incorporação de etiquetas, rótulos ou até mesmo pelo próprio filme que constitui a embalagem. Rótulos podem ser incorporados ou impressos no material da embalagem, possibilitando o monitoramento da qualidade do produto, rastreando pontos críticos e proporcionando

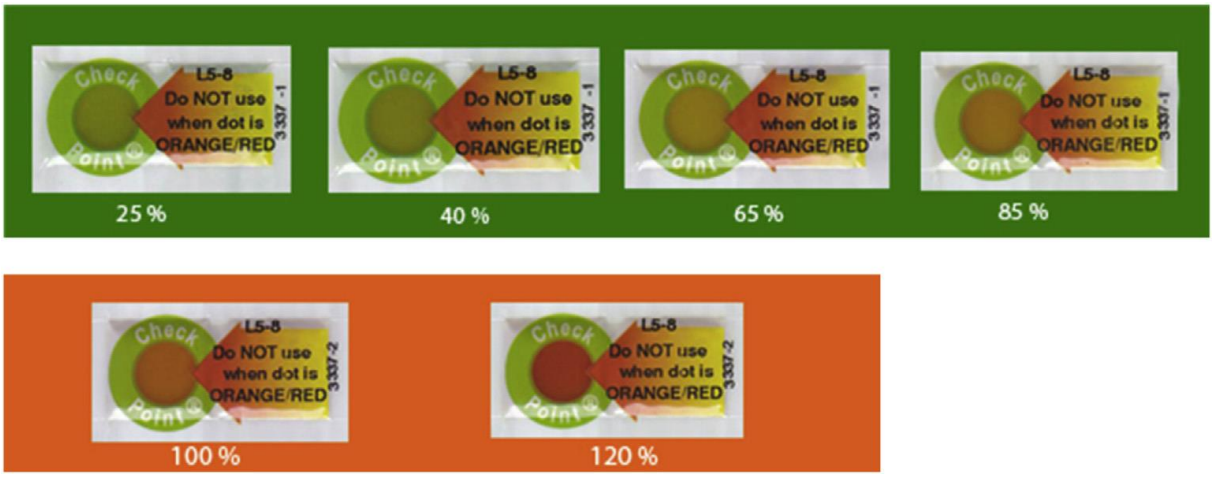
informações detalhadas sobre toda a cadeia de transporte, distribuição e comercialização (RODRIGUES; HAN, 2003). Etiquetas inteligentes como as etiquetas eletrônicas, desenvolvidas a partir de um circuito impresso constituído por uma tinta especial e construídas com baterias de radiofrequência, aplicadas na superfície da embalagem, têm sido utilizadas no intuito de se aumentar a eficiência do fluxo de informações e oferecer funções de comunicação inovadoras (DAINELLI *et al*., 2008). Filmes poliméricos, incorporados ou não de alguma outra substância, podem comunicar a condição de salubridade de um alimento por meio de alterações visuais em seu aspecto.

Indicadores tempo-temperatura ou integradores (TTI) são definidos como dispositivos simples, de baixo custo e ambientalmente corretos desenvolvidos para monitorar, registrar e indicar cumulativamente a influência global do histórico de temperatura ao qual o alimento foi submetido. Dessa forma, são apresentados indícios da qualidade do produto desde o seu processamento até o consumo (GIANNAKOUROU *et al*., 2005). Indicadores de temperatura mostram se o alimento foi aquecido ou resfriado além de uma temperatura de referência crítica, alertando ao consumidor sobre a potencial existência de microrganismos patogênicos ou desnaturação de proteínas, por exemplo, em processos de congelamento ou descongelamento. Indicadores tempo-temperatura também têm sido aplicados para se tomar conhecimento da ocorrência de processos de pasteurização e esterilização de determinados alimentos perecíveis (TUCKER *et al*., 2009).

A resposta visual fornece uma indicação cumulativa da temperatura de armazenamento à qual o TTI foi submetido. Os indicadores tempo-temperatura podem ser classificados como indicadores de históricos parciais ou totais, dependendo de seu mecanismo de resposta. Indicadores de históricos parciais não apresentam uma resposta a menos que uma temperatura limite tenha sido excedida e fornecem a informação de que o produto foi exposto a um valor de temperatura suficiente para causar alterações em sua qualidade e segurança. Já os indicadores de históricos totais oferecem uma resposta de dependência contínua com a temperatura por meio de todo o histórico de estocagem do produto e se constitui como maior foco de interesse nos setores de pesquisa e comercial (KERRY *et al*., 2006). Um exemplo de indicador tempo-temperatura produzido pela Vitsab Checkpoint® é uma etiqueta baseada na mudança de coloração devido à hidrólise enzimática controlada de um substrato de lipídio. O dispositivo é ativado pela aplicação de uma leve pressão sobre o selo para romper a ligação entre a enzima e o substrato. A interação entre enzima e substrato é identificada pela cor verde no selo da Figura 1, representando excelentes condições de armazenamento do produto alimentício. Se a

coloração do selo se altera para amarelo ou alaranjado, o produto está comprometido pela exposição à uma temperatura inadequada ao longo do tempo e não deve ser consumido.

Figura 1. Mudanças de coloração em etiquetas TTI da Vitsab Checkpoint® (Adaptado de FANG *et al*., 2017).



Wanihsuksombat, Hongtrakul e Suppakul (2010) produziram um protótipo de indicador tempo-temperatura baseado na difusão de ácido lático para monitoramento da qualidade de alimentos. Quatro indicadores foram desenvolvidos em diferentes concentrações de substrato. As mudanças de coloração associadas à difusão do ácido lático foram monitoradas. Durante a difusão do vapor de ácido lático, uma alteração de coloração irreversível de um indicador químico cromático (de verde para vermelho) ocorreu de forma clara e progressiva devido à uma redução no pH do meio. A dependência da temperatura cinética desses TTI's foi caracterizada isotermicamente, produzindo determinada energia de ativação. Os modelos matemáticos de cada TTI foram estabelecidos de acordo com as relações entre mudanças de cor e tempo e temperatura. As diferenças entre os valores de energia de ativação dos TTI's e as energias de ativação associadas às perdas de qualidade de alimentos foram definidas e esses indicadores foram considerados bons candidatos para monitoramento de perdas de qualidade em alimentos.

Kim, Kim e Lee (2012) desenvolveram o protótipo de um indicador tempo-temperatura enzimático, utilizando a enzima lacase, que possui cinética de descoloração simples e se encontra amplamente disponível. Lacases são enzimas que contêm cobre em sua estrutura e são largamente utilizadas em diferentes setores industriais, como no processamento de papel, prevenção da descoloração do vinho, produção de compostos químicos provenientes da lignina, entre outros. Essas enzimas possuem a habilidade de descolorirem diversos tipos de corantes e apresenta uma larga faixa de interação com substratos específicos, incluindo

compostos fenólicos, diaminas, aminas aromáticas e algumas substâncias inorgânicas. Os pesquisadores concluíram que os indicadores respondiam com mudanças de coloração em diferentes intensidades, dependendo da concentração do produto gerado nas reações envolvendo as lacases.

Indicadores de oxigênio e dióxido de carbono também podem ser utilizados no monitoramento da qualidade de alimentos. Eles podem ser usados como indicadores de escape dos gases ou para verificar a eficiência, por exemplo, de um eliminador de oxigênio. A maioria desses indicadores é baseada em mudanças de coloração que ocorrem devido a reações químicas ou enzimáticas. Esses indicadores devem estar em contato com a atmosfera gasosa no interior da embalagem e, consequentemente, estabelecem contato direto com o alimento (DE JONG *et al*., 2005). Indicadores de oxigênio convencionais são conhecidos por usarem azul de metileno, um corante que sofre alterações reversíveis em sua coloração graças a mecanismos de oxidação e redução (SUMITANI *et al*., 2004).

Lee, Fiedler e Smith (2008) desenvolveram novos arranjos de indicadores colorimétricos de oxigênio que são reversíveis, reutilizáveis e ativados por luz ultravioleta. Sensores de oxigênio baseados em uma espécie de “tinta inteligente” incluíam um semicondutor de absorção de raios UV, como o dióxido de titânio, por exemplo, um indicador redox, como o azul de metileno, um doador de elétrons de sacrifício, como a trietanolamina e um polímero encapsulante, como a hidroxietilcelulose. Os compostos foram dissolvidos em água para a formação da tinta, que poderia recobrir uma variedade de substratos para produzir um filme indicador de oxigênio com coloração azulada, que se tornava incolor quando ativado por luz UV.

Existem ainda indicadores de oxigênio baseados na fluorescência. A reação é fundamentada em uma base formada por fósforo que vai desaparecendo à medida em que entra em contato com moléculas de oxigênio. Compostos luminescentes são depositados em gases permeáveis e impermeáveis a materiais iônicos, como borrachas de silicone ou polímeros orgânicos para a formação de filmes indicadores de oxigênio (DOBRUCKA; CIERPISZEWSKI; KORZENIOWSKI, 2015).

Alterações nas concentrações de ácidos orgânicos em alimentos durante o período de estocagem oferecem um bom indício da presença de metabólitos, principalmente no que diz respeito às carnes. Indicadores colorimétricos baseados em mudanças no pH do meio apresentam grande potencial para indicação do crescimento de microrganismos patogênicos que podem causar a decomposição do alimento. Um outro tipo de indicador microbiano envolve

um sistema baseado em reações imunoquímicas que ocorrerão em códigos de barra, impedindo a leitura do código na presença de algum microrganismo particular (RODRIGUES; HAN, 2003). Kraśniewska e Gniewosz (2012) reportaram a condução de investigações com a substância nisina sendo introduzida em filmes de metilcelulose e hidroxipropilmetilcelulose, que são bons portadores de substâncias bactericidas e caracterizaram os filmes quanto à resistência e elasticidade. Os filmes produzidos se mostraram bons inibidores de crescimento da bactéria *Micrococcus luteus*.

O etanol, assim como o ácido lático e o ácido acético, se constitui como um importante indicador do metabolismo de fermentação de bactérias. Randell e colaboradores (1995) desenvolveram certos experimentos e reportaram um aumento na concentração de etanol em um meio contendo frango marinado como uma função do tempo de estocagem.

Muitos conceitos em embalagens inteligentes envolvem o uso de sensores. Um sensor é definido como um dispositivo para detectar, localizar ou quantificar energia ou matéria, gerando um sinal para a detecção ou quantificação de propriedades físicas ou químicas, às quais o dispositivo responde. Para ser caracterizado como um sensor, um dispositivo deve ser capaz de produzir um sinal contínuo de saída. A maioria dos sensores contém duas unidades fundamentais básicas: um receptor e um transdutor. No receptor, informações químicas ou físicas de uma amostra são transformadas em uma forma de energia, que pode ser medida pelo transdutor. O transdutor é capaz de transformar essa energia em um sinal analítico, permitindo uma análise das propriedades dessa amostra (KERRY; O'GRADY; HOGAN, 2006). O'Riordan e colaboradores (2005) examinaram a migração de componentes ativos de dois sensores de oxigênio baseados em corantes, estabeleceram e comprovaram sua estabilidade, segurança e aptidão para uso em larga escala em embalagens de alimentos.

Uma interessante solução em sensores inteligentes é conhecida como "nariz eletrônico". Esta é uma ferramenta composta por um arranjo de sensores que respondem a componentes voláteis pela alteração em suas propriedades elétricas. As amostras podem ser classificadas então como aceitáveis ou inaceitáveis, referenciando uma avaliação sensorial ou uma análise microbiológica a partir de um catálogo de informações. As respostas desse tipo de arranjo têm se mostrado consistentes para análises microbiológicas e determinação da concentração de substâncias voláteis em um determinado produto (GRAM; HUSS, 2000).

A tecnologia RFID (Identificação por Rádio Frequência) não se enquadra nas classificações de sensores ou indicadores, no entanto, se apresenta como uma espécie de embalagem inteligente que transmite uma informação baseada em separação eletrônica. RFID

utiliza etiquetas afixadas a *containers*, *pallets* ou outros tipos de armazenadores para transmitir informações acuradas e em tempo real aos consumidores. RFID é uma das muitas tecnologias de identificação automática e oferece um número elevado de benefícios na indústria de processamento de carnes e durante todo o seu processo de distribuição e varejo. Os benefícios são evidentes na rastreabilidade, gerenciamento de estoque, segurança e promoção da qualidade dos produtos (MOUSAVI *et al*., 2002).

3.4. Embalagens Inteligentes na Indústria das Carnes

Atualmente, existe uma demanda crescente de consumidores de carnes e derivados por alimentos cada vez mais macios, nutritivos, saudáveis e seguros (GRUNERT; VALLI, 2001). A qualidade das carnes e propriedades de segurança de consumo são altamente dependentes dos materiais e tecnologias empregados na fabricação de embalagens para alimentos perecíveis. As razões fundamentais para se produzir uma embalagem que mantenha as carnes processadas frescas são a prevenção de contaminação, retardamento da deterioração, aumento da maciez através do favorecimento de certas atividades enzimáticas, redução da perda de massa e conservação da cor e aroma (BRODY *et al*., 2008). Em virtude desses fatos, as práticas atuais de armazenamento das carnes vão além da criação de um envoltório de proteção para estocagem a curto prazo e englobam modernas embalagens a vácuo, sistemas de absorção ou liberação de gases e modificação da atmosfera que envolve o alimento, permitindo a estocagem do produto por um tempo mais longo (MC MILLIN, 2008).

Embalagens inteligentes aplicadas a carnes carregam funções inteligentes tais quais detecção do estado de conservação, compreensão, registro, rastreabilidade e comunicação a respeito do produto, facilitando a tomada de decisão para prolongamento de sua vida útil, intensificando a segurança de consumo, fornecendo informações relevantes e alertando sobre possíveis problemas (FANG et al., 2017).

Entre os dispositivos inteligentes incorporados a embalagens de carne, um dos mais simples e mais utilizados é o código de barras. O código de barras pode trazer informações referentes à data em que o alimento foi embalado, número do lote, massa do produto, valores nutricionais, instruções de cozimento e endereço eletrônico do fornecedor. Todas essas informações podem ser codificadas através do dispositivo e serem lidas, até mesmo, em aparelhos *smartphones*. Assim, a incorporação dos códigos de barra é de extrema conveniência tanto para os consumidores quanto para os comerciantes (FANG *et al*., 2017). A Figura 2 apresenta alguns exemplos de códigos de barra utilizados em embalagens para carne.

Figura 2. Alguns modelos de códigos de barra utilizados em embalagens de carne (Adaptado de FANG *et al*., 2017).

Os demais dispositivos utilizados em embalagens de carne já foram citados ao longo do texto e suas funções e métodos de funcionamento comentados. A Tabela 1 traz cada um desses dispositivos e suas aplicações diretas em embalagens inteligentes para proteínas de origem animal.

Tabela 1. Dispositivos inteligentes e seus princípios de aplicação em embalagens para carnes (Adaptado de FANG *et al*., 2017).

Dispositivo Inteligente	Princípio ou Reagentes	Informações fornecidas	Aplicações
Etiquetas de identificação por rádio frequência	Ondas de rádio	Informações do produto e do fornecedor	Identificação do produto, gerenciamento da cadeia de suprimentos, controle de segurança
Indicadores tempo-temperatura	Mecânico, químico, enzimático ou microbiológico	Condições de armazenamento	Alimentos armazenados sob condições de refrigeração
Indicadores de gás	Corantes redox, corantes de pH, enzimas	Condições de armazenamento e possíveis vazamentos	Alimentos armazenados sob condições que requeiram a presença de gases
Indicadores de crescimento microbiano	Corantes de pH, corantes que reagem ou não com metabólitos voláteis	Estado de conservação do alimento por ocasião de decomposição microbiana	Alimentos perecíveis como carnes, peixes e aves
Indicadores de patógenos	Métodos de reação químicos ou imunoquímicos com toxinas	Presença de uma bactéria específica como *Escherichia coli*	Alimentos perecíveis como carnes, peixes e aves

3.4.1. Indicadores de Crescimento Microbiano em Carnes

Um indicador que mostra especificamente a deterioração ou perda de características de consumo de um produto exibe importância e funcionalidade no controle da qualidade de carnes embaladas (SMOLANDER, 2003). Indicadores de crescimento microbiano se enquadram nessa categoria de indicadores, sinalizando a ocorrência de um processo de decomposição do alimento devido ao crescimento de microrganismos (ABREU; CRUZ; LOSADA, 2012). Sua atuação se baseia no conhecimento de mecanismos de formação de metabólitos associados aos diferentes tipos de carne, às microbiotas de degradação, à classe da embalagem e condições de armazenamento. Segundo Smolander (2003), os principais metabólitos gerados em processos de decomposição de carnes são glicose, ácidos orgânicos, etanol, compostos nitrogenados voláteis, aminas biogênicas, dióxido de carbono e compostos sulfurados. A grande maioria dos indicadores de crescimento microbiano causa uma mudança de coloração no material da embalagem, graças à formação de pelo menos um dos compostos citados durante o processo de decomposição.

Atualmente, o indicador de crescimento microbiano mais utilizado na indústria de processamento de carnes é o corante azul de bromotimol, que reage à presença de dióxido de carbono, gerado como resultado do crescimento de microrganismos. Altas concentrações de dióxido de carbono favorecem a reação dessa substância com o corante azul de bromotimol e alteram sua coloração. Algumas outras espécies de corantes mais comumente empregadas com o mesmo propósito são o azul de xilenol, roxo de bromocresol, verde de bromocresol, vermelho de cresol, vermelho de metila e alizarina (HORAN, 2000). Além disso, dióxido de carbono e outros metabólitos incluindo SO_2, NH_4, aminas voláteis e ácidos orgânicos têm sido usados como moléculas-alvo de monitoramento a partir de indicadores sensíveis ao pH (SMOLANDER, 2003).

Luo e Lim (2019) investigaram a atuação de corantes derivados de álcool cinamílico e quinoxalina, sintetizados a partir de aromas comumente presentes em diferentes tipos de alimentos, para detecção de aminas voláteis, características de processos de decomposição em peixes. O corante baseado em quinoxalina apresentou limite de detecção mais baixo que aquele baseado em álcool cinamílico para a percepção de aminas, embora o último tenha exibido um perfil de variação de cores mais amplo. Os testes realizados demonstraram o potencial de ambos os corantes na indicação do estado de conservação de peixes.

Zhai e colaboradores (2019) desenvolveram um sensor colorimétrico baseado em goma gelana e nanopartículas de prata para monitoramento de carnes frescas. O indicador foi baseado

na detecção de sulfeto de hidrogênio, composto liberado na deterioração de variados tipos de carne. Ao ser avaliada a decomposição microbiana sofrida por proteínas como a carpa prateada e peito de frango, constatou-se que o sensor sofre uma alteração em sua coloração do amarelo para o incolor. A eficiência do sensor o caracterizou como alternativa viável para o acompanhamento em tempo real do estado de acondicionamento de carnes.

Chayavanich, Thiraphibundet e Imyim (2019) produziram filmes baseados em um corante natural extraído de rabanete vermelho. A cor dos filmes pôde ser diferenciada a olho nu, variando entre o alaranjado e o roxo à medida que o pH do meio aumentava como resultado da liberação de compostos nitrogenados voláteis, provenientes da degradação microbiana da carne de frango. A sensibilidade do indicador revelou seu potencial para utilização em embalagens inteligentes para carnes.

3.5. Deterioração das Carnes

As carnes e seus derivados são considerados produtos altamente perecíveis. Apesar de os tecidos animais serem livres de microrganismos, as superfícies externas, incluindo peles e tegumentos, e trato digestório podem se configurar como potenciais fontes de contaminação. A contaminação externa pode ocorrer desde o momento do abate por agentes presentes no ar, água e couro, instrumentos utilizados na evisceração, conteúdo gastrointestinal do animal, entre outras fontes de contaminação, até nas etapas subsequentes, que compreendem a manipulação do alimento por meio de superfícies não-higienizadas e do próprio manuseador. Dessa forma, um alimento contaminado ao longo destas etapas, permanecerá colonizado nas etapas seguintes do processamento, que envolvem operações de resfriamento, congelamento, embalagem, transporte e assim por diante (KERRY; O’GRADY; HOGAN, 2006).

Em relação à deterioração das carnes, um fato bem estabelecido é que compostos como glicose, ácido lático e certos aminoácidos, seguidos por nucleotídeos, ureia e proteínas solúveis em água são catabolizados pela maioria das bactérias presentes na microbiota do alimento (NYCHAS; MARSHALL; SOFOS, 2007). As substâncias formadas são fontes de energia essenciais para o massivo crescimento de microrganismos, embora se apresentem em quantidades menores quando comparadas às proteínas. Sabe-se que a concentração desses compostos pode afetar o tipo e a taxa de degradação e, além disso, os compostos formados se constituem como principais precursores dos metabólitos microbianos que identificamos através do processo de decomposição (SKANDAMYS; NYCHAS, 2002).

O desenvolvimento e crescimento microbiano pode ser resultado da geração de três tipos diferentes de substâncias: compostos que participam de processos glicolíticos, produtos metabólicos e substâncias nitrogenadas (NYCHAS; MARSHALL; SOFOS, 2007). A glicose é precursora de grande parte dos odores desagradáveis gerados durante a decomposição das carnes, enquanto sua limitação é capaz de causar uma mudança do metabolismo de degradação sacarolítico para o metabolismo de degradação por aminoácidos, em pelo menos algumas espécies de bactérias. As trocas de glicose e lactato, bem como seus produtos de oxidação, têm sido responsáveis por descrever ou predizer o grau de decomposição do alimento (NYCHAS *et al*., 2008). Isto é evidente principalmente em carnes armazenadas sob condições aeróbias, onde bactérias do tipo Pseudomonas são as maiores contribuintes para a degradação.

Deve-se considerar que, sob condições aeróbias, a soma de aminoácidos livres e proteínas solúveis em água aumentam durante a estocagem da carne, gerando o desenvolvimento de colônias de bactérias (SKANDAMYS; NYCHAS, 2002). Nychas e Tassou (1997) mostraram que este aumento ocorreu em amostras de carnes com concentrações relativamente altas de glicose. Ademais, o aumento de aminoácidos livres sob condições aeróbias foi mais significativo que o ocorrido sob condições de atmosfera modificada. Por fim, vale salientar que aminas biogênicas (compostos orgânicos nitrogenados), especificamente a histamina, tiramina, putrescina e cadaverina, quando geradas, são as maiores responsáveis pela decomposição de produtos cárneos (GARCÍA-BARRIENTOS *et al*., 2006).

Além dos fatores intrínsecos citados acima, relacionados ao processo de decomposição da carne, há ainda um fator extrínseco de grande relevância. A temperatura influencia de forma importante a degradação do alimento e, consequentemente, a segurança de consumo do mesmo (KOUTSOUMANIS; TAOUKIS, 2005). O consumo em massa de carnes e derivados frescos, assim como os novos padrões de consumo, a redução do tempo de cozimento para uma perda mínima de qualidade e o aumento no número de alimentos processados para o preparo em micro-ondas, têm acentuado a necessidade por um controle constante e sistemático de temperatura desse tipo de alimento. Esse controle passa por toda a cadeia de transporte e distribuição de carnes e derivados crus, desde a etapa de produção até a etapa de consumo (MC MEEKIN *et al*., 2006).

Diversos estudos têm sido conduzidos a respeito da importância de se manterem baixas temperaturas no manuseio de carnes, com foco nos efeitos de suas flutuações ou abusos durante processamento, distribuição e estocagem, o que interfere diretamente na qualidade do produto (MC MEEKIN *et al*., 2006). Assim, vários estágios da cadeia de carnes congeladas, como

processos de transferência e estocagem, têm sido considerados o elo mais fraco entre os pontos de manejo dos produtos perecíveis. Carnes e derivados, a menos que sejam embalados, transportados e armazenados apropriadamente, sofrem com a degradação em um período de tempo relativamente curto (NYCHAS *et al*., 2008).

A carne suína é rica em nutrientes essenciais e possui sabor e maciez característicos, sendo a proteína de origem animal mais consumida no mundo, contribuindo para obtenção de uma alimentação balanceada. Ela é composta por proteínas de alto valor biológico, ácidos graxos monoinsaturados, vitaminas do complexo B e diversos minerais. Um músculo vivo possui valor de pH de 7,2. Ocorrido o abate, a carne continua em processo bioquímico, no qual o condutor energético do músculo é transformado em glicogênio lático via glicólise anaeróbia. O pH da carne suína diminui devido à formação de ácido lático a partir do piruvato e, assim, a carne passa a apresentar pH final entre 5,7 e 5,9. Após 24 horas, se o pH estiver superior a 6,2, a carne suína reterá grande quantidade de água, o que propicia o crescimento de microrganismos e implica em um tempo de conservação mais curto e coloração escura. O início da decomposição se dá em um pH acima de 6,5 e a completa deterioração da carne ocorre em valores de pH próximos a 8,5 (JAY, 2000). Durante o armazenamento, enzimas endógenas e microbianas degradam a carne e produzem amônias e aminas, o que causa a elevação do pH do alimento (GARCÍA-BARRIENTOS *et al*., 2006).

Diante dos fatores expostos, a comercialização da carne fresca exige o emprego de alguma tecnologia de preservação para controle da microbiota deteriorante. Os meios utilizados para preservação são refrigeração ou congelamento, cozimento, cura, secagem e embalagem. Alguns desses meios são geralmente utilizados em conjunto, como por exemplo, o sistema embalagem inteligente-refrigeração, que favorece a comercialização da carne fresca ao fornecer informações sobre as condições de armazenamento do produto (KERRY; O'GRADY; HOGAN, 2006).

3.6. Corantes Naturais como Sensores Colorimétricos

Os corantes naturais são bastante difundidos por não apresentarem propriedades que sejam prejudiciais à saúde do consumidor, cuja forma de obtenção abrange microrganismos, animais e vegetais (DAI; MUMPER, 2010). Entre os corantes não-sintéticos disponíveis, clorofilas, carotenoides, betaleínas e antocianinas se destacam pela intensidade de coloração, abundância na natureza e propriedades benéficas à saúde dos consumidores, características que os tornam atrativos para aplicações em produtos industrializados (DELGADO-VARGAS; JIMENEZ; PAREDES-LOPEZ, 2000).

Sensores aplicados como indicadores colorimétricos, à base de corantes naturais, apresentam amplo potencial para a fabricação de embalagens inteligentes (ZARAGOZÁ *et al*., 2015). Tais sensores têm encontrado aplicação em muitas áreas, não apenas em embalagens para alimentos. Um exemplo da aplicação dos sensores em embalagens inteligentes é o rótulo já utilizado em cervejas, que funciona como um dispositivo que tem sua cor alterada de acordo com as oscilações de temperatura. Nesse caso, o rótulo sofre uma mudança de coloração, avisando ao consumidor que a bebida foi submetida a uma temperatura inadequada ao consumo.

Além disso, filmes colorimétricos são amplamente utilizados para detecção de alterações no pH dos alimentos. Como a cor é uma característica de fácil percepção, a correlação pH-cor em uma embalagem possui forte apelo científico e tecnológico. O método de visualização é uma ótima alternativa para a determinação da deterioração do alimento como resultado do desenvolvimento de microrganismos ou por reações químicas. Um sensor colorimétrico sensível a alterações no pH e capaz de se dissolver em um meio aquoso, encontra boa aplicação em embalagens de alimentos perecíveis, como as carnes e seus derivados, uma vez que no processo de decomposição dos mesmos, há um alto teor de umidade no alimento, favorecendo a mudança da coloração diante da modificação do pH (KONGLIANG *et al*., 2014).

Liu e colaboradores (2017) desenvolveram um filme inteligente baseado nos polímeros amido e poliacetato de vinila e corantes antocianina e limoneno para monitoramento de mudanças no pH de alimentos e inibição do crescimento microbiano, respectivamente. A formação do filme se deu pela dupla ligação cruzada entre amido e poliacetato de vinila, possibilitada pela adição dos compostos trimetafosfato sódico e ácido bórico, o que aumentou a força mecânica e a resistência à umidade do filme polimérico. Adicionalmente, houve uma mudança de coloração distinguível ao se imergir o filme em soluções com valores de pH variados do 1,0 ao 14,0. O filme também apresentou excelente atividade antimicrobiana para três tipos distintos de bactérias indesejáveis em alimentos: *Bacillus subtilis*, *Aspergillus niger* e *Staphylococcus aureus*. Por fim, o filme exibiu indicação colorimétrica e atividade antimicrobiana expressivas em um teste no qual foi submetido à presença de leite pasteurizado.

3.7. Produção de Filmes Poliméricos

Os filmes poliméricos desenvolvidos para atuarem como embalagens devem preencher alguns requisitos específicos para seu uso, visto que não atuam apenas como um invólucro, mas também interagem de forma direta com o alimento. Dessa forma, características como boa qualidade sensorial, propriedades de barreiras e mecânicas eficientes, estabilidade bioquímica,

físico-química e microbiológica, inocuidade, processamento simples e baixo custo devem ser observadas (DEBEAUFORT; QUEZADA-GALLO; VOILLEY, 1995).

A elaboração de filmes envolve a utilização de diversos componentes, cada qual com sua finalidade específica. Essas formulações são constituídas de, pelo menos, um agente formador de filme (macromoléculas), solvente (água, etanol, água/etanol etc.), plastificante (glicerol, sorbitol, entre outros) e aditivos, quando necessários (aromas, vitaminas, antimicrobianos). Para a formação de filmes é necessária a utilização de, no mínimo, um constituinte capaz de formar uma matriz contínua e de coesão adequada, sendo este uma macromolécula. Os principais constituintes utilizados são: proteínas (caseína, proteína do soro do leite, proteína do trigo-glúten, colágeno e gelatina), polissacarídeos e seus derivados (derivados da celulose, quitosana, amido, alginatos, pectinas e gomas) e lipídios (monoglicerídeos, ácidos graxos, ceras naturais) (GUILBERT; CUQ; GONTARD, 1996).

A utilização de polissacarídeos ou proteínas na produção de filmes oferece a eles excelentes propriedades mecânicas e ópticas. No entanto, estes filmes são sensíveis à umidade e apresentam alto coeficiente de permeabilidade ao vapor d'água. Ao contrário, os filmes compostos de lipídios apresentam boas propriedades de barreiras ao vapor d'água, mas são opacos e pouco flexíveis (GALLO *et al*., 2000).

Os solventes utilizados na fabricação de filmes, normalmente, são: a água, o etanol ou a combinação de ambos (KESTER; FENNEMA, 1986). A macromolécula, ao dissolver-se, forma uma dispersão coloidal, isto é, um sistema composto por moléculas dispersas que têm dimensões muito maiores que as moléculas do solvente. Portanto, a solubilização da macromolécula está relacionada à sua capacidade de interagir com o solvente utilizado, sendo este um aspecto determinante na formação de filmes, visto que a total solubilidade é necessária para que este processo ocorra (XIONG, 1994).

Os plastificantes são substâncias que, quando adicionados a outro material, provocam alterações em suas propriedades físicas, químicas e mecânicas. Além disso, em sua maioria, apresentam caráter hidrofílico e, por serem geralmente moléculas pequenas, são facilmente acoplados entre as cadeias poliméricas em virtude de sua habilidade de reduzir a formação de pontes de hidrogênio entre as cadeias, causando um aumento do volume livre ou da mobilidade molecular do polímero (BODMEIER; PAERATAKUL, 1997). A incorporação de compostos plastificantes em biopolímeros modifica a organização molecular tridimensional da rede, diminuindo as forças de atração intermoleculares e aumentando o volume livre do sistema, o que melhora a flexibilidade e extensibilidade dos filmes (SOTHORNVIT; KROCHTA, 2000).

Os efeitos provocados pelo tipo de plastificante utilizado, bem como a escolha de sua concentração são complexos, uma vez que com o aumento da mobilidade da cadeia, os coeficientes de difusão também aumentam, resultando numa maior permeabilidade aos gases e ao vapor d'água (FAIRLEY *et al*., 1996). Entre os plastificantes normalmente utilizados em filmes, destacam-se os mono-, di- e oligossacarídeos (glicose e sacarose), polióis (glicerol, sorbitol e derivados da glicerina), lipídios (ácidos graxos saturados, monoglicerídeos e derivados de éster, fosfolipídios e surfactantes) e triacetina (BERTAN, 2003).

O método de fabricação de filmes baseados em biopolímeros pode ser de dois tipos: seco ou úmido. O processo seco baseia-se nas propriedades termoplásticas de alguns biopolímeros, principalmente amido e proteínas, em condições de baixo conteúdo de umidade e tem sido aplicado com sucesso por utilizar a tecnologia mais comum de fabricação, envolvendo tanto a fusão quanto a extrusão (FRITZ *et al*., 1994). O processo úmido, por sua vez, requer a dispersão da macromolécula, produzindo uma solução formadora de filme e tem sido extensivamente estudado e aplicado na produção de filmes comestíveis, biodegradáveis e coberturas. O processo de produção de filmes a partir de uma solução formadora envolve uma primeira etapa de solubilização da macromolécula em água, etanol ou outro solvente, com a possibilidade da incorporação de diversos aditivos, incluindo corantes que podem atuar como sensores colorimétricos. Na segunda etapa, essa solução é espalhada sobre um suporte e, usualmente, submetida à secagem. Esse método de produção de filmes é conhecido como método de *casting* (CUQ *et al*., 1995).

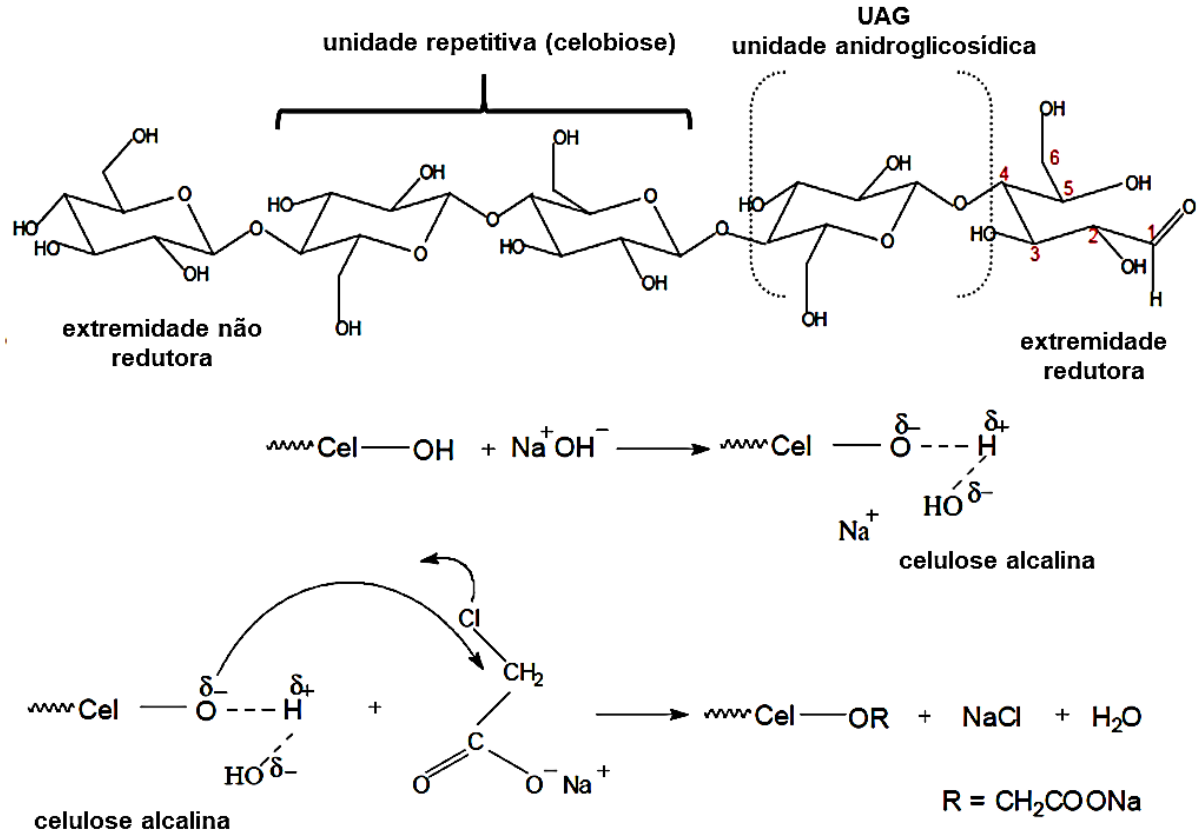
Finalmente, as características inerentes aos filmes poliméricos são resultantes de inúmeros fatores, tais como: natureza química e concentração da macromolécula e demais constituintes (solvente, plastificante, corante, aditivo), pH, condições de desnaturação, no caso da composição por proteínas, tipo de suporte utilizado, condições de secagem e ambientais, como temperatura e umidade (CARVALHO, 2002).

O filme polimérico desenvolvido no presente projeto de pesquisa é baseado no biopolímero carboximetilcelulose, no polímero sintético polióxido de etileno (PEO), utilizado na extração da antocianina, corante natural utilizado como sensor colorimétrico e glicerol, como agente plastificante. As funcionalidades dos compostos formadores do filme inteligente são abordadas ao longo da revisão bibliográfica.

3.8. Carboximetilcelulose (CMC)

A carboximetilcelulose (CMC) é um éter carboximetílico de celulose, aniônico, solúvel em água, obtido pela introdução de grupos -CH_2-COOH na cadeia molecular da celulose. A carboximetilcelulose é preparada em duas etapas pelo tratamento da celulose com ácido monocloroacético em presença de excesso de hidróxido de sódio, sob condições controladas. A alcalinização da celulose tem como objetivo potencializar o caráter nucleofílico das hidroxilas para o ataque ao carbono eletrofílico do agente eterificante, ácido monocloroacético (CERRUTTI, 2010). A Figura 3 é uma representação esquemática da reação da celulose que leva à obtenção da carboximetilcelulose de sódio.

Figura 3. Reação esquemática de obtenção da carboximetilcelulose de sódio (Adaptado de CERRUTTI, 2010).



Em soluções diluídas, as moléculas de CMC apresentam-se, na maior parte, estendidas, devido à repulsão eletrostática presente ao longo da cadeia principal do polímero, exibindo um maior raio hidrodinâmico. Em soluções concentradas, as moléculas de CMC se enovelam, proporcionando um emaranhamento, alcançando a forma de gel termo reversível (KÄISTNER *et al*., 1997).

Devido às suas propriedades, tais como solubilidade em água fria e quente, aumento da viscosidade da solução, adesividade, características de suspensão, retenção da água, resistência a óleos, gorduras e solventes orgânicos e habilidade para formação de filmes, a CMC apresenta potencial para aplicação na produção de embalagens para alimentos. (PILIZOTA; SUBARIC; LOVRIC, 1996).

A aplicação de um biopolímero como a carboximetilcelulose individualmente em um filme para embalagens pode ser limitada por não apresentar propriedades mecânicas tão fortes. No entanto, interações polímero-polímero podem ser reforçadas pela combinação do biopolímero com polímeros sintéticos ou biopolímeros com diferentes estruturas, introduzindo, predominantemente, interações de cargas em detrimento de ligações de hidrogênio (MENSITIERI *et al*., 2011). A carboximetilcelulose, utilizada na produção do filme inteligente de que se trata essa dissertação, interage com o polímero sintético polióxido de etileno (PEO), composto utilizado na extração da antocianina, corante que atua como sensor colorimétrico no filme.

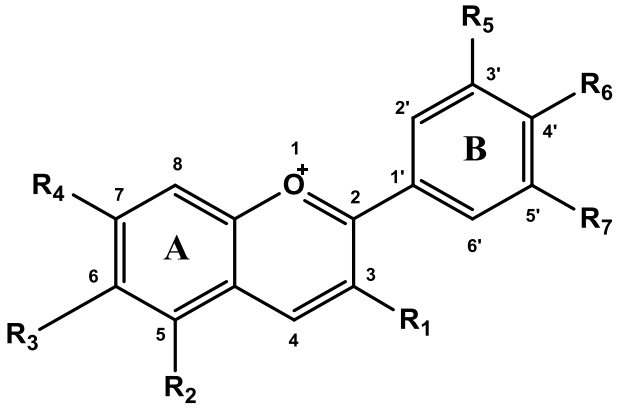
Šešlija e colaboradores (2018) produziram um filme baseado em carboximetilcelulose e pectina para aplicação em embalagens de alimentos, avaliando como a interação entre os polímeros interferia nas propriedades da embalagem. Os filmes foram produzidos pelo método de *casting* com diferentes concentrações de CMC, o mecanismo de ligação cruzada entre os dois biopolímeros foi possível pela introdução de íons Ca^{2+} e glicerol foi utilizado como plastificante. A adição de carboximetilcelulose melhorou as propriedades mecânicas dos filmes, quando comparados àqueles formados apenas por pectina, além de oferecer maior estabilidade térmica aos mesmos.

Honarvar e colaboradores (2017) desenvolveram um estudo cujo propósito era avaliar filmes baseados em carboximetilcelulose e polipropileno, incorporados do óleo essencial *Zataria multiflora* (4% v/v), com função antimicrobiana para embalagem de peito de frango refrigerado à 4 ºC. Diferentes filmes foram produzidos, com composições de apenas polipropileno, polipropileno/carboximetilcelulose e polipropileno/carboximetilcelulose/*Zatari a multiflora*. Através da técnica de contagem microbiana, concluiu-se que a vida útil dos produtos embalados com os filmes contendo o óleo essencial foi prolongada de três para nove dias, quando comparada ao sistema controle. Além disso, os filmes contendo CMC tiveram suas propriedades de permeabilidade ao oxigênio reduzidas, o que auxiliou na prevenção ao crescimento microbiano. Os resultados revelaram que o filme proposto apresentou potencial para aplicação em embalagens de alimentos.

3.9. Antocianinas

As antocianinas se configuram como compostos polifenólicos solúveis em água, pertencentes ao grupo dos flavonoides (FEDENKO; SHEMET; LANDI, 2017). São pigmentos encontrados em diversos tipos de grãos, frutos, vegetais, flores e folhas, conferindo tonalidades características a cada um destes (SIPAHLI; MOHANLALL; MELLEM, 2017). Naturalmente, atuam na atração de polinizadores e dispersores de sementes, além de oferecerem proteção contra processos oxidativos favorecidos pela luz ultravioleta e atuarem na eliminação de radicais livres. As antocianinas são derivadas do cátion flavílium, exposto na Figura 4, que também é conhecido como antocianidina. A sua estrutura é constituída por um anel aromático (A), que se associa a um segundo anel aromático (B) por meio de um heterociclo com três carbonos, onde o heteroátomo é sempre um oxigênio (FERNANDES, 2018).

Figura 4. Estrutura básica do cátion flavílium (Adaptado de FERNANDES, 2018).



Grande parte das antocianidinas estão associadas a derivados glicosilados (açúcares), o que as tornam mais estáveis (SIPAHLI; MOHANLALL; MELLEM, 2017), originando, assim, as antocianinas, cuja estrutura é apresentada na Figura 5 (CASTAÑEDA-OVANDO, 2009). Elas possuem duplas ligações conjugadas, responsáveis pela absorção de luz na faixa de 500 nm e podem ser até hexasubstituídas (CAVALCANTI; SANTOS; MEIRELES, 2011). Por essa razão, são encontrados na natureza mais de seiscentos tipos diferentes desses pigmentos, com as mais diversas colorações (DAI; MUMPER, 2010). Entre esses diferentes tipos de pigmento, sete estruturas de antocianinas se destacam por estarem presentes na maioria das fontes, sendo elas: cianidina-3-glicosídeo, cianidina-3- galactosídeo, cianidina-3-rutinosídeo, delfinidina-3-glicosídeo, pelargonidina-3-glicosídeo, malvidina-3-glicosídeo e peonidina-3-glicosídeo (FERNANDES, 2018). As principais características estruturais dessas espécies de antocianina encontram-se na Tabela 2.

Figura 5. Estrutura geral das antocianinas (Adaptado de FERNANDES, 2018).

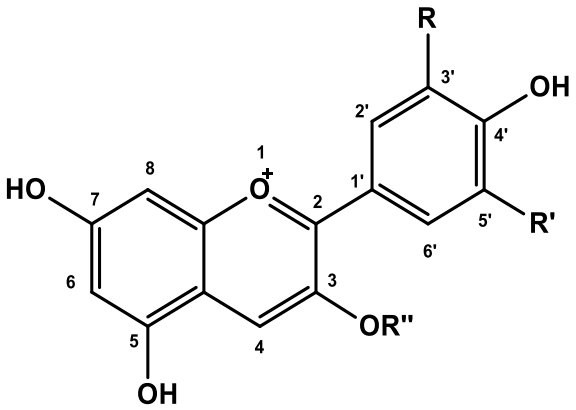


Tabela 2. Características das principais antocianinas encontradas na natureza (Adaptado de FERNANDES, 2018).

Antocianina	Grupo R	Grupo R'	Grupo R"
cianidina-3-glicosídeo	OH	H	glicose
cianidina-3-galactosídeo	OH	H	galactose
cianidina-3-rutinosídeo	OH	H	rutinose
delfinidina-3-glicosídeo	OH	OH	glicose
pelargonidina-3-glicosídeo	H	H	glicose
malvidina-3-glicosídeo	OCH_3	OCH_3	glicose
peonidina-3-glicosídeo	OCH_3	H	glicose

As antocianinas apresentam um vasto espectro de cores, que vai do vermelho ao azul, sendo a cor e a estabilidade dependentes do número de hidroxilas, metoxilas, natureza e número de açúcares e ácidos alifáticos/aromáticos ligados aos açúcares e da posição em que esses grupos se encontram na molécula (MAZZA; BROUILLARD, 1987). De forma geral, hidroxilas aumentam a intensidade da cor azul e auxiliam na estabilização das moléculas de antocianinas (IACOBUCCI; SWENNY, 1983), enquanto as metoxilas aumentam a intensidade da coloração vermelha (MAZZA; BROUILLARD, 1987). Quando a molécula apresenta apenas um açúcar e este se encontra em C3, a antocianina é mais estável e possui coloração mais intensa que o açúcar em C5 ou que dois açúcares em C3 e C5 (GIUSTI; RODRIGUEZ-SAONA; WROLSTAD, 1999). A acilação também é responsável pelo aumento da estabilidade, já que as antocianinas poliaciladas e com substituintes aromáticos são mais estáveis que os alifáticos, pois aumentam a conjugação das duplas ligações na molécula (TACHIBANA; KIMURA; OHNO, 2014). Porém, antocianinas aciladas são raramente encontradas na natureza.

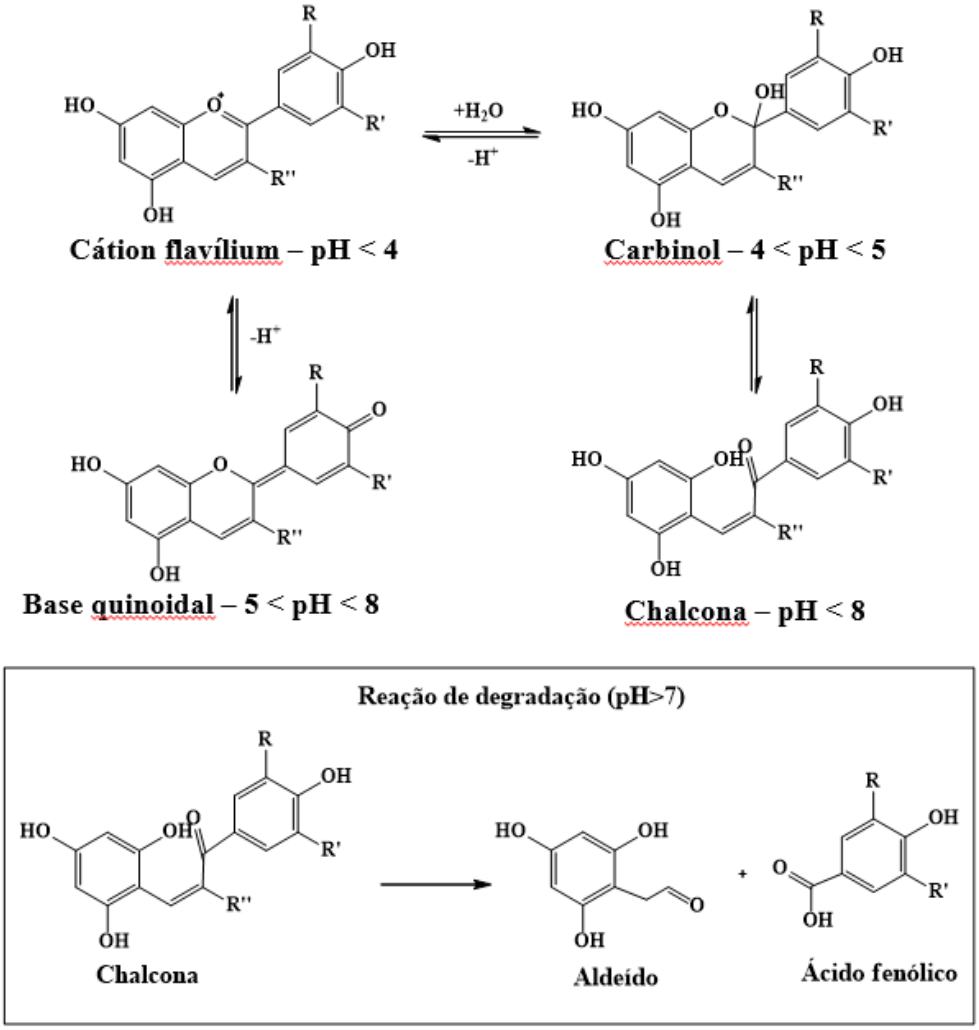
Além dos grupos substituintes, outros fatores são determinantes na manutenção da estrutura e cor das antocianinas como o pH, parâmetro de extrema importância para esse trabalho, uma vez que o sensor colorimétrico desenvolvido à base de antocianina, atua sob o efeito das variações de pH no meio que contém o alimento. O parâmetro temperatura também é relevante nesse caso, principalmente durante os processos de extração da antocianina e secagem dos filmes produzidos.

3.9.1. Influência do pH

A cor predominante em determinada solução contendo antocianina varia de acordo com o pH, uma vez que várias espécies químicas podem estar presentes (DELGADO-VARGAS; JIMENEZ; PAREDES-LOPEZ, 2000). Existem quatro formas principais que se encontram em equilíbrio: cátion flavílium, base quinoidal, pseudo-base carbinol e chalcona, expostas na Figura 6. Em pH < 4, a espécie majoritária é o cátion flavílium, que caracteriza a coloração vermelha. Para a faixa de pH entre 5 e 8, ocorre uma desprotonação da molécula e a espécie predominante torna-se a base quinoidal, de coloração azul/violeta. Para valores de pH entre 4 e 5, ocorre a formação do carbinol, que é incolor, por meio do ataque nucleofílico da água ao cátion flavílium e, a chalcona, levemente amarelada, é seu tautômero. Para valores de pH acima de 7, as chalconas são as estruturas predominantes (CASTAÑEDA-OVANDO, 2009). As quantidades relativas de cada forma variam de acordo com o pH e com a estrutura da antocianina, sendo o cátion flavílium considerado a forma mais estável (FOSSEN; CABRITA; ANDERSEN, 1998).

Em relação à estabilidade da coloração em função do pH, Fossen, Cabrita e Andersen (1998) realizaram um acompanhamento da estabilidade da cor de antocianinas em relação ao tempo de estocagem e observaram que a absorbância é maior quanto mais ácida a solução (pH $\leq$ 1,0) e que, em sessenta dias, a antocianina mantida em meios cujos valores de pH eram mais baixos manteve-se mais estável, pois houve menor variação no valor da absorbância.

Figura 6. Estruturas das principais formas químicas das antocianinas em diferentes valores de pH (Adaptado de BORDIGNON et al., 2009).



3.9.2. Influência da Temperatura

A temperatura é um fator importante que deve ser levado em conta na etapa de extração das antocianinas (LIN; CHOU, 2009), uma vez que ela é capaz de melhorar a eficiência do processo, favorecendo a transferência de massa e diminuindo o tempo da extração (OANCEA; STOIA; COMAN, 2012). Por outro lado, o aumento demasiado da temperatura pode levar à degradação da estrutura do pigmento e, assim, deve-se cuidar para que isto não ocorra principalmente durante a etapa de secagem dos filmes poliméricos (LOYPIMAI; MOONGNGARM; CHOTTANOM, 2016). Cacace e Mazza (2003) relataram que a extração máxima de antocianinas em frutas vermelhas ocorreu na faixa de temperatura entre 30 e 35 ºC, para extrações realizadas em solução de etanol ou água sulfurosa. No entanto, eles descreveram

que acima de 45 ºC houve uma diminuição da quantidade extraída da substância, devido à uma provável degradação de antocianina.

A temperatura de armazenamento do extrato também deve ser estudada, já que a degradação pode aumentar de maneira proporcional. Pigmentos submetidos a temperaturas de 65 a 90 ºC apresentam um tempo de meia vida de apenas algumas horas. Por outro lado, a estocagem em temperaturas entre 2 e 4 ºC é suficiente para manter as antocianinas estáveis por um longo período de tempo (WELCH; WU; SIMON, 2008).

3.9.3. Antocianinas no Arroz Negro

O arroz é um tipo de grão considerado fundamental na dieta da maior parte da população mundial, sendo que os principais países consumidores e também produtores se encontram no continente asiático, como é o caso da China, a maior produtora do mundo. Embora o arroz branco seja o mais conhecido e consumido, existem outras variedades como o vermelho, o verde, o roxo, o marrom e o negro, além de seus híbridos, considerados mais nutritivos e, diante de uma maior preocupação da sociedade quanto à saúde, seu consumo tem sido cada vez maior (PEDRO; GRANATO; ROSSO, 2016).

O arroz negro é uma espécie de arroz pigmentado muito rico em nutrientes, contendo alto teor de proteínas e fibras (SOMPONG *et al*., 2011). Além do mais, possui compostos fenólicos em abundância, tais como as antocianinas, que são notoriamente conhecidas por seus efeitos benéficos à saúde, principalmente por apresentarem propriedades antioxidantes, o que as tornam capazes de atuar na eliminação de radicais livres. Chen e colaboradores (2012) desenvolveram estudos que apontaram que entre as variedades de arroz branco, verde, vermelho e negro, este apresentou um teor muito maior de antocianinas, sendo que no arroz branco e verde, elas não foram identificadas, como pode ser visto na Tabela 3.

Na etapa de beneficiamento do arroz negro, além do grão com qualidade para comercialização, são gerados subprodutos e resíduos. O principal subproduto gerado é o arroz negro quebrado, configurando 20% do total produzido. Segundo a empresa Ruzene® (Pindamonhangaba, São Paulo, Brasil), produtora de arroz negro, este pode apresentar uma desvalorização de até 50%, visto que é aproveitado apenas na produção de ração animal e farinha. Além do grão quebrado, resíduos como casca e farelo também são gerados e podem ser usados como fontes estratégicas de antocianinas, transformando-os em produtos de alto valor agregado (JHA; DAS; DEKA, 2017).

Tabela 3. Teor e proporção de antocianinas em quatro diferentes grupos de arroz (Adaptado de CHEN *et al*., 2012).

Cultivo	Antocianina (mg/100 g) *				TAC (mg/100 g)
	C3G	P3G	Pt3G	Malvidina	
Arroz branco					
Nakateshinsenbon	nd	nd	nd	nd	Nd
Arroz verde					
Akunemochi	nd	nd	nd	nd	Nd
Arroz vermelho					
Tohboshi	nd	nd	nd	16,9±5,4	16,9
Benisarasa	nd	nd	nd	24,3±1,8	24,3
Tsukushiakamoch	nd	nd	nd	7,9±1,7	7,9
Beniroman	nd	nd	nd	34,4±8,3	34,4
Arroz negro					
Chinakuromai	30,8±1,2	101,0±7,8	168,3±9,1	40,9±2,7	341,0
Asamurasaki	249,6±2,0	142,8±25,6	nd	81,2±19,5	473,7
Okunomurasaki	48,0±0,2	9,4±2,8	nd	22,1±5,0	79,5

*Valores expressos como média ± desvio padrão (n=3). TAC: teor total de antocianinas. nd: não detectado.

Fernandes (2018) desenvolveu um método simples, otimizado e sustentável de extração de antocianinas a partir de subproduto e resíduos do beneficiamento do arroz negro, utilizando soluções aquosas de polietilenoglicol. Considerando as características e o alto teor de antocianinas também presentes nos grãos, enquanto subprodutos, esse procedimento pode conduzir a um direcionamento na aplicação desses extratos como sensores colorimétricos.

3.9.4. Método de Extração de Antocianinas em Soluções Aquosas de Polímeros

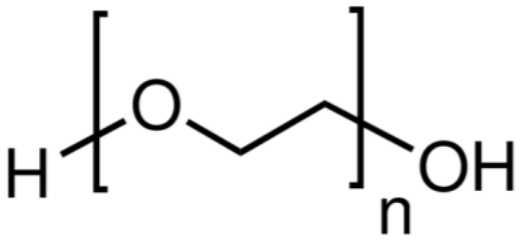
As antocianinas demonstram um forte potencial para substituição de corantes sintéticos nos mais diversos setores da indústria. No entanto, para que sua utilização se torne viável, faz-se necessário o isolamento do pigmento de sua fonte de origem. Para tanto, diferentes técnicas vêm sendo empregadas, abrangendo daquelas consideradas mais simples até as mais sofisticadas, levando-se em conta, principalmente, aquelas que causam menos impactos ao meio ambiente (Liu *et al*., 2013).

A extração por solvente configura-se como o método mais tradicional de obtenção das antocianinas. Neste método, o material que serve como fonte dos pigmentos é primeiramente macerado, triturado ou liofilizado e, posteriormente, submetido ao contato com o solvente adequado. Normalmente, esse solvente possui grupos hidrofílicos em suas moléculas, sendo os mais empregados o etanol, metanol ou acetona (DAI; MUMPER, 2010). Entre os solventes citados, o metanol é considerado o mais eficiente para o processo de extração (SCHIOZER; BARATA, 2013). Embora a técnica seja considerada simples, ela necessita de quantidades

elevadas de solvente e um longo período para que a maior taxa possível de extração aconteça, o que pode ser considerado uma desvantagem do método.

O polióxido de etileno (PEO), cuja estrutura é apresentada na Figura 7, é um homopolímero não iônico de óxido de etileno, representado pela fórmula $(OCH_2CH_2)_n$, em que n é o número médio de grupos óxidos de etileno. O composto pode ser sólido ou líquido, abrangendo uma ampla faixa de viscosidade. Em geral, ele se apresenta líquido quando possui baixo peso molecular, sendo conhecido nesse estado como polietilenoglicol e sólido para pesos moleculares considerados altos, sendo que quanto maior a massa molecular, maior a viscosidade apresentada (DAI; TAM, 2005).

Figura 7. Fórmula estrutural do polímero polióxido de etileno (Adaptado de DAI; TAM, 2005).



O polióxido de etileno demonstra algumas vantagens, como o fato de ser relativamente barato, atóxico, com propriedades que variam em consonância com o peso molecular. Esse polímero tem apresentado fundamental importância na indústria farmacêutica e química, com ampla aplicação em cosméticos, plásticos, fármacos e embalagens (LIU; WANG, 2017).

De forma geral, a literatura não traz informações sobre processos de extração de antocianinas envolvendo apenas soluções aquosas de polímero. No entanto, Fernandes (2018) realizou a técnica com a utilização do polímero polietilenoglicol (PEG), obtendo uma alta taxa de extração de antocianinas provenientes do arroz negro. As condições ótimas do processo envolveram um tempo de extração de 25 h, com uma concentração de PEG 1.500 de 45% m/v, uma massa de arroz negro macerado de 5,00 g, sob a temperatura de 45 ºC. Este trabalho foi utilizado como base na pesquisa proposta para a extração da antocianina, com a substituição do polietilenoglicol por polióxido de etileno, que possui a mesma composição e fórmula estrutural do primeiro, diferindo apenas por se apresentar no estado sólido.

3.9.5. Antocianinas em Embalagens Inteligentes para Alimentos

Golasz, Silva e Silva (2013) elaboraram um filme de fécula de mandioca, glicerol e antocianinas cuja aplicação envolvia a detecção da deterioração sofrida por carnes suínas

refrigeradas, através da mudança de coloração do filme. Os filmes foram preparados pela técnica de *casting*, a partir de uma solução filmogênica contendo fécula de mandioca (3% m/m), glicerol (3% m/m) e antocianinas (0,5% m/m). 35 g da suspensão foram depositados em placas de Petri e secos em estufa por 24 horas a 40 ºC. Depois de secos, os filmes foram armazenados por 48 horas sob condições controladas à 22 ºC e 75% de umidade relativa. Posteriormente, porções de lombo suíno foram colocadas em placas de vidro com um filme de antocianinas no fundo e armazenadas a 4 ºC. Durante a estocagem, observou-se um aumento na população microbiana e elevação do pH, como resultado da deterioração da carne. Ao mesmo tempo, foram detectadas mudanças de cor no filme. Embora não tenha sido possível identificar o fim da vida de prateleira do alimento, constatou-se que o filme é eficiente na indicação do processo de deterioração de carnes suínas.

Prietto e colaboradores (2017) desenvolveram filmes sensíveis a mudanças no pH, a partir de amido de milho e antocianinas extraídas de feijão preto e repolho roxo. Os pigmentos de ambas as fontes foram extraídos por solvente (etanol acidificado) em uma concentração de 0,07 $mg \cdot mL^{-1}$. A solução polimérica foi produzida pela mistura de 3 g de amido de milho comercial, 0,9 g de glicerol e 80 mL de água destilada, sob agitação. Em seguida, 20 mL de extrato de antocianina 0,07 $mg \cdot mL^{-1}$ foram adicionados à solução polimérica e 20 mL da solução final foram depositados em uma placa de vidro, submetida à secagem em estufa a 30 ºC por, aproximadamente, 16 h. Embora os filmes contendo antocianinas provenientes do repolho roxo tenham apresentado maior estabilidade durante a estocagem sob refrigeração e maior variação de cores quando submetidos a alterações no pH, a pesquisa sugeriu uma associação entre antocianinas de repolho roxo e feijão preto, visto que estas proporcionam uma resposta imediata quanto à mudança de coloração diante da variação do pH. Finalmente, inferiu-se que os filmes possuem aplicação em embalagens inteligentes, principalmente como etiquetas de indicação colorimétrica, sendo preferidos para monitoramento de alimentos refrigerados como as carnes.

Zhai e colaboradores (2017) produziram filmes para monitoramento do frescor de peixes baseados em amido e poliacetato de vinila (PVA), incorporados de antocianinas provenientes de hibiscos (*Hibiseus sabdariffa*). Os pigmentos foram extraídos de cálices de hibiscos desidratados e a solução polimérica foi obtida numa razão mássica de 2:1 (amido/PVA). Os filmes colorimétricos foram produzidos pelo método de *casting* a partir da imobilização de 30, 60 e 90 mg de antocianinas para cada 100 g de amido nas matrizes poliméricas. Foi estabelecido que a presença das antocianinas melhorou a compatibilidade entre

o amido e o PVA e que os filmes mantiveram sua estabilidade de coloração tanto em temperatura ambiente quanto refrigerados. Os testes de monitoramento do estado de conservação de carpas silvestres mostraram que os filmes apresentaram mudança de coloração visível diante da liberação de compostos nitrogenados voláteis, característicos da decomposição de peixes, o que provoca uma elevação no pH do alimento. Assim, concluiu-se que estes filmes apresentam grande potencial para serem utilizados como embalagens inteligentes no monitoramento do frescor de peixes.

Choi e colaboradores (2017) utilizaram ágar, amido de batata e antocianina extraída de batata-doce para a fabricação de um filme colorimétrico indicador de pH, aplicado a embalagens inteligentes. A antocianina foi extraída da batata-doce pelo método de extração por solvente, através da dissolução de 100 g de pó de batata-doce em 1 L de etanol 40% v/v. Os filmes poliméricos incorporados do extrato de antocianina foram preparados pelo método de *casting*. Em seguida, os filmes foram imersos em soluções com diferentes taxas de acidez, provando a sensibilidade do corante quanto a variações de pH. Os filmes também foram aplicados a fatias de carne suína e acompanhou-se o processo de decomposição da carne refrigerada através de alterações em seu pH. Os resultados obtidos indicaram que houve alteração nas cores dos filmes à medida que a degradação do alimento acontecia. Assim, os filmes colorimétricos produzidos foram considerados boas alternativas para garantir a qualidade e segurança do consumo de carnes.

Zhang e colaboradores (2019), também desenvolveram filmes inteligentes para monitoramento das condições de armazenamento de carnes suínas. Neste estudo, filmes poliméricos biodegradáveis foram produzidos a partir de amido, poliacetato de vinila (PVA) e quitosana incorporados de antocianinas obtidas de hibiscos. A extração das antocianinas foi realizada pelo método de extração por solvente. Cálices de hibiscos foram desidratados e macerados e 1 g desse pó foi adicionado a 15 mL de etanol 80% em meio acidificado para um valor de pH igual a 2. Foram preparadas soluções de 2 g de amido em 100 mL de água destilada, 2 g de PVA em 100 mL de água destilada e 2 g de quitosana em 100 mL de solução de ácido acético (1% v/v). As soluções finais apresentaram razão 1:1 para amido/PVA, amido/quitosana e PVA/quitosana, com acréscimo do extrato de antocianinas (2,5% v/v). Posteriormente, 18 mL de cada uma das soluções foram depositados em placas de Petri e submetidos à secagem por 18 h em uma temperatura de 25 ºC. Os filmes secos foram aplicados à carne suína em temperatura ambiente e tiveram sua coloração alterada a partir do início do processo de degradação do alimento. Os melhores resultados, tanto para a atividade antioxidante quanto

para a efetividade na mudança de cor, foram obtidos para o filme de amido/PVA/antocianina, representando uma escolha apropriada para o desenvolvimento de embalagens inteligentes e ativas.

O foco principal desse trabalho foi a avaliação do estado de conservação de carnes suínas a partir da incorporação do corante natural antocianina em um biofilme, produzindo assim uma embalagem inteligente, cuja atuação se baseou em alterações no pH do meio, provocadas pela decomposição do alimento. Embora a literatura não apresente estudos nos quais os filmes para embalagem sejam fabricados exatamente com os mesmos compostos utilizados nesse trabalho (antocianina, polióxido de etileno, carboximetilcelulose e glicerol) e aplicados ao mesmo tipo de alimento (carne suína), há uma vasta gama de estudos que utilizam antocianinas e diferentes tipos de polímeros ou biopolímeros em embalagens para alimentos perecíveis. Dessa forma, estes estudos se configuram como uma base importante para que se possa prever e analisar o comportamento e a funcionalidade do biofilme produzido no presente trabalho.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Materiais

Para a extração das antocianinas foi utilizado o subproduto do arroz negro comercial, gentilmente cedido pela empresa Ruzene® (Pindamonhangaba, Brasil), polióxido de etileno – PEO 1.500 (Vetec – Química Fina, Brasil), ácido clorídrico 1,0 mol·L^{-1} (Honeywell, Áustria) e água destilada. Para o preparo da solução filmogênica, além do extrato de antocianina, foram utilizados goma carboximetilcelulósica de sódio (Ingredientes Online, Brasil) e glicerol (Cromato Produtos Químicos, Brasil). Lombo suíno foi adquirido em mercado local na cidade de Conselheiro Lafaiete, Minas Gerais, Brasil, no mês de novembro de 2019 para a realização dos testes de interação entre carne e filme. Os reagentes utilizados na execução deste trabalho foram de grau analítico.

Os equipamentos necessários para a execução do projeto foram processador de alimentos comercial (Philco, Brasil), balança analítica (Shimadzu, Brasil), agitador magnético (DiagTech, Brasil), pHmetro digital (Digimed, Brasil), incubadora (Cientec, Brasil), ultrassom (Sanders Medical, Brasil), centrífuga (Solab Científica, Brasil), *shaker* (Novatécnica, Brasil), estufa de secagem (Solab Científica, Brasil), refrigerador (Brastemp, Brasil), texturômetro (AT/G Tensile Grips, Inglaterra), micrômetro (Syatek, China) e analisador termogravimétrico e calorímetro diferencial de varredura (Shimadzu, Brasil).

4.2. Métodos

4.2.1. Extração por polímero da antocianina a partir do subproduto de arroz negro

4.2.1.1. <u>Preparo das amostras do subproduto de arroz negro</u>

As amostras do subproduto de arroz negro comercial foram previamente caracterizadas para determinação do teor de lipídios, por extração contínua em aparelho de Soxhlet (ASSOCIATION OF ANALYTICAL CHEMISTS, 1995); proteínas, pelo método de Kjeldahl (composto pelas etapas de digestão, destilação e titulação); fibras, pelo método descrito pela AOAC (ASSOCIATION OF ANALYTICAL CHEMISTS, 1995), que utiliza o princípio enzimático e gravimétrico; carboidratos, pela diferença entre a massa de amostra total e demais constituintes e antocianinas monoméricas totais, pelo método de extração desenvolvido por Kapasakalidis (KAPASAKALIDIS; RASTALL; GORDON, 2006), além da determinação do teor de umidade pelo método de secagem em estufa até que se atingisse massa constante e

quantidade total de cinzas, por meio da combustão de amostra e posterior pesagem. Esta caracterização foi realizada pelo grupo de pesquisa da Profa. Aparecida Barbosa Mageste da UFOP, parceira deste trabalho (FERNANDES, 2018). O subproduto do arroz negro foi triturado em um processador de alimentos e armazenado em frasco vedado e protegido da luz à 25 ºC para posterior utilização.

4.2.1.2. Extração de antocianinas com solução polimérica

As soluções aquosas de extrato foram preparadas em diferentes concentrações de polímero PEO 1.500 e de subproduto de arroz negro triturado a uma concentração fixa de 8,0% m/v. O pH da água destilada utilizada foi reajustado para 1,0, com solução de HCl 1,0 $mol \cdot L^{-1}$, via pHmetro digital (FERNANDES, 2018).

A solução de extrato foi agitada a 200 rpm em um *shaker*, por 25 h, protegidos da luz. Após esse processo, os extratos foram centrifugados por 10 min a 3087 *g* para a retirada de resíduos sólidos. Posteriormente, as soluções foram armazenadas em refrigerador à 4 ºC para s futuras (FERNANDES, 2018).

4.2.1.3. Preparo da solução de carboximetilcelulose

Uma solução aquosa de goma carboximetilcelulósica foi preparada em diferentes concentrações (Tabelas 4 e 5), sob constante homogeneização em agitador magnético à 80 ºC.

4.2.2. Produção do biofilme para a embalagem

4.2.2.1. Etapa preliminar: avaliação da composição ótima para produção do biofilme

Um planejamento experimental Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) foi utilizado a fim de se determinar a composição ótima para a formação do biofilme. As variáveis avaliadas foram concentração de PEO 1.500 (4,9 a 55,1 % m/v), de CMC (0,16 a 1,84 % m/v) e de glicerol (0,98 a 11,02 % m/v). As concentrações de extrato nos biofilmes mantiveram-se fixas em 30 % v/v. O total de experimentos foi 17 e a matriz experimental está apresentada na Tabela 4. A obtenção do biofilme foi via método de *casting*, caracterizado pela deposição da solução filmogênica sobre uma superfície sólida e posterior secagem em estufa à 40 °C.

Tabela 4. 1º Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) desenvolvido para as composições de polióxido de etileno (PEO 1.500), carboximetilcelulose (CMC) e glicerol.

Experimento	PEO 1.500 (%)	CMC (%)	GLICEROL (%)
1	15	0,5	3
2	15	1,5	9
3	45	0,5	9
4	45	1,5	3
5	30	1	6
6	15	0,5	9
7	15	1,5	3
8	45	0,5	3
9	45	1,5	9
10	30	1	6
11	4,9	1	6
12	55,1	1	6
13	30	0,16	6
14	30	1,84	6
15	30	1	0,98
16	30	1	11,02
17	30	1	6

Concentrações dos compostos em m/v.

Volumes de 30 mL de cada uma das soluções filmogênicas foram adicionados a placas de Petri de 50 cm^2. Posteriormente, as placas foram submetidas à 40 ºC em estufa de secagem até que estivessem completamente secas. Após secagem, os biofilmes foram mantidos em uma incubadora com a umidade relativa de 75,0% com uma solução salina de cloreto de sódio saturada e, após 3 dias, os filmes foram removidos da placa.

As imagens das superfícies dos biofilmes foram analisadas colorimetricamente para estabelecer uma relação entre a eficiência de extração da antocianina e a cor obtida no filme. Os métodos de captura e análise de imagem foram empregados como descrito por Yam e Papadakis (2003), envolvendo o registro por uma câmera digital e obtenção dos dados de distribuição das cores por coordenadas CIELab no software Adobe Photoshop® CS6. No modelo de análise CIELab, L* representa o componente de luminosidade, a* representa uma tendência de coloração vermelha para valores positivos e verde para valores negativos e b* uma tendência de coloração amarela para valores positivos e azul para valores negativos. As coordenadas L*, a* e b* foram usadas para os cálculos de parâmetros como o ângulo de matiz hab, que denota tonalidade; croma C*, que denota intensidade; e diferença de coloração ΔE* por meio das Equações 1, 2 e 3, respectivamente (SCHANDA, 2007).

$$h_{ab} = \arctan\left(\frac{b^*}{a^*}\right) \quad (1)$$

$$C^* = \left(a^{*^2} + b^{*^2}\right)^{1/2} \quad (2)$$

$$\Delta E^* = \left(\Delta L^{*^2} + \Delta a^{*^2} + \Delta b^{*^2}\right)^{1/2} \quad (3)$$

A partir desta mesma análise, posteriormente, foi possível observar a variação de cores e determinar uma escala característica dos biofilmes de acordo com a degradação das fatias de carne ao longo do tempo de estocagem. As medidas foram tomadas em cinco pontos aleatórios das superfícies dos biofilmes.

4.2.2.2. Etapa intermediária: definição da composição ótima para produção do biofilme

Finalizada a análise colorimétrica da etapa preliminar e levando-se em consideração a eficiência de extração das antocianinas presentes em cada biofilme, observou-se que não foram atingidas as condições ótimas de um filme plástico. Visualmente, as amostras não exibiram características de homogeneidade, uniformidade e plasticidade. Assim, um novo planejamento experimental foi desenvolvido com diferentes concentrações dos reagentes utilizados, sendo PEO 1.500 (1,63 a 18,37 % m/v), CMC (0,16 a 1,84 % m/v) e glicerol (0,65 a 7,35 % m/v). As novas concentrações de PEO 1.500 foram mais baixas para favorecimento da formação do biofilme, de acordo com o primeiro delineamento experimental. As concentrações de glicerol também foram readequadas para valores mais baixos, uma vez que valores elevados favoreceram a presença de umidade nos biofilmes. Mais uma vez, o planejamento experimental DCCR foi implementado, englobando 17 experimentos, como observado na Tabela 5.

Tabela 5. 2º Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) desenvolvido para as composições de polióxido de etileno (PEO 1.500), carboximetilcelulose (CMC) e glicerol.

Experimento	PEO 1.500 (%)	CMC (%)	GLICEROL (%)
1	5	0,5	2
2	5	1,5	6
3	15	0,5	6
4	15	1,5	2
5	10	1	4
6	5	0,5	6
7	5	1,5	2
8	15	0,5	2
9	15	1,5	6
10	10	1	4
11	1,63	1	4
12	18,37	1	4
13	10	0,16	4
14	10	1,84	4
15	10	1	0,65
16	10	1	7,35
17	10	1	4

Concentrações dos compostos em m/v.

Após a secagem, os biofilmes foram mantidos em uma incubadora com a umidade relativa de 75,0 % com uma solução salina de cloreto de sódio saturada e, após 3 dias, os filmes foram removidos da placa e analisados conforme o item 4.2.2.1.

4.2.2.3. Etapa final: produção do biofilme

Definidas as concentrações ideais de cada reagente, uma solução filmogênica foi preparada e homogeneizada em agitador magnético por 20 min e, em seguida, foi levada ao ultrassom por 15 min para evitar a formação de bolhas durante a etapa de secagem. Um volume de 60,0 mL de solução foi depositado em uma placa de 11 x 13 cm^2 que foi seca em estufa à 40 ºC. Após a secagem, os biofilmes foram mantidos em uma incubadora com a umidade relativa de 75,0% com uma solução salina de cloreto de sódio saturada e, após 3 dias, os biofilmes foram removidos da placa e submetidos ao contato com a carne suína para os testes de degradação.

4.2.3. Caracterização do biofilme

4.2.3.1. Espessura

A espessura do biofilme foi medida utilizando-se micrômetro digital com divisões de 0,001 mm e capacidade de leitura de 0 a 12,7 mm. As medidas de espessura foram tomadas aleatoriamente em cinco posições distintas de dez replicatas do biofilme.

4.2.3.2. Propriedades mecânicas

Para determinação das propriedades mecânicas do biofilme, inicialmente os corpos de prova foram cortados em dimensões de 120,0 mm x 50,0 mm e foram produzidas 3 repetições de uma mesma amostra. Os biofilmes foram previamente acondicionados em dessecador à 25 °C e 75,0 % de umidade controladas por, pelo menos, 40 horas, de acordo com a norma ASTM D882-12 que compreende a determinação das propriedades de tensão ou tração de plásticos em forma de folhas delgadas, incluindo filmes, com espessura menor que 1,0 mm (AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS, 2012).

As propriedades mecânicas dos biofilmes, incluindo deformação na ruptura ou elongação, resistência à tração e módulo de elasticidade, foram obtidas por ensaio de tração em texturômetro com célula de carga de 50 kgf, controlado pelo *software* Exponent Stable Micro Systems (Stable Micro System, Inglaterra).

4.2.3.3. Gramatura

Em uma balança analítica, as massas dos biofilmes foram aferidas e os valores obtidos foram divididos pela área da placa de 5,15 x 10^{-3} m^2. Os teores de sólidos totais foram estabelecidos dividindo-se os valores das massas obtidas para cada amostra pela área, em $g \cdot m^{-2}$.

4.2.3.4. Permeabilidade ao vapor d'água

A determinação da permeabilidade ao vapor de água dos biofilmes foi realizada pelo método gravimétrico padrão E96/E96M-16 (AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS, 2016). Dez gramas de sílica gel azul foram acrescentados a frascos de 50 mL. Triplicatas dos biofilmes foram adicionados aos frascos e estes foram lacrados e inseridos em um dessecador, cuja umidade relativa foi mantida em 75,0%, utilizando-se solução de cloreto de sódio saturada. O dessecador foi submetido ao vácuo e incubado à 25 ºC e o ganho de massa da sílica gel foi analisado a cada 24 h por um período de cinco dias. A permeabilidade ao vapor d`água (PVA) foi calculada de acordo com a Equação 4:

$$PVA = \frac{Q \times l}{A \times t \times S_P \times (R_1 - R_2)} \quad (4)$$

Em que:

Q: ganho de massa (g);

A: área exposta do biofilme (m^2);

t: tempo (dias);

l: espessura do filme (mm);

S_P: pressão de vapor saturado da água na temperatura do experimento (kPa);

R_1: umidade relativa no dessecador;

R_2: umidade relativa no interior do frasco.

4.2.3.5. Análises térmicas

Um analisador termogravimétrico e calorímetro diferencial de varredura foi utilizado para monitoramento das propriedades térmicas dos biofilmes. A análise termogravimétrica (TGA) foi realizada com uma amostra de 5,075 mg, aquecida de 0 a 600 °C à uma taxa de aquecimento de 10 °C/min, sob um fluxo de nitrogênio de 50,0 mL/min em uma célula de alumina. Mudanças na massa em função da temperatura foram registradas. As análises de

calorimetria exploratória diferencial (DSC) foram realizadas com uma amostra de 4,710 mg, sob as mesmas condições das análises termogravimétricas.

4.2.4. Aplicação do biofilme à carne suína

4.2.4.1. Fracionamento da carne

Uma porção de lombo suíno foi adquirida em mercado local na cidade de Conselheiro Lafaiete, Minas Gerais, Brasil e devidamente refrigerada. A fim de se evitar contaminação, técnicas de assepsia foram empregadas como o uso de luvas, aplicação de bactericidas na tábua de corte e esterilização por chama do instrumento de corte. Amostras com dimensões de 20 x 10 x 10 mm foram preparadas e reservadas para a realização de testes de interação com o biofilme sob duas condições distintas: à temperatura ambiente, de 25 ºC e à 4 ºC, em refrigerador.

4.2.4.2. Testes de interação com o biofilme

As amostras de carne preparadas foram depositadas sobre biofilmes com dimensões de 30 x 20 mm. Para as amostras submetidas à temperatura ambiente, foram realizadas análises colorimétricas dos biofilmes e medição do pH das fatias de carne diariamente, durante cinco dias. Já para as amostras armazenadas em refrigerador, sob 4 ºC, análises colorimétricas dos biofilmes e medição do pH do alimento foram realizadas a cada dois dias, durante vinte dias. Os sistemas biofilme/carne foram envolvidos com plástico filme em ambos os testes.

4.2.4.3. Análise de imagem das superfícies dos biofilmes

Os métodos de captura e análise de imagem foram aqueles designados no item 4.2.2.1. A partir desta análise foi possível observar a variação de cores e determinar uma escala característica dos biofilmes de acordo com a degradação das fatias de carne ao longo do tempo de estocagem. As medidas foram tomadas em cinco pontos aleatórios das superfícies dos biofilmes.

4.2.4.4. Medição do pH da carne suína

Diariamente, as amostras em triplicata submetidas à 25 °C tiveram os valores de pH das fatias de carne determinados, assim como as amostras armazenadas no refrigerador, em dias alternados, no intuito de correlacionar o estágio de decomposição do alimento com a coloração do respectivo biofilme. Cada fatia foi cuidadosamente retirada do biofilme com o auxílio de uma pinça e depositada em um béquer contendo 10,0 mL de água destilada sob agitação

constante durante 15 min em um agitador magnético. Em seguida, a leitura dos valores de pH foi realizada na solução cárnea via pHmetro digital.

4.2.5. Análise Estatística

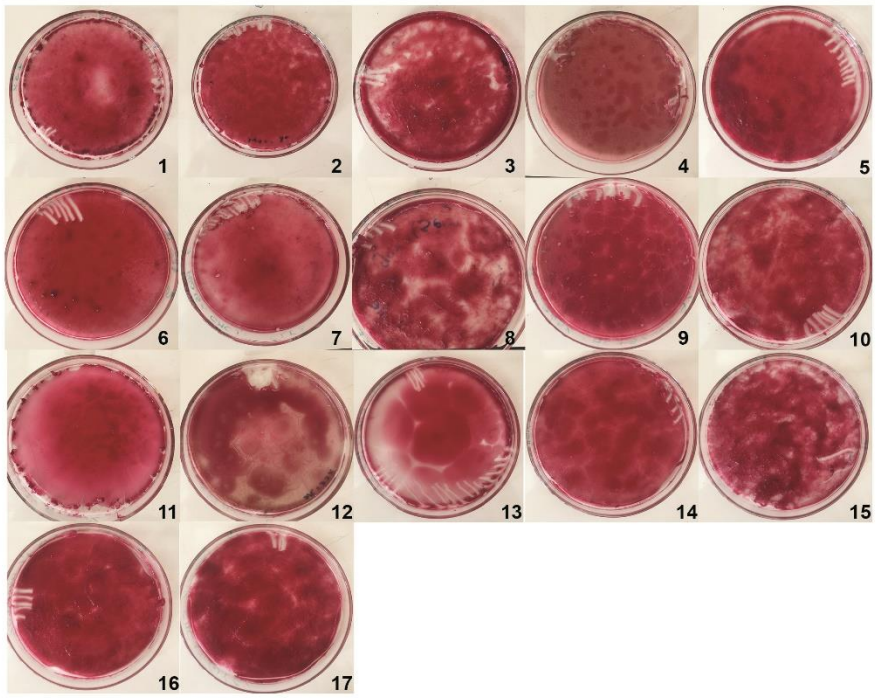
Os dados obtidos nas etapas de caracterização foram registrados como média ± desvio padrão e processados pelo Programa Statistics 7.0®. Análises de variância foram realizadas pelo método ANOVA (Análise de Variância) seguido pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Produção do biofilme para embalagem

No intuito de se estabelecer a composição ótima para a produção de um biofilme com características visuais de plasticidade e aparência inerentes ao material, um primeiro planejamento experimental foi desenvolvido. A Figura 8 exibe os dezessete ensaios deste planejamento. Embora todos os experimentos, após secagem, tenham apresentado uma coloração avermelhada, aquele que exibiu aspecto visual e textura mais próximos de um filme foi o de número 11, devido a uma maior homogeneidade e ausência de materiais particulados. Este ensaio, que representava um dos pontos axiais do delineamento, no entanto, utilizou a solução polimérica de extrato com uma concentração de 4,9% (m/v), um valor distante do estabelecido por Fernandes (2018) como o de melhor eficiência no processo de extração das antocianinas, que era de 45% (m/v). Deve-se ressaltar que esta pesquisadora não desenvolveu filmes colorimétricos, apenas o processo de extração de antocianinas via matriz polimérica.

Figura 8. Biofilmes com diferentes composições para a solução polimérica de antocianinas, goma carboximetilcelulósica e glicerol, produzidos a partir do 1º delineamento experimental.



Diante da necessidade de se determinar se a concentração mais baixa da solução polimérica interferia substancialmente na extração dos pigmentos, o teste CIELab foi aplicado para a determinação dos parâmetros a* de cada ensaio, a fim de se estabelecer a tendência de

exibição da coloração vermelha. Uma vez que a intensidade da cor apresentada está diretamente relacionada à eficiência de extração das antocianinas, foi possível estabelecer uma comparação entre os valores encontrados, levando-se em conta que a eficiência máxima de extração, segundo Fernandes (2018), ocorreu para uma concentração polimérica de 45% (m/v). A Tabela 6 apresenta os valores determinados para o parâmetro a* de cada ensaio, tratados pelo método ANOVA seguido do teste de Tukey ($p < 0,05$).

Tabela 6. Valores determinados para o parâmetro a* pela análise colorimétrica CIELab*.

Experimento	a*
1	47,43 ± 0,57^{z}
2	48,86 ± 1,37^{z}
3	48,57 ± 0,95^{z}
4	46,29 ± 0,68^{z}
5	48,57 ± 0,90^{z}
6	48,86 ± 0,77^{z}
7	46,28 ± 0,92^{z}
8	46,57 ± 0,65^{z}
9	48,43 ± 0,97^{z}
10	47,57 ± 0,84^{z}
11	48,57 ± 0,61^{z}
12	46,43 ± 0,65^{z}
13	46,71 ± 1,48^{z}
14	47,71 ± 0,75^{z}
15	47,29 ± 0,42^{z}
16	48,43 ± 0,61^{z}
17	47,00 ± 1,29^{z}

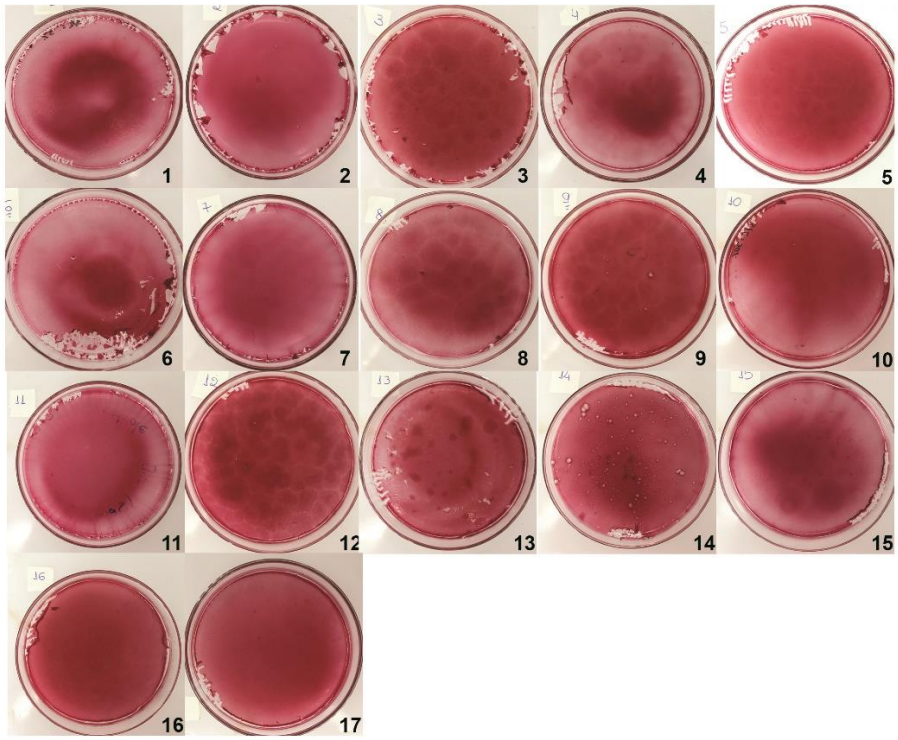
*Valores com o mesmo sobrescrito indicam que não houve diferença significativa, de acordo com o Teste de Tukey.

As análises estatísticas mostraram que as características inerentes a cada experimento não influenciam de forma significativa nos valores dos parâmetros “a” determinados e a homogeneidade revelada pelo teste de Tukey corrobora essa evidência. Assim, as soluções de extrato empregadas em diferentes concentrações poliméricas apresentaram tendências semelhantes a exibirem a coloração vermelha, o que sugere que a efetividade da extração de pigmentos não foi prejudicada em nenhum caso.

Considerando-se os resultados obtidos a partir do primeiro planejamento experimental, um segundo delineamento, apresentado na Tabela 5, foi realizado. Neste, as soluções de extrato foram preparadas com concentrações mais baixas de PEO 1.500, a fim de favorecer a formação dos filmes visto que, em um primeiro momento, o experimento que apresentou características visíveis e materiais mais próximas de um filme foi aquele com menor concentração de polímero. As concentrações de glicerol também foram alteradas para uma melhor adequação aos novos experimentos, uma vez que concentrações mais elevadas, como as utilizadas no primeiro delineamento, contribuíram para que as amostras apresentassem um aspecto úmido

mesmo após o processo de secagem. Tanto o PEO 1.500 quanto o glicerol comportam-se como agentes plastificantes para a formação do biofilme, porém as suas concentrações elevadas podem aprisionar moléculas de água em seu interior, tornando o filme úmido ou com formação de grumos (PRIETTO *et al*., 2017). A Figura 9 mostra os ensaios correspondentes a este segundo delineamento experimental.

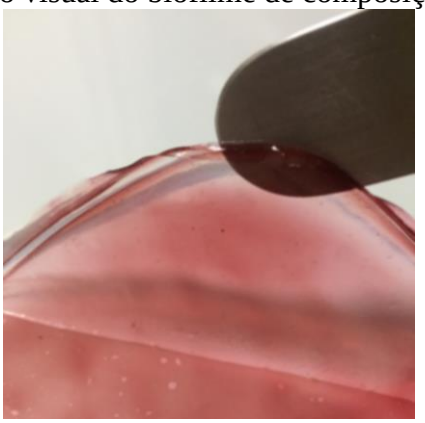
Figura 9. Biofilmes com diferentes composições para a solução polimérica de antocianinas, goma carboximetilcelulósica e glicerol, produzidos a partir do 2º delineamento experimental.



Entre os novos experimentos, aqueles que exibiram boa intensidade de coloração e aspecto visual inerentes a um filme foram os de número 2, 7 e 11. Porém, o experimento de número 7 apresentou maior homogeneidade na cor e não exibiu fraturas ou partículas insolúveis quando comparado aos demais, indicando potencial para utilização em embalagens inteligentes. Yoshida e colaboradores (2014), na confecção de seus filmes colorimétricos, destacaram as características de homogeneidade e resistência como fundamentais para que o material pudesse ser utilizado como embalagem de alimentos. Fundamentando-se nesse resultado, a composição definida como ótima para a produção dos biofilmes que atuarão como sensores colorimétricos, foi a solução polimérica com antocianinas de 5 % (m/v), com carboximetilcelulose a 1,5 % (m/v) e glicerol a 2 % (m/v). Essa composição foi responsável pela formação de um filme com matriz reticular estável devido às ligações estabelecidas entre polímeros e biopolímeros, com aprisionamento dos pigmentos de antocianinas e certa mobilidade gerada pelo glicerol.

Posteriormente, biofilmes de composição ótima foram produzidos para que se procedessem os testes de interação com a carne suína e caracterização. A Figura 10 ilustra o aspecto visual destes biofilmes.

Figura 10. Aspecto visual do biofilme de composição ótima.



5.2. Caracterização do biofilme

5.2.1. Espessura

A espessura dos filmes formados é um parâmetro que influencia suas propriedades (CUQ *et al.*, 1996). O controle da espessura dos filmes é importante para se avaliar a uniformidade desses materiais, a repetibilidade da medida de suas propriedades e a validade das comparações entre filmes. A partir da determinação desse parâmetro é possível obter informações sobre a resistência mecânica e as propriedades de barreira aos gases e ao vapor d'água do material, embora seu controle não seja simples, sobretudo nos processos de produção do tipo *casting* (SOBRAL, 1999). As espessuras dos biofilmes produzidos, compreendendo valores entre 118,80 ± 17,94 µm e 192,60 ± 8,52 µm, foram submetidas ao teste de Tukey ($p < 0,05$) e são apresentadas na Tabela 7.

Tabela 7. Valores de espessura para as amostras dos biofilmes produzidos.

Amostra	Espessura (µm)
1	153,60 ± 22,11^{z}
2	147,60 ± 22,76^{z}
3	131,80 ± 18,87^{z}
4	192,60 ± 8,52^{z}
5	148,60 ± 14,23^{z}
6	137,00 ± 10,56^{z}
7	155,80 ± 8,91^{z}
8	162,60 ± 12,06^{z}
9	124,80 ± 18,64^{z}
10	118,80 ± 17,94^{z}

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

Os resultados obtidos para a espessura dos biofilmes estão de acordo com a norma ASTM D882-12 para filmes finos (< 1,0 mm). Observou-se ainda, pela análise estatística, que não houve diferença significativa entre os valores determinados, o que revela a homogeneidade entre as amostras.

Prietsch (2016) estudou a espessura de filmes compostos apenas por quitosana e filmes com quitosana e antocianinas incorporadas. Para os filmes formados apenas pelo biopolímero, a espessura média foi de 107,0 µm, enquanto para os filmes pigmentados, a espessura média foi de 119,0 µm. Analisando-se os valores aqui encontrados, superiores aos determinados por Prietsch (2016), apreende-se que a natureza dos polímeros utilizados no filme, bem como o teor de plastificante empregado, a quantidade de solução filmogênica adicionada e a presença de antocianinas influenciam na sua espessura por conta das interações estabelecidas na matriz polimérica entre o polímero e o biopolímero utilizados (SEBTI *et al*., 2007).

5.2.2. Propriedades mecânicas

A determinação das propriedades mecânicas se faz importante para a caracterização de filmes empregados em embalagens de alimentos, uma vez que essas propriedades influenciam diretamente na manutenção da integridade e proteção física do produto (LAZARIDOU; BILIADERIS, 2002). Ensaios mecânicos foram realizados a fim de se determinar a resistência à tração, a deformação na ruptura e o módulo de elasticidade para o biofilme colorimétrico produzido. Os ensaios foram realizados em triplicata e os valores médios estabelecidos estão dispostos na Tabela 8.

Tabela 8. Propriedades mecânicas e gramatura das amostras do biofilme colorimétrico.

Propriedades	Valor médio
Resistência à tração (MPa)	20,28 ± 2,53
Deformação na ruptura (%)	28,66 ± 0,05
Módulo de elasticidade (MPa)	76,32 ± 16,51
Gramatura ($g \cdot m^{-2}$)	176,05 ± 2,30

Os valores obtidos para as propriedades mecânicas, principalmente para resistência à tração e módulo de elasticidade, apresentaram um desvio padrão elevado. Isso pode ser um indício de que o biofilme colorimétrico produzido para a tomada dos parâmetros relacionados às propriedades mecânicas não era totalmente uniforme, com distribuição heterogênea de pigmentos. Essa não-homogeneidade pode ter ocorrido pelo fato de o método de *casting*,

utilizado na preparação dos biofilmes, ter sido aplicado via manipulação e preparo totalmente manuais.

A norma ASTM D882-12 para filmes finos (< 1,0 mm) não descreve propriedades mecânicas ideais para filmes desenvolvidos a partir de biopolímeros, apenas para filmes compostos por polímeros sintéticos tradicionais. Dessa forma, os resultados obtidos não encontram identidade nesta norma (AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS, 2012). No entanto, as propriedades estabelecidas encontram respaldo em trabalhos semelhantes, cujos filmes desenvolvidos baseavam-se em biopolímeros, o que não inviabilizou a utilização destes em embalagens inteligentes para alimentos, como será visto posteriormente.

Para efeito de comparação com filmes poliméricos tradicionais considerados finos, de acordo com a norma ASTM D882-12, o celofane, por exemplo, apresenta resistência à tração aproximada de 114 MPa e deformação na ruptura de 20%. Já o filme de PVC (policloreto de vinila) exibe resistência à tração entre 15 e 21 MPa e sua deformação na ruptura pode chegar a 150% (AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS, 2012). O biofilme desenvolvido neste trabalho, por sua vez, apresenta resistência à tração de 20,28 ± 2,53 MPa, sendo menos resistente que o celofane e tão resistente quanto o filme de PVC, muito utilizado para embalar alimentos. Em relação à sua deformação na ruptura, de 28,66 ± 0,05%, não é capaz de se alongar tanto quanto o PVC, mas alonga-se de forma semelhante ao celofane.

Šešlija e colaboradores (2018) desenvolveram filmes para embalagens de alimentos, compostos por carboximetilcelulose, pectina e baixo teor de glicerol, cuja resistência média à tração foi de 336,0 MPa, deformação de ruptura de 10,8% e módulo de elasticidade de 310 MPa. Machado (2017), por sua vez, produziu um filme colorimétrico indicador de pH a partir de quitosana, acetato de polivinila, antocianinas extraídas de repolho roxo e sorbitol, cujos valores médios para resistência à tração, deformação na ruptura e módulo de elasticidade foram de 22,37 MPa, 33,39% e 99,38 MPa.

Observa-se que o biofilme desenvolvido no presente estudo exibe propriedades mecânicas semelhantes àquelas definidas por Machado (2017) e distintas das estabelecidas por Šešlija e colaboradores (2018), mesmo tratando-se de filmes com composições similares, envolvendo a utilização de biopolímeros, agentes plastificantes e pigmentos. Tais distinções, no entanto, não inviabilizam a utilização e aplicabilidade do filme em embalagens inteligentes. Altas concentrações de polímeros e baixas concentrações de plastificante, como as da solução

filmogênica produzida, promoverem maior resistência à tração e uma menor elasticidade do material. Quando a quantidade de polímeros é elevada, uma matriz com ligações intermoleculares mais efetivas é formada, tornando o filme mais forte. Por outro lado, a adição de plastificantes leva à uma diminuição das forças intermoleculares ao longo da cadeia polimérica e, consequentemente, a um aumento de sua flexibilidade (YANG; PAULSON, 2000). Além disso, a adição de antocianinas também pode enfraquecer as interações intermoleculares pois podem agir como plastificantes, o que aumenta a mobilidade entre as cadeias de polímeros e biopolímeros, afetando assim as propriedades mecânicas do filme (PRIETTO *et al*., 2017).

5.2.3. Gramatura

De acordo com Silva e colaboradores (2016), a gramatura de filmes está diretamente relacionada à resistência mecânica dos filmes biodegradáveis, sendo que quanto maior a gramatura, maior é a resistência mecânica. Os valores obtidos para a gramatura de 10 amostras do biofilme colorimétrico estão dispostos na Tabela 8 e o valor médio para o parâmetro foi de 176,05 ± 2,30 $g \cdot m^{-2}$. Assim como para a espessura, os valores de gramatura são influenciados pela composição do material, devido às ligações que formam a matriz polimérica (SEBTI *et al*., 2007).

Almeida (2010) desenvolveu um biofilme de blenda de fécula de batata, celulose bacteriana e plastificante para conservação de frutas e determinou valores de gramatura entre 78,0 e 95,0 $g \cdot m^{-2}$ para blendas com maior concentração de celulose. Os biofilmes foram considerados flexíveis, mas pouco resistentes na preservação do alimento. Bomfim (2019), por sua vez, desenvolveu biofilmes baseados em amido de arroz vermelho, alginato de sódio e glicerol, com maior concentração do amido derivado do arroz vermelho, e obteve valores de gramatura mais elevados, entre 220,0 e 260,0 $g \cdot m^{-2}$, gerando filmes mais rígidos. No presente trabalho, a gramatura média de 176,05 ± 2,30 $g \cdot m^{-2}$ indica que os biofilmes são mais resistentes que aqueles gerados por Almeida (2010) e mais flexíveis que os produzidos por Bomfim (2019), evidenciando que a interação entre biopolímero e polímero foi capaz de formar uma matriz reticular estável e resistente, sem perder a flexibilidade, tornando o material propenso para utilização em embalagens.

5.2.4. Permeabilidade ao vapor d'água

A permeabilidade ao vapor d`água (PVA) é uma característica chave para embalagens de alimentos, uma vez que atuam na manutenção da qualidade do produto e segurança de

consumo. Tipicamente, a PVA deve ser relativamente baixa para prevenção de alterações químicas, físicas e microbiológicas do alimento, provenientes da migração de umidade entre interior e exterior da embalagem (ALIZADEH-SANI *et al.*, 2020). Em embalagens para produtos cárneos, a PVA deve ser reduzida pois provoca perda de peso, ressecamento, alterações de cor e textura e facilita a proliferação de microrganismos (SARANTOPOULOS; TEIXEIRA, 2017). Nesse trabalho, os valores médios de PVA determinados para amostras em triplicata, durante cinco dias, variaram entre 2,22 ± 0,02 e 2,39 ± 0,02 $g \cdot mm \cdot dia^{-1} \cdot kPa^{-1} \cdot m^{-2}$ e estão descritos na Tabela 9.

Tabela 9. Valores médios da permeabilidade ao vapor d'água (PVA) para triplicatas dos biofilmes colorimétricos medidos a cada 24 h por cinco dias.

Dia	PVA ($g \cdot mm \cdot dia^{-1} \cdot kPa^{-1} \cdot m^{-2}$)
1	$2,39 \pm 0,02^{x}$
2	$2,33 \pm 0,02^{x,y}$
3	$2,30 \pm 0,01^{y}$
4	$2,26 \pm 0,01^{y,z}$
5	$2,22 \pm 0,02^{z}$

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

O teste de Tukey revelou a ocorrência de diferenças significativas entre os experimentos, com a diminuição dos valores obtidos para o parâmetro ao longo do período de estudo. Essa redução nos valores de permeabilidade ao vapor d'água pode indicar que houve uma redução na umidade do ambiente exterior aos frascos, o que acarretaria uma difusão mais baixa de vapores para o interior dos frascos e, consequentemente, menor ganho de massa do material dessecante. A permeabilidade média definida, de 2,30 ± 0,06 $g \cdot mm \cdot dia^{-1} \cdot kPa^{-1} \cdot m^{-2}$, quando comparada a materiais tradicionais utilizados em embalagens de alimentos, é mais baixa que a do celofane, por exemplo, cuja PVA é de, aproximadamente, 7,27 $g \cdot mm \cdot dia^{-1} \cdot kPa^{-1} \cdot m^{-2}$ (ARENAS, 2012). Além disso, o valor também é menor que o determinado para filmes de PVC de, aproximadamente, 3,0 $g \cdot mm \cdot dia^{-1} \cdot kPa^{-1} \cdot m^{-2}$. Dessa forma, os biofilmes desenvolvidos nesse estudo são menos permeáveis à difusão do vapor d'água, o que auxilia na conservação e qualidade da carne (RAWDKUEN *et al.*, 2020).

Alizadeh-Sani e colaboradores (2020) produziram filmes similares àqueles desenvolvidos neste trabalho, utilizando solução metilcelulósica (3% m/v), solução de nanofibras de quitosana (3% m/v), glicerol (3% v/v) e solução de antocianinas extraídas das pétalas da flor de açafrão (3% v/v). A PVA definida para esses filmes foi de $2,09 \times 10^{-3} \pm 0,05$ $g \cdot mm \cdot dia^{-1} \cdot kPa^{-1} \cdot m^{-2}$, ainda mais baixa que a desse estudo, de 2,30 ± 0,06 $g \cdot mm \cdot dia^{-1} \cdot kPa^{-1} \cdot m^{-2}$. Isso sugere que as interações entre as nanofibras de quitosana e metilcelulose foram capazes de formar uma matriz reticular tão forte, a ponto de reduzir os poros do filme e, consequentemente,

a difusão de vapor d'água pelo material. No entanto, a utilização da quitosana apresenta algumas desvantagens, como a dificuldade e o custo de sua manufatura e o fato de ser afetada adversamente em pH ácido, visto que se torna solúvel em soluções ácidas diluídas (SRINIVASA; THARANATHAN, 2007).

Rawdkuen e colaboradores (2020), por sua vez, desenvolveram filmes colorimétricos cuja composição foi de gelatina (3% m/v), glicerol (25% v/v) e um extrato baseado em um mix de antocianinas provenientes de repolho roxo, batata doce roxa, pitaia vermelha, mangostão e flor de hibisco (2% v/v). A PVA determinada para esse filme foi de 4,32 $g \cdot mm \cdot dia^{-1} \cdot kPa^{-1} \cdot m^{-2}$, um valor mais elevado que o de 2,30 ± 0,06 $g \cdot mm \cdot dia^{-1} \cdot kPa^{-1} \cdot m^{-2}$, definido nessa pesquisa. Isso ocorre devido à alta concentração do agente plastificante, que aumenta o volume molecular livre na matriz polimérica, facilitando a difusão de gases pelo filme colorimétrico. Assim, a utilização de uma concentração mais baixa de plastificante aliada à blenda polimérica para o desenvolvimento de biofilmes como os produzidos nesse estudo, dificulta a difusão de vapores d'água através do material, favorecendo a conservação do alimento e propiciando seu uso como embalagem inteligente.

5.2.5. Análises térmicas

A resistência à decomposição dos materiais que compõe as embalagens a elevadas temperaturas é uma característica importante pois influencia a sua estabilidade térmica diante de flutuações sofridas no meio ambiente, bem como em seu potencial para ser descartado por incineração (ALIZADEH-SANI *et al*., 2020). A estabilidade térmica dos biofilmes produzidos foi analisada por termogravimetria e o perfil estabelecido encontra-se na Figura 11. O primeiro estágio de perda de massa ocorreu na região entre 36 e 106 ^{0}C, caracterizando a evaporação da água presente no material.

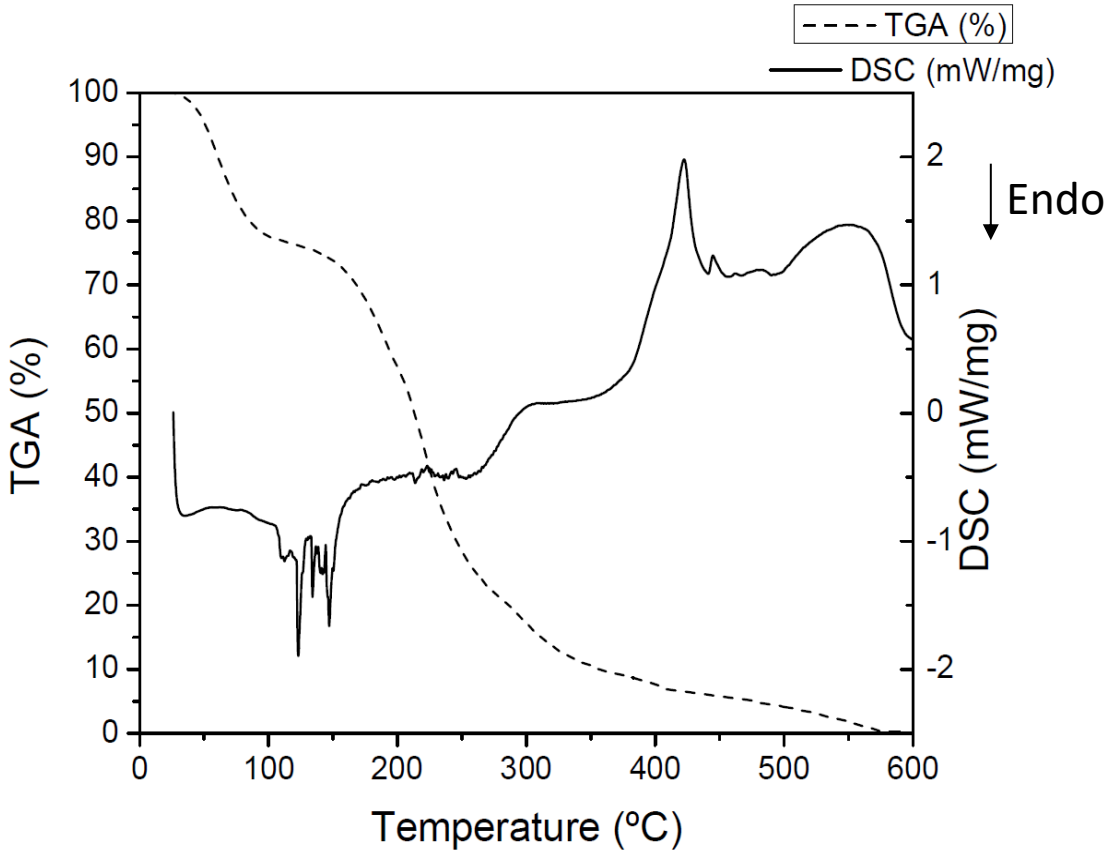
A pequena região de decaimento da massa até, aproximadamente, 200 ^{0}C representa a decomposição do glicerol. Alizadeh-Sani e colaboradores (2020), ao produzirem filmes contendo metilcelulose, nanofibra de quitosana, antocianinas de pétalas de flor de açafrão e glicerol, identificaram a decomposição do glicerol em uma temperatura próxima à 230 ^{0}C, o que se justifica por uma concentração mais elevada que a utilizada nesse estudo, de 30% do plastificante.

O decaimento entre 200 e 350 ^{0}C é singular à decomposição da blenda polimérica entre carboximetilcelulose e PEO 1.500. Ghorpade e colaboradores (2018) estudaram a formação de hidrogéis à base de carboximetilcelulose (2 %) e polietilenoglicol (0,6 %) e

identificaram a decomposição da matriz polimérica entre 200 e 325 ^{0}C, faixa de temperatura muito próxima à observada no perfil termogravimétrico desse trabalho.

Para a faixa de temperatura entre 350 e 550 ^{0}C, a perda de massa é correspondente à decomposição das antocianinas. O decaimento menos acentuado indicado pela curva na Figura 11 demonstra que os pigmentos necessitam de uma faixa de aquecimento maior para que se decomponham totalmente. A partir dos 550 ^{0}C, a perda de massa é relativa a compostos orgânicos residuais. No trabalho de Alizadeh-Sani e colaboradores (2020), já citado anteriormente, a decomposição das antocianinas ocorreu entre 460 e 480 ^{0}C. Isso indica que, no presente estudo, as antocianinas auxiliaram na manutenção da estabilidade térmica do material, uma vez que houve uma redução na taxa de perda de massa em função da temperatura ao final do experimento.

Figura 11. Análise termogravimétrica (TGA) e calorimetria exploratória diferencial (DSC) para o biofilme produzido com base em carboximetilcelulose, PEO 1.500, glicerol e antocianinas.



A análise de DSC mostrou diferentes picos endotérmicos e exotérmicos para o biofilme de carboximetilcelulose, PEO 1.500, glicerol e antocianinas. O evento endotérmico em 34 ºC refere-se à evaporação da água, conforme constatado no TGA. Os eventos entre 100

e 150 ºC estão acoplados, indicando a evaporação da água, a interação entre a CMC, a antocianina e o PEO 1.500 (SANTOS *et al*., 2013; GHORPADE *et al*., 2018; e TONGDEESOONTORN *et al.*, 2011). Em torno de 210 ºC observa-se também picos endotérmicos acoplados, o que sugere a decomposição do glicerol e a oxidação da antocianina (MOURTZINOS *et al.*, 2008). Já em torno de 300 ºC, observa-se uma transição cristalina da CMC (GHORPADE *et al*., 2018). Corroborando os resultados de TGA, acima de 400 ºC há picos exotérmicos acoplados referentes à decomposição dos componentes do filme (BISWAL; SINGH, 2004; GRASSIE; MENDOZA, 1984; ALIZADEH-SANI *et al*., 2020).

Corroborando os resultados das análises térmicas obtidos para o biofilme, análises de TGA e DSC foram realizadas para amostras puras das soluções de carboximetilcelulose, PEO 1.500 e, também, para o glicerol. As Figuras 12, 13 e 14 trazem os perfis térmicos estabelecidos para estas amostras com as análises de TGA definidas pelas linhas tracejadas e DSC definidas pelas linhas contínuas. Para a TGA das soluções de PEO 1.500, carboximetilcelulose e glicerol, foi observada uma primeira região de decaimento devido à evaporação da água. No perfil de TGA da solução de PEO 1.500, observou-se entre 100 e 150 ºC a perda de massa devido à decomposição do polímero e, acima de 150 ºC, a perda de massa devido à degradação de resíduos (MOURTZINOS *et al.*, 2008). Para a TGA da solução de CMC, acima de 100 ºC todo o decaimento é devido à decomposição do biopolímero e para a TGA do glicerol, entre 100 e 250 ºC, o decaimento é característico da degradação deste agente plastificante (SANTOS *et al*., 2013).

Em relação às análises de DSC, o perfil para a solução de PEO 1.500 revelou um evento endotérmico à uma temperatura de, aproximadamente, 60 ºC devido à fusão cristalina do polímero. Entre 100 e 125 ºC foram observados alguns eventos acoplados como consequência do rearranjo das moléculas de PEO 1.500. Em uma temperatura de, aproximadamente, 400 ºC observou-se um evento exotérmico característico da decomposição do polímero (TONGDEESOONTORN *et al.*, 2011; MOURTZINOS *et al.*, 2008).

O perfil de DSC para a solução de CMC, exibido na Figura 13, revelou um evento endotérmico entre 40 e 50 ºC devido à transição vítrea do material, em que moléculas que se encontravam em um estado amorfo passaram a adquirir mobilidade. Em uma região de 300 ºC foi possível observar a transição cristalina do biopolímero e, acima dos 500 ºC observaram-se picos exotérmicos característicos do processo de decomposição do composto (GHORPADE *et al*., 2018).

Figura 12. Análise termogravimétrica (TGA) e calorimetria exploratória diferencial (DSC) para as amostras puras de soluções de carboximetilcelulose, PEO 1.500 e glicerol.

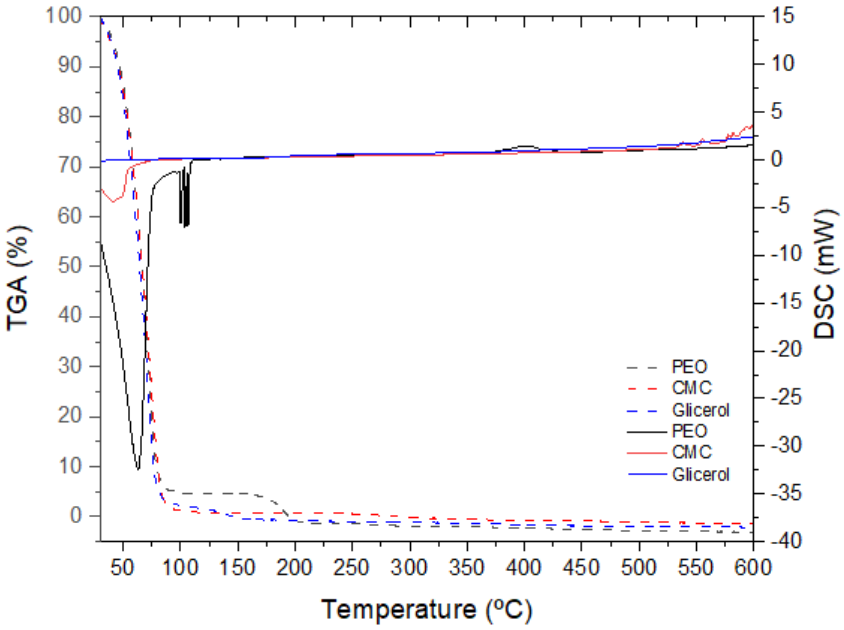
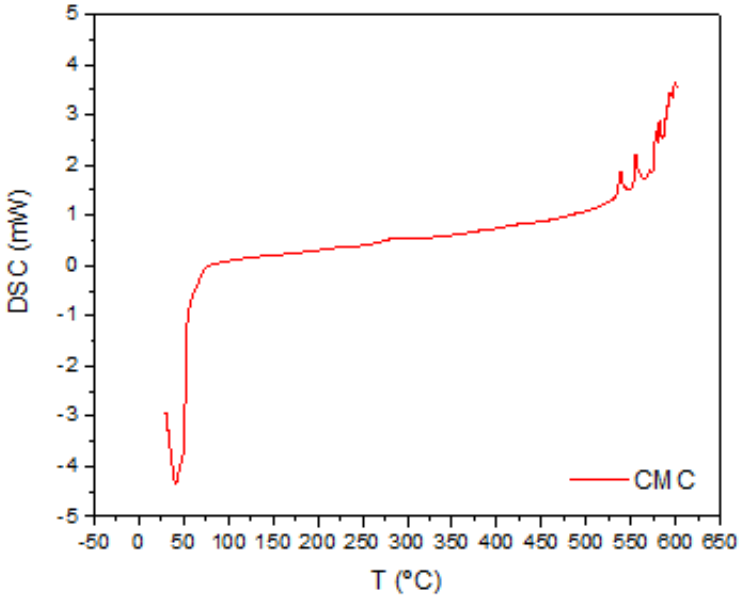
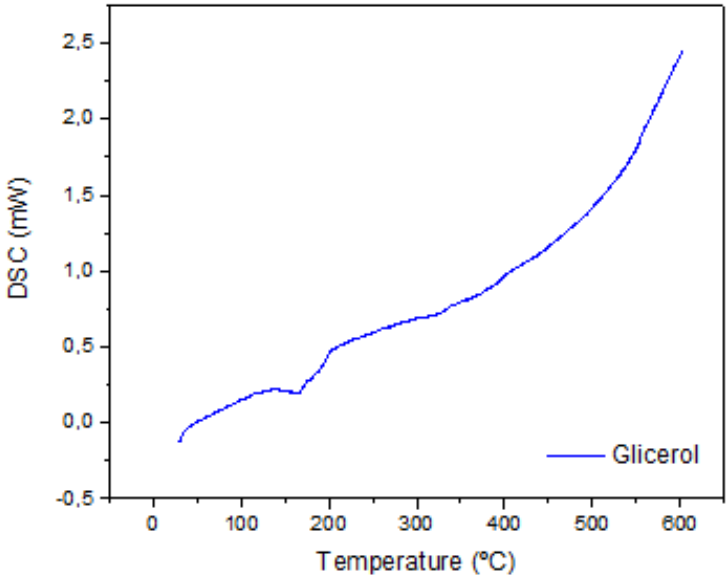


Figura 13. Análise de calorimetria exploratória diferencial (DSC) para a amostra pura de solução de carboximetilcelulose.



Para a DSC do glicerol foi observado um pico endotérmico entre 150 e 200 ºC devido à fusão de suas moléculas e, em uma região de 210 ºC, observou-se um evento exotérmico característico do início da decomposição do agente plastificante (ALIZADEH-SANI *et al.*, 2020).

Figura 14. Análise de calorimetria exploratória diferencial (DSC) para a amostra pura de glicerol.



5.3. Aplicação do biofilme à carne suína

5.3.1. Medição do pH da carne em temperatura ambiente

A Tabela 10 expressa os valores de pH da carne suína, determinados diariamente, durante os cinco dias de experimento à 25 ºC.

Tabela 10. Valores de pH da carne suína submetida à temperatura ambiente por cinco dias.

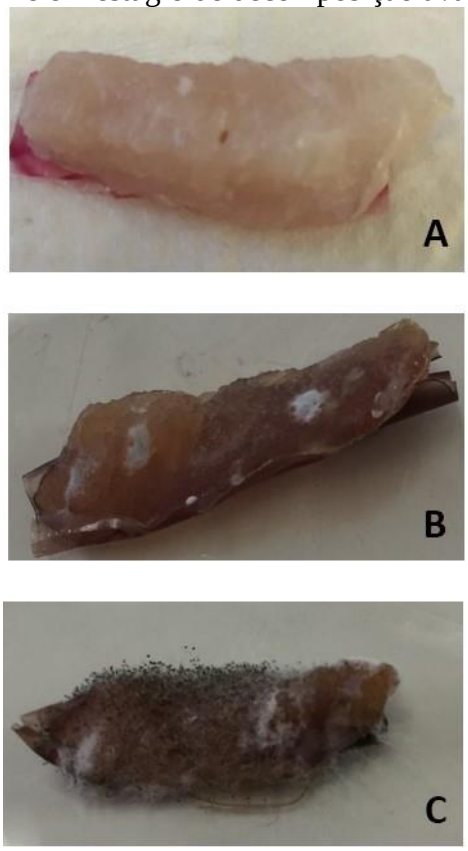
Dia	pH
0 (controle)	6,05 ± 0,01[w]
1	6,22 ± 0,02[w,x]
2	6,31 ± 0,02[x,y]
3	6,52 ± 0,01[y]
4	6,79 ± 0,09[z]
5	7,00 ± 0,08[z]

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

Todos os valores de pH determinados ao longo dos cinco dias de experimento apresentam diferenças significativas ($p < 0,05$) em relação ao pH da carne fresca, verificado no dia 0, o que caracteriza os diferentes estágios de validade da carne. Segundo Jay (2000), o pH da carne fresca apresenta-se entre 5,8 e 6,1. A carne suína fresca, evidenciada na Figura 15 A, apresentou pH de 6,05 e teve seu valor elevado, ao longo do tempo. Já no primeiro dia de averiguação, o valor de pH atingido de 6,22 indicava a presença de umidade, o que é um pré-requisito para o desenvolvimento de microrganismos (JAY, 2000). No terceiro dia de testes, o pH determinado era característico do início do processo de decomposição (acima de 6,5), como

exibido na Figura 15 B e, no último dia, a carne já se apresentava em um estágio de decomposição avançado com pH 7,00, como pode ser visto na Figura 15 C.

Figura 15. Fatias de carnes suínas submetidas ao teste à temperatura ambiente. **A**) carne fresca, conservada em refrigerador, no dia 0; **B)** carne no início do processo de degradação, no dia 3; **C)** carne em estágio de decomposição avançado, no dia 5.



Segundo Jay (2000), o pH de uma carne suína considerada fresca não excede o valor de 6,2, ponto em que a proteína está propensa à retenção de água, criando um ambiente favorável ao crescimento microbiano. O aumento nos valores de pH exibidos pela carne suína é consequência da formação de compostos característicos do processo de deterioração, como complexos de amônias e aminas, gerados pela decomposição de substâncias como proteínas e lipídios (CHOI *et al*., 2017). O monitoramento dos valores de pH atingidos pela carne ao longo dos cinco dias de experimento foi importante para que se pudesse relacionar a validade da carne suína com o comportamento dos biofilmes, uma vez que a variação no pH do meio deve promover uma alteração na coloração do sensor.

5.3.2. Teste de interação entre biofilme e carne à temperatura ambiente

Além do monitoramento do pH das fatias de carne expostas à temperatura ambiente de, aproximadamente, 25 ºC, imagens das superfícies dos biofilmes foram capturadas,

possibilitando o desenvolvimento das análises colorimétricas. Os valores estabelecidos para as coordenadas colorimétricas pelo método CIELab* estão dispostos na Tabela 11.

Tabela 11. Parâmetros colorimétricos (CIELab*) dos biofilmes expostos à temperatura ambiente.

Dia	Parâmetro L*	Parâmetro a*	Parâmetro b*
0 (controle)	33,27 ± 2,57^{z}	36,07 ± 0,35^{x}	9,73 ± 0,64^{z}
1	33,40 ± 2,43^{z}	11,40 ± 0,92^{y}	9,20 ± 0,70^{z}
2	31,53 ± 1,57^{z}	9,73 ± 0,79^{y}	8,47 ± 0,41^{z}
3	33,53 ± 1,28^{z}	8,67 ± 0,55^{y,z}	8,20 ± 0,35^{z}
4	33,87 ± 2,27^{z}	5,87 ± 0,24^{y,z}	9,40 ± 0,61^{z}
5	36,00 ± 0,46^{z}	4,67 ± 0,18^{z}	9,40 ± 0,72^{z}

*Valores com o mesmo sobrescrito em cada coluna indicam que não houve diferença significativa, de acordo com o Teste de Tukey.

O parâmetro L*, que representa a luminosidade, apresentou valores semelhantes para os filmes durante os cinco dias de experimento. Uma vez que estes biofilmes não revelam tendência a exibirem coloração preta ou transparente, os extremos característicos dessa coordenada, os valores estabelecidos estão em consonância com o esperado. Quando L* assume valores menores que 50, significa que o material apresenta uma coloração mais escura, o que de fato se aplica aos biofilmes desenvolvidos (LUCHESE *et al*., 2017).

O biofilme controle apresentou um valor de a* mais elevado, seguido de uma queda signficativa de, aproximadamente, 68% no dia 1 das análises e uma redução contínua no restante do período. Esse comportamento se relaciona diretamente com as alterações no pH do meio, devido ao contato dos biofilmes com a carne suína. A coloração avermelhada do biofilme controle, devido ao seu preparo em meio acidificado, sofreu alteração em sua tonalidade e tornou-se cada vez mais fraca à medida que o pH do meio se elevou, devido ao processo de degradação da carne. O parâmetro a* é muito importante na averiguação da atividade indicadora de pH dos filmes incorporados com antocianinas devido ao pigmento vermelho presente. A cor vermelha é atribuída à presença do cátion flavilium, de formação característica de antocianinas em meio ácido (TERCI; ROSSI, 2002).

Valores positivos para o parâmetro b* evidenciam a coloração amarela. Todos os biofilmes apresentaram valores de b* similares, embora o leve aumento observado, ao se atingirem os valores de a* mais baixos possíveis, nos dias 4 e 5, apresente signficado importante. Neste caso, quando as carnes alcançaram valores de pH próprios de um estágio de decomposição, os biofilmes começaram a evidenciar a coloração amarelada, característica da formação das chalconas, estruturas das antocianinas predominantes em meios alcalinos (YOSHIDA *et al*., 2014).

Após a determinação dos valores de a* e b*, outros parâmetros importantes no estudo da coloração dos biofilmes puderam ser estabelecidos, como evidenciado na Tabela 12. Dados referentes à diferença de coloração ΔE entre os filmes expostos a condições de pH distintas e o filme controle, são fundamentais para se avaliar a capacidade do olho humano em distinguir a variação de cores (SILVA; PETTER; SCHNEIDER, 2007). As coordenadas C* e h_{ab} relacionadas à intensidade e tonalidade da cor, respectivamente, excluem os interferentes relacionados à luminosidade L*, parâmetro que apresentou pouca variação entre os biofilmes estudados e não oferece informações relevantes quanto à variação do pH.

Como observado, em princípio, a intensidade da coloração dos biofilmes sofreu redução de, aproximadamente, 40%, o que corrobora a queda de valores do parâmetro a* como resultado da elevação do pH do meio. Após essa fase inicial, a intensidade da cor reduziu suavemente, em torno de 29% entre os dias 1 e 5 de experimento, acompanhando a tendência de uma elevação no pH. O emprego do teste de Tukey ($p < 0,05$) aplicado aos dados confirmou que há uma diferença significativa entre as cromas do biofilme controle e dos demais.

Tabela 12. Parâmetros h_{ab}, C* e ΔE dos biofilmes expostos à temperatura ambiente.

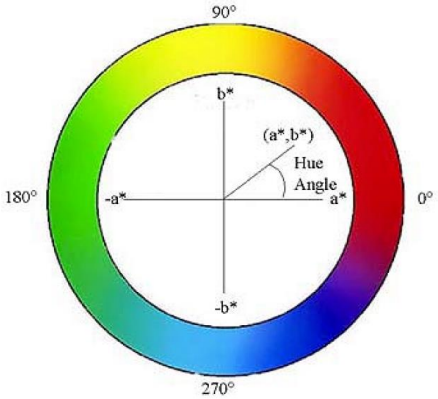
Dia	Parâmetro h_{ab}	Parâmetro C*	Parâmetro ΔE
0 (controle)	$15,11 \pm 1,08^{y}$	$37,37 \pm 0,20^{x}$	---
1	$39,02 \pm 3,80^{z}$	$14,71 \pm 0,60^{y}$	$24,79 \pm 1,19^{x}$
2	$41,19 \pm 3,55^{z}$	$12,95 \pm 0,40^{y,z}$	$27,01 \pm 1,13^{x}$
3	$43,49 \pm 2,03^{z}$	$11,95 \pm 0,50^{z}$	$27,72 \pm 0,12^{x,y}$
4	$58,43 \pm 2,45^{z}$	$11,10 \pm 0,47^{z}$	$30,38 \pm 0,46^{y,z}$
5	$61,13 \pm 2,08^{z}$	$10,50 \pm 0,69^{z}$	$31,86 \pm 0,16^{z}$

*Valores com o mesmo sobrescrito em cada coluna indicam que não houve diferença significativa, de acordo com o Teste de Tukey.

O parâmetro ângulo de matiz, designado h_{ab} por ser grafado em inglês como *hue angle*, tem início no eixo +a* e se move em sentido anti-horário, sendo medido em graus na escala CIELab* de 0º a 360º, onde 0º representa a cor vermelha e 90º a cor amarela. A escala CIELab* é exibida na Figura 16.

De acordo com a Tabela 12, os ângulos de matizes determinados para os biofilmes assumiram valores ascendentes ao longo do tempo, havendo uma diferença significativa entre o h_{ab} do biofilme controle e dos demais, como indicado pelo Teste de Tukey ($p < 0,05$). Este comportamento observado apresenta estreita relação com a variação de cores assumida pelos biofilmes diante das alterações no pH promovidas pela carne suína.

Figura 16. Orientação do ângulo de matiz na escala CIELab* (Figura adaptada de LUCHESE *et al*., 2017).



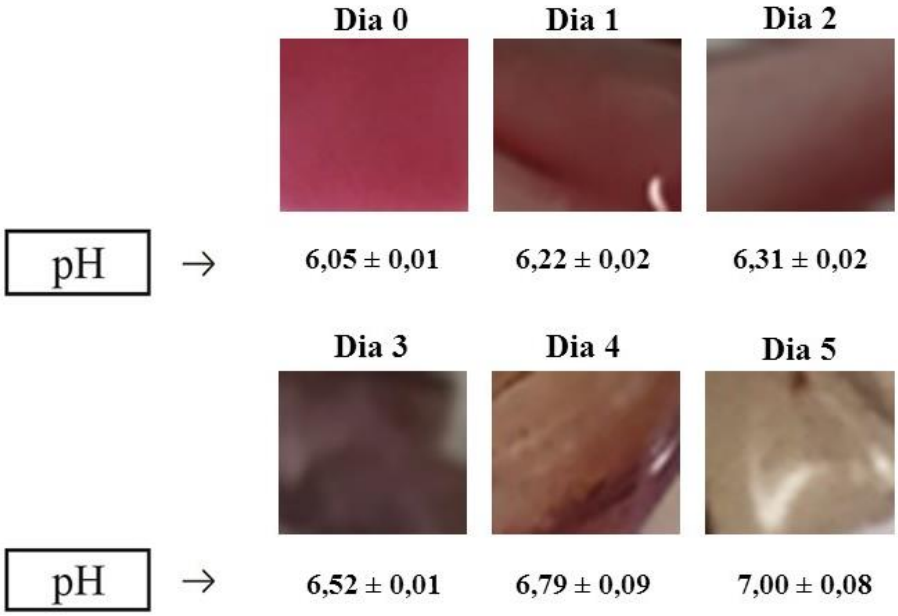
Pela determinação do parâmetro ΔE foi possível estabelecer a diferença de coloração entre os biofilmes que interagiram com a carne suína à temperatura ambiente e o biofilme controle, como ilustrado na Tabela 12. Silva, Petter e Schneider (2007) utilizaram o ΔE como um parâmetro de qualidade para avaliar o impacto de um processo na cor de um produto. Para isso, basearam-se em um padrão que avalia a alteração na coloração das superfícies de materiais pelo método CIELab*, em que diferenças de cores entre duas amostras justapostas são distinguíveis a olho nu para valores de ΔE maiores que 3,0 e facilmente distinguíveis para valores superiores a 6,0. Diante disso, os valores encontrados para ΔE, variando entre 24,79 ± 1,19 e 31,86 ± 0,16, caracterizam as alterações de cor sofridas pelo biofilme como de fácil percepção para o olho humano.

Luchese e colaboradores (2017) desenvolveram filmes indicadores de pH com pigmentos de antocianinas extraídos de mirtilos branqueados e mirtilos naturais. Os filmes foram submetidos a uma larga faixa de valores de pH pela submersão em soluções tampão. Os valores de ΔE encontrados variaram entre 3,8 e 11,4, sendo consideradas perceptíveis pelo olho humano as mudanças na coloração dos filmes. Assim, os valores determinados nesse estudo demonstram que as pessoas seriam capazes de distinguir com clareza as alterações de coloração nos biofilmes. Além disso,este trabalho tem como vantagem o fato de a fonte de antocianinas utilizada não provocar competição alimentar e o método de extração dos pigmentos via solução polimérica ser uma alternativa sustentável em comparação aos métodos tradicionais, como a extração por solvente, que exige um grande volume do mesmo e um período de tempo mais elevado (FERNANDES, 2018).

Com base no teste de interação entre os biofilmes colorimétricos produzidos e a carne suína, expostos à temperatura ambiente, foi possível correlacionar qualitativamente o estado de

conservação da carne suína com as alterações de coloração nos biofilmes. A Figura 17 ilustra o comportamento dos biofilmes em função do estado de conservação da carne. A modificação na cor dos filmes é justificada pelas alterações estruturais sofridas pelas antocianinas quando experimentam variações nos valores de pH do meio em que estão inseridas (MARÇO; POPPI; SCARMINIO, 2008).

Figura 17. Coloração dos biofilmes em função da variação de pH das carnes expostas à temperatura ambiente.



A coloração inicial do biofilme, ao ser colocado em contato com a carne fresca, era rosa, adquirindo tonalidade roxa no início da decomposição da carne (pH 6,52) e tornando-se levemente amarelada para um pH mais alcalino, em que a carne se encontrava em estágio de decomposição avançada (pH 7,00). Em trabalho semelhante, Yoshida e colaboradores (2014) utilizaram quitosana e antocianinas extraídas de uvas na produção de filmes inteligentes. Após serem imersos em soluções tampão com diferentes valores de pH, a cor dos filmes alternou do rosa (em pH ácido) para roxo-azulado (pH neutro) e, em seguida, para amarelo (pH básico). Observa-se assim, que a mudança de coloração dos biofilmes neste trabalho seguiu um padrão similar ao de Yoshida e colaboradores (2014).

Similar a este estudo, Choi e colaboradores (2017) produziram filmes colorimétricos com goma ágar, amido e pigmentos de antocianina extraídos de batata doce roxa com o objetivo de detectar o estado de conservação de carnes suínas. Os testes de interação entre a carne e o filme, também conduzidos à temperatura ambiente, revelaram que entre a carne fresca e a carne

em estágio de degradação avançada, o pH variou de 5,8 a 7,5 e o filme teve sua coloração modificada do rosa para o verde. Constata-se assim, que as alterações visuais de coloração dos biofilmes em função das mudanças nos valores de pH da carne revelam o potencial do filme colorimétrico para o monitoramento da vida útil de carnes suínas.

5.3.3. Medição do pH da carne à 4 ºC

Os valores de pH da carne suína estocada em refrigerador à 4 ºC foram acompanhados durante dias alternados ao longo dos vinte dias de experimento. Estes valores podem ser visualizados na Tabela 13. De acordo com o teste de Tukey, todos os valores de pH apresentaram diferenças significativas entre si, evidenciando também nesse caso, a evolução na degradação da carne. A mudança de coloração dos biofilmes ocorreu de maneira gradativa, uma vez que temperaturas mais baixas auxiliam na conservação do alimento. No entanto, a alteração de cores foi de fácil percepção para os valores de pH característicos do início da decomposição e de estágios mais avançados, como será visto no tópico 5.3.4.

Golasz, Silva e Silva (2013), em seu experimento com filmes compostos por amido de mandioca, glicerol e antocianinas extraídas de uvas, observaram uma elevação nos valores de pH de carnes suínas em contato com os filmes à 4 ºC, que se acentuou a partir do décimo dia. Nesse período, o valor de pH determinado foi de 6,49 e coincidiu com uma elevação significativa na contagem de microrganismos do alimento, o que evidencia o início do processo de decomposição da carne. O pH da carne suína associado à sua degradação se equipara ao oitavo dia de experimento no presente trabalho.

Tabela 13. Valores de pH da carne suína estocada à 4 ºC por vinte dias.

Dia	pH
0 (controle)	$6{,}01 \pm 0{,}02^{p}$
2	$6{,}18 \pm 0{,}01^{q}$
4	$6{,}29 \pm 0{,}01^{r}$
6	$6{,}42 \pm 0{,}02^{s}$
8	$6{,}58 \pm 0{,}01^{t}$
10	$6{,}69 \pm 0{,}01^{u}$
12	$6{,}82 \pm 0{,}02^{v}$
14	$6{,}93 \pm 0{,}02^{w}$
16	$7{,}12 \pm 0{,}01^{x}$
18	$7{,}87 \pm 0{,}02^{y}$
20	$8{,}11 \pm 0{,}02^{z}$

*Valores com o mesmo sobrescrito em cada coluna indicam que não houve diferença significativa, de acordo com o Teste de Tukey.

5.3.4. Teste de interação entre biofilme e carne armazenados no refrigerador

Os biofilmes em contato com a carne suína, armazenados em refrigerador à 4 ºC, comportaram-se de forma semelhante aos expostos à temperatura ambiente. Como pode ser observado na Tabela 14, os valores determinados para a luminosidade L* variaram entre 49,67 ± 1,16 e 58,60 ± 0,50, indicando biofilmes um pouco mais claros que aqueles do primeiro experimento. Mais uma vez, os valores para o parâmetro a* decresceram ao longo dos dias, à medida em que o meio se tornava mais alcalino devido à degradação da carne, evidenciando as mudanças estruturais sofridas pelas antocianinas e consequente atenuação da coloração avermelhada. O parâmetro b*, por sua vez, teve seu valor aumentado, chegando a atingir a marca de 27,00 ± 0,31, o que caracteriza uma coloração amarela intensa, característica de um meio altamente alcalino, como resultado de um processo de degradação prolongado pelo maior tempo de duração deste experimento.

Tabela 14. Parâmetros colorimétricos (CIELab*) dos biofilmes expostos à 4 ºC.

Dia	Parâmetro L*	Parâmetro a*	Parâmetro b*
0 (controle)	$49,67 \pm 1,16^{w}$	$36,20 \pm 0,42^{t}$	$12,73 \pm 0,18^{v}$
2	$55,33 \pm 0,96^{x,y}$	$18,20 \pm 0,20^{u}$	$12,73 \pm 0,41^{v}$
4	$51,20 \pm 0,69^{w,x}$	$17,47 \pm 0,52^{u}$	$12,67 \pm 0,29^{v}$
6	$58,60 \pm 0,50^{y}$	$14,73 \pm 0,29^{v}$	$15,47 \pm 0,24^{w}$
8	$53,93 \pm 0,55^{w,x,y}$	$10,93 \pm 0,47^{w}$	$16,60 \pm 0,35^{w}$
10	$58,07 \pm 0,77^{y}$	$10,73 \pm 0,13^{w}$	$18,33 \pm 0,24^{x}$
12	$53,53 \pm 0,48^{w,x,y}$	$8,80 \pm 0,31^{x}$	$18,53 \pm 0,07^{x}$
14	$55,73 \pm 1,20^{x,y}$	$7,67 \pm 0,24^{x,y}$	$18,93 \pm 0,44^{x}$
16	$54,67 \pm 0,97^{w,x,y}$	$6,00 \pm 0,40^{y,z}$	$19,40 \pm 0,31^{x}$
18	$55,47 \pm 0,13^{x,y}$	$5,87 \pm 0,18^{z}$	$22,73 \pm 0,24^{y}$
20	$57,80 \pm 1,86^{y}$	$4,93 \pm 0,27^{z}$	$27,00 \pm 0,31^{z}$

*Valores com o mesmo sobrescrito em cada coluna indicam que não houve diferença significativa, de acordo com o Teste de Tukey.

Dois dias após a estocagem, já foi observada uma mudança de coloração nos biofilmes, devido ao seu contato com a carne suína, que promoveu uma alteração no pH do sistema. Visualmente, a coloração não se alterou de forma significativa até o oitavo dia de experimento, em que os biofilmes passaram a exibir a cor roxa e a carne apresentava indícios da formação de uma microbiota em sua superfície, evidenciando o início do processo de decomposição da carne. No décimo-quarto dia de experimento, os biofilmes já estavam amarelados e mantiveram-se assim até o vigésimo dia, em que a coloração era amarela intensa e a carne apresentava aspecto seco, rígido e uma camada espessa de microbiota sobre sua superfície.

Zhai e colaboradores (2017) estudaram a variação de cores de um filme indicador de pH baseado em amido, álcool polivinílico e antocianinas extraídas de hibiscos para monitoramento do frescor de peixes. As alterações de coloração sofridas pelo filme demonstram

um perfil semelhante ao desse estudo, uma vez que o sistema filme/peixe foi submetido à temperatura de 4 ºC e o filme que era rosa no início do experimento, em contato com o peixe fresco, mudou para o roxo e deste para o amarelo, quando o alimento se encontrava em estágio de decomposição bastante avançado.

Alterações ocorridas na estrutura molecular das antocianinas em função de variações no pH estão diretamente relacionadas às mudanças em sua coloração. Sob condições de acidez, predomina o cátion flavílium, que contribui para a presença da cor vermelha em uma faixa de pH entre 1,0 e 3,0. Entre valores de pH 4,0 e 5,0, a forma predominante é a pseudo-base carbinol, oriunda da hidratação da molécula do pigmento, resultando em um indicador incolor. Elevando-se o pH para a faixa entre 6,0 e 7,0, a estrutura predominante é a quinoidal, de coloração roxa. Na forma aniônica, essa estrutura apresenta a cor azul para valores de pH entre 7,0 e 8,0. Para a faixa de pH entre 8,0 e 9,0, o anel central da estrutura se abre, formando a chalcona, de coloração amarela (PRIETTO *et al*., 2017). Esse comportamento na variação de cores, no entanto, pode sofrer alterações devido às características distintas das diversas fontes de antocianinas encontradas na natureza (LUCHESE *et al*., 2017).

Os parâmetros de intensidade C*, tonalidade h_{ab} e variação de cor ΔE estabelecidos para os biofilmes nos vinte dias de experimento estão dispostos na Tabela 15.

Tabela 15. Parâmetros h_{ab}, C* e ΔE dos biofilmes expostos à temperatura de 4º C.

Dia	Parâmetro h_{ab}	Parâmetro C*	Parâmetro ΔE
0 (controle)	$19,38 \pm 0,22^{t}$	$38,37 \pm 0,43^{v}$	---
2	$34,96 \pm 0,93^{u}$	$22,22 \pm 0,27^{w,x}$	$19,04 \pm 0,92^{s}$
4	$35,96 \pm 0,19^{u}$	$21,58 \pm 0,59^{x,y}$	$18,86 \pm 0,29^{s}$
6	$46,39 \pm 0,99^{v}$	$21,37 \pm 0,08^{x,y}$	$23,49 \pm 0,59^{t}$
8	$56,66 \pm 0,72^{w}$	$19,88 \pm 0,52^{y}$	$25,98 \pm 0,86^{u}$
10	$59,64 \pm 0,58^{w}$	$21,25 \pm 0,17^{x,y}$	$27,43 \pm 0,50^{u,v}$
12	$64,61 \pm 0,80^{x}$	$20,52 \pm 0,12^{x,y}$	$28,31 \pm 0,57^{v,w}$
14	$67,95 \pm 0,61^{x}$	$20,43 \pm 0,45^{x,y}$	$30,00 \pm 0,45^{w,x}$
16	$72,80 \pm 1,26^{y}$	$20,32 \pm 0,23^{y}$	$31,45 \pm 1,04^{x,y}$
18	$75,53 \pm 0,43^{y}$	$23,48 \pm 0,24^{w}$	$32,50 \pm 0,56^{y}$
20	$79,63 \pm 0,65^{z}$	$27,45 \pm 0,25^{z}$	$35,41 \pm 0,48^{z}$

*Valores com o mesmo sobrescrito em cada coluna indicam que não houve diferença significativa, de acordo com o Teste de Tukey.

Os valores de intensidade da cor exibiram um comportamento distinto daquele apresentado pelos biofilmes expostos à temperatura ambiente pois, embora também tenha ocorrido uma queda considerável do parâmetro no início do experimento, de aproximadamente 42% entre os dois primeiros dias, devido à redução expressiva dos valores de a*, entre os dias quatro e dezesseis não houve diferença significativa na intensidade da cor ($p < 0,05$), em decorrência da compensação entre a diminuição de a* e o aumento de b*, e esta voltou a se

elevar do dia dezoito em diante, como consequência da elevação considerável nos valores de b*.

Os valores de tonalidade mantiveram um padrão semelhante aos dos sistemas expostos à temperatura ambiente, exibindo uma elevação ao longo do tempo. Esse comportamento condiz com a tendência de mudança de coloração do vermelho para o amarelo, corroborada pela redução dos valores de a* e elevação dos valores de b*, que geraram ângulos de matiz variando de, aproximadamente, 20º para 80º.

O parâmetro ΔE, que indica a variação de cores entre os biofilmes no decorrer do experimento e o biofilme controle, também exibiu valores superiores a 6,0 para todos os sistemas, evidenciando a nítida diferenciação de cores a olho nu.

Golasz, Silva e Silva (2013) produziram filmes com antocianinas extraídas de uvas e amido de mandioca para indicação da deterioração de carnes suínas. Os filmes testados, juntamente com as fatias de carne, foram estocados em refrigerador à 4 ºC por 14 dias. As análises realizadas mostraram uma perda de intensidade da coloração progressiva ao longo dos dias até que, do décimo dia em diante, houve elevação do seu valor, semelhante ao ocorrido no presente estudo. Os ângulos de matiz também apresentaram valores ascendentes e as variações na coloração foram perceptíveis ao olho humano, embora não tenham apresentado valores tão relevantes quanto os deste trabalho. Os pesquisadores avaliaram ainda o crescimento microbiano nos filmes através da contagem psicotrópica de microrganismos, determinando a presença destes a partir do sétimo dia de armazenamento, período que coincide com a mudança para a coloração roxa e formação de microbiota nos filmes desenvolvidos nesta pesquisa. Uma comparação entre as performances dos filmes em ambos os estudos demonstra a aplicabilidade do filme incorporado de antocianinas como indicador de mudanças de pH.

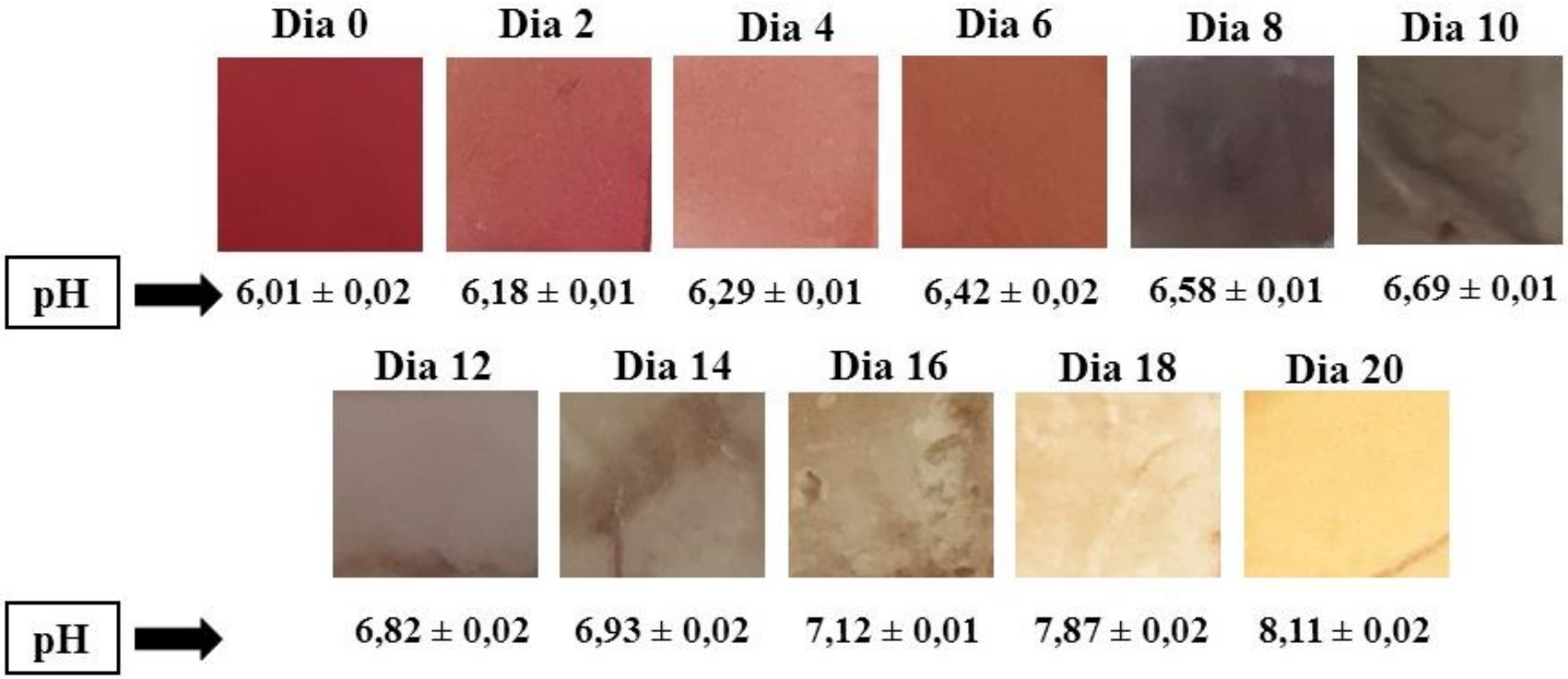
A Figura 18 mostra a variação na coloração dos biofilmes em contato com a carne suína ao longo dos vinte dias de experimento e a Tabela 16 estabelece uma comparação entre os resultados obtidos para os testes realizados à temperatura ambiente e à 4 ºC. Os valores de pH exibidos na tabela levam em consideração os pontos de maior relevância para detecção do estado de conservação da carne suína, a saber: carne fresca, início da decomposição e estado avançado de decomposição. Considerando-se a literatura e ambos os experimentos realizados neste trabalho, percebe-se que o alimento inicia o processo de degradação quando a cor apresentada pelo biofilme é roxo-azulada e atinge um estado de decomposição avançado

quando a cor é amarelada. Assim como comprovado pela determinação dos parâmetros de variação de cor, a alteração visual sofrida pelos biofilmes é facilmente perceptível.

Tabela 16. Comparação entre resultados obtidos para os experimentos à temperatura ambiente e à 4 ºC.

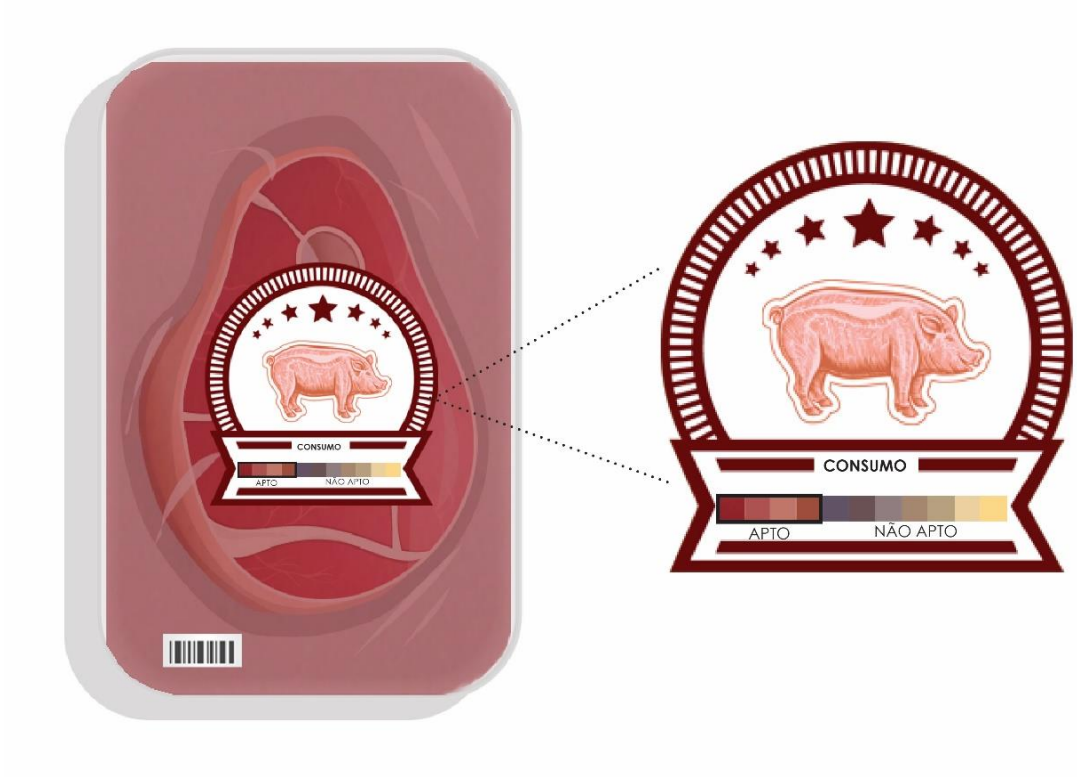
Características	Condição ambiente	Refrigerador
pH da carne	6,05	6,01
Conservação da carne	Fresca	Fresca
Coloração do biofilme		
Dia	0	0
pH da carne	6,52	6,58
Conservação da carne	Início da decomposição	Início da decomposição
Coloração do biofilme		
Dia	3	8
pH da carne	7,00	7,12
Conservação da carne	Decomposição avançada	Decomposição avançada
Coloração do biofilme		
Dia	5	16

Figura 18. Variação na coloração dos biofilmes em contato com as carnes à 4 ºC.



Diante do objetivo de se utilizarem os biofilmes enquanto embalagens inteligentes, uma paleta relacionando as alterações na coloração com a viabilidade de consumo pode ser adaptada à embalagem, tornando ainda mais claro para o consumidor o mecanismo para detecção do estado de conservação da carne suína. Um protótipo para a embalagem inteligente proposto nessa pesquisa é apresentado na Figura 19 e traz um esquema da paleta de cores, que indica ao consumidor se a proteína animal pode ou não ser consumida.

Figura 19. Protótipo de embalagem inteligente para detecção do frescor de carnes suínas desenvolvido a partir dos resultados obtidos nesse trabalho.



6. CONCLUSÃO

O biofilme produzido com base no biopolímero carboximetilcelulose e em antocianinas extraídas do subproduto de arroz negro via matriz polimérica foi capaz de detectar alterações no estado de conservação de carnes suínas. Tanto para o armazenamento à temperatura ambiente quanto em refrigerador, à 4 ºC, a mudança de coloração dos biofilmes como resultado de alterações no pH do meio foram perceptíveis a olho nu. O padrão de cores apresentado pelos biofilmes em temperatura ambiente exibiu estreita relação com aquele apresentado pelos biofilmes estocados no refrigerador. O biofilme demonstrou homogeneidade em relação à sua espessura, revelou propriedades mecânicas e gramatura que atestam sua resistência e flexibilidade e demonstrou ser pouco permeável a vapores d'água, o que auxilia na inibição de crescimento microbiano e manutenção das propriedades organolépticas do alimento. A análise termogravimétrica apresentou-se em consonância com a análise de calorimetria exploratória diferencial e o perfil destas análises demonstrou a estabilidade térmica do material. Dessa forma, os biofilmes colorimétricos desenvolvidos apresentam características físicas e sensíveis que exprimem seu potencial uso como sensor para indicação do estado de conservação de carnes suínas em embalagens inteligentes.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABREU, P. D. A.; CRUZ, J. M.; LOSADA, P. P. Active and inteligent packaging for the food industry. *Food Reviews International*, v. 28, p.146-187, 2012.

ALIZADEH-SANI, M.; TAVASSOLI, M.; MCCLEMENTS, D. J.; HAMISHEHKAR, H. Multifunctional halochromic packaging materials: Saffron petal anthocyanin loaded-chitosan nanofiber/methyl cellulose matrices. Food Hydrocolloids, v. 111, p.106-127, 2020.

ALMEIDA, D. M. Biofilme de blenda de fécula de batata e celulose bacteriana na conservação de fruta minimamente processada. *Tese de Doutorado* – Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2010.

AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS. ASTM D882-12: Standard Test Method for Tensile Properties of Thin Plastic Sheeting. West Conshohocken, 2012.

AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS. ASTM E96/E96M-16: Standard Test Methods for Water Vapor Transmission of Materials. West Conshohocken, 2016.

ARENAS, A. M. Z. Filme biodegradável à base de fécula de mandioca como potencial indicador de mudança de pH. *Dissertação de mestrado* – Escola Politécnica da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

ASSOCIATION OF ANALYTICAL CHEMISTS (AOAC). Official methods of analysis. 14. ed., 1995.

BERTAN, L. C. Desenvolvimento e caracterização de filmes simples e compostos a base de gelatina, ácidos graxos e breu branco. *Dissertação de mestrado* – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2003.

BERTAN, L. C. Desenvolvimento e caracterização de biofilmes ativos à base de polímeros de fontes renováveis e sua aplicação no acondicionamento de pães de forma. *Tese de doutorado* – Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2008.

BISWAL, D. R.; SINGH, R. P. Characterisation of carboxymethyl celulose and polyacrylamide graft copolymer. Carbohydrate Polymers, v. 57, p.379-387, 2004.

BODMEIER, R.; PAERATAKUL, O. Plasticizer uptake by aqueous colloidal polymer dispersions used for the coating of solid dosage forms. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 152, p.17-26, 1997.

BOMFIM, K. A. Elaboração e caracterização de filmes biodegradáveis a partir do amido do arroz vermelho. Monografia – Centro de Ciências e Tecnologia Agroalimentar, Universidade Federal de Campina Grande, Pombal, 2019.

BORDIGNON Jr., C. L.; FRANCESCATTO, V.; NIENOW, A. A.; CALVETE, E.; REGINATTO, F. H. Influência do pH da solução extrativa no teor de antocianinas em frutos de morango. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 29(1), p.183-188, 2009.

BRODY, A. L.; BUGUSU, B.; HAN, J. H.; SAND, C. K.; MCHUGH, T. H. Innovative food packaging solutions. *Journal of Food Science*, v. 73, p.107-116, 2008.

CACACE, J. E.; MAZZA, G. Mass transfer process during extraction of phenolic compounds from milled berries. *Journal of Food Engineering*, v. 59(4), p.379-389, 2003.

CARVALHO, R. A. Elaboração e caracterização de filmes à base de gelatina modificada enzimática e quimicamente. *Tese de Doutorado* – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2002.

CASTAÑEDA-OVANDO, A.; PACHECO-HERNÁNDEZ, M. L.; PÁEZ-HERNÁNDEZ, M. E.; RODRÍGUEZ, J. A.; GALÁN-VIDAL, C. A. Chemical studies of anthocyanins: A review. *Food Chemistry*, v. 113(4), p.859-871, 2009.

CAVALCANTI, R. N.; SANTOS, D. T.; MEIRELES, M. A. A. Non-thermal stabilization mechanisms of anthocyanins in model and food systems—An overview. *Food Research International*, v. 44(2), p.499-509, 2011.

CERRUTTI, B. M. Biomacromoléculas carboximetiladas: atuação como agentes de estabilização de suspensões aquosas de alumina. *Tese de Doutorado* – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2010.

CHAYAVANICH, K.; THIRAPHIBUNDET, P.; IMYIM, A. Biocompatible film sensors containing red radish extract for meat spoilage observation. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, v. 226, 2019.

CHEN, X. Q.; NAGAO, N.; ITANI, T.; IRIFUNE, K. Anti-oxidative analysis, and identification and quantification of anthocyanin pigments in different coloured rice. *Food Chemistry*, v. 135(4), p.2783-2788, 2012.

CHOI, I.; LEE, J. Y.; LACROIX, M.; HAN, J. Intelligent pH indicator film composed of agar/potato starch and anthocyanin extracts from purple sweet potato. *Food Chemistry*, v. 218, p.122-128, 2017.

CUQ, B.; AYMARD, C.; CUQ, J. L.; GUILBERT, S. Edible packaging film based on fish myofribillar proteins: formulation and functional properties. *Journal of Food Science*, v. 60(6), p.1369-1374, 1995.

CUQ, B.; GONTARD, n.; CUQ, J. L.; GUILBERT, S. Functional properties of myofibrilar protein-based biopackaging as effected by film thickness. *Journal of Food Science*, v. 61(3), p.580-584, 1996.

DAI, J.; MUMPER, R. J. Plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. *Molecules*, v. 15(10), p.7313-7322, 2010.

DAI, S.; CHIU TAM, K. *Journal of Colloid and Interface Science*, v. 292(1), p.79-85, 2005.

DAINELLI, D.; GONTARD, N.; SPYROPOULOS, D.; BEUKEN, E. Z.; TOBBACK, P. Active and intelligent food packaging: legal aspects and safety concerns. *Trends in Food Science and Technology*, v. 19, p.103-112, 2008.

DAINTY, R. H. Chemical/biochemical detection of spoilage. *International Journal of Food Microbiology*, v. 33, p.19-33, 1996.

DE JONG A. R.; BOUMANS, H.; SLAGHEK, T.; VAN VEEN, J.; RIJK, R.; VAN ZANDVOORT, M. Advice and intelligent packaging for food: Is this the future? *Food Add. Contam.*, v. 22, p.975–979, 2005.

DEBEAUFORT, F.; QUEZADA-GALLO, J. A.; VOILLEY, A. Edible films and coatings: tomorrow's packaging: a review. *Critical Review in Food Science and Technology*, v. 30(2), p.183-190, 1995.

DELGADO-VARGAS, F.; JIMENEZ, A. R.; PAREDES-LOPEZ, O. Natural pigments: carotenoids, anthocyanins, and betalains-characteristics, biosynthesis, processing, and stability. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, v. 40(3), p.173-289, 2000.

DOBRUCKA, R.; CIERPISZEWSKI, R.; KORZENIOWSKI, A. Intelligent food packaging - research and development. *Log Forum*, v. 11(1), p.7-14, 2015.

EILERT, S. J. New packaging technologies for the 21st century. *Meat Science*, v. 71, p.122-127, 2005.

FAIRLEY, P.; MONAHAN, F. J.; GERMAN, J. B; KROCHTA, J. M. Mechanical properties and water vapor permeability of edible films from whey protein isolate and sodium dodecyl sulfate. *Journal Agricultural and Food Chemistry*, v. 44(2), p.438-443, 1996.

FANG, Z.; ZHAO, Y.; WARNER, R. D.; JOHNSON, S. K. Active and Intelligent Packaging in Meat Industry. *Trends in Food Science and Technology*, v. 61, p.60-71, 2017.

FEDENKO, V. S.; SHEMET, S. A.; LANDI, M. UV–vis spectroscopy and colorimetric models for detecting anthocyanin-metal complexes in plants: An overview of in vitro and in vivo techniques. *Journal of Plant Physiology*, v. 212, p.13-28, 2017.

FERNANDES, T. S. Otimização da Extração de Antocianinas do Resíduo de Arroz Negro Utilizando Soluções Aquosas de Polímero. *Dissertação de Mestrado* – Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2018.

FOSSEN, T.; CABRITA, L.; ANDERSEN, O. M. Colour and stability of pure anthocyanins influenced by pH including the alkaline region. *Food Chemistry*, v. 63(4), p.435-440, 1998.

FRITZ, H. G.; SEICENDSTUCKER, T.; BOLZ. U.; JUZA, M.; SCHROETER, T.; ENDRES, H. J. Study on production of thermoplastics and fibers based mainly on biological materials. *Science Research Development*, European Commision, EUR 16102, 1994.

GALLO, J. A. Q.; DEBEAUFORT, F.; CALLEGARIN, F.; VOILLEY, A. Lipid hydrophobic, physical state and distribution effects on the properties of emulsion-based films. *Journal of Membrane Science*, v.180, p.37-46, 2000.

GARCÍA-BARRIENTOS, M. L.; CHABELA, P.; MONTEJANO, J. G.; LEGARRETA, G. Changes in pork and shark (*Rhizopriondon terraenovae*) protein emulsions due to exogenous and endogenous proteolytic activity. *Food Research International*, v. 39(9), p.1012-1022, 2006.

GHORPADE, V. S.; YADAV, A. V.; DIAS, R. J.; MALI, K. K.; PARGAONKAR, S. S.; SHINDE, P. J.; DHANE, N. S. Citric acid crosslinked carboxymethylcellulose-poly(ethyleneglycol) hydrogel films for delivery of poorly soluble drugs. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 118, p.783-791, 2018.

GIANNAKOUROU, M.; KOUTSOUMANIS, K.; NYCHAS, G.; TAOUKIS, P. Field evaluation of the application of time temperature integrators for monitoring fish quality in the chill chain. *International Journal of Food Microbiology*, v. 102, p.323–336, 2005.

GIUSTI, M. M.; RODRIGUEZ-SAONA, L. E.; WROLSTAD, R. E. Molar absorptivity and color characteristics of acylated and non-acylated pelargonidin-based anthocyanins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 47(11), p.4631-7, 1999.

GOLASZ, L. B.; SILVA, J.; SILVA, S. B. Film with anthocyanins as an indicator of chilled pork deterioration. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 33(1), p.155-162, 2013.

GRAM, L.; HUSS, H. H. Fresh and processed fish and shellfish. *The Microbiological Safety and Quality of Foods*, Aspen Publishers Inc., Gaithersburg, MD, ISBN-10–0834213230, p.472-506, 2000.

GRASSIE, N.; MENDOZA, G. A. P. Thermal degradation of polyether-urethanes: Part 1 – Thermal degradation of poly(ethylene glycols) used in the preparation of polyurethanes. *Polymer Degradation and Stability*, v. 9, p.155-165, 1984.

GRUNERT, K. G.; VALLI, C. Designer-made meat and dairy products: consumer-led product development. *Livestock Production Science*, v. 72, p.83-98, 2001.

GUILBERT, S.; CUQ, B.; GONTARD, N. Recent innovations in edible film and/or biodegradable packaging materials. *Food Additives and Contaminants*, v. 14(6), p.741-751, 1997.

HONARVAR, Z.; FARHOODI, M.; KHANI, M. R.; SHOJAEE-ALIABADI, S. Extended shelf life of chicken meat using carboxymethyl cellulose coated polypropylene films containing *Zataria multiflora* essential oil. *International Journal of Nutrition and Food Engineering*, v. 11(8), p.609-613, 2017.

HORAN, T. J. Method for determining deleterious bacterial growth in packaged food utilizing hydrophilic polymers. *US Patent 6149952*, 2000.

HUTTON, T. Food Packaging: An introduction. *Key topics in food science and technology*, v. 7, p.108, 2003.

IACOBUCCI, G. A.; SWEENY, J. G. The chemistry of anthocyanins, anthocyanidins and related flavylium salts. *Tetrahedron*, v. 39(19), p.3005-3038, 1983.

JAY, J. M. Modern Food Microbiology, 6. ed., Aspen Publishers, Gaithersburg, 2000.

JHA, P.; DAS, A.; DEKA, S. Optimization of ultrasound and microwave assisted extractions of polyphenols from black rice (Oryza sativa cv. Poireton) husk. *Journal of Food Science and Technology*, v. 54, p.1-12, 2017.

KÄISTNER, U.; HOFFMANN, H.; DÖNGES, R.; HILBIG, J. Structure and solution properties of sodium carboxymethyl cellulose. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Asp*ects, v. 123, p.307-328, 1997.

KANG, J.; KIM, S.; KWON, Y. Antibody-based biosensors for environmental monitoring. *Toxicology Environment Health Science*, v. 1, p.145-150, 2009.

KAPASAKALIDIS, P. G.; RASTALL, R. A.; GORDON, M. H. Extraction of polyphenols from processed black currant (Ribes nigrum L.) residues. *Journal of agricultural and Food Chemistry*, v. 54(11), p.416-421, 2006.

KERRY, J. P.; O'GRADY, M. N.; HOGAN, S. A. Past, current and potential utilization of active and intelligent packaging systems for meat and muscle-based products: a review. *Meat Science*, v. 74, p.113-130, 2006.

KESTER, J. J.; FENNEMA. O. R. Edible films and coatings: a review. *Food Technology*, v. 40(12), p.47-59, 1986.

KIM, K.; KIM, E.; LEE, S. J. New enzymatic time–temperature integrator (TTI) that uses laccase. *Journal of Food Engineering*, v. 113, p.118-123, 2012.

KONGLIANG, X.; AINQIN, G.; CHUNLEI, L.; MIN, L. Highly water-soluble and ph-sensitive colorimetric sensors based on a d-pi-a heterocyclic azo chromosphere. *Sensor and Actuators B: Chemical*, v. 204, p.167-174, 2014.

KOUR, H.; NASEER, A. T.; ANISA, M.; RAJKUMARI, K.; HARMEET, C.; GUPTA, P.; ANJU, B.; JAGMOHAN, S. Advances in food packaging – a review. *Stewart Postharvest Review*, v. 4(7), p.1-7, 2013.

KOUTSOUMANIS, K. P.; TAOUKIS, P. Meat safety, refrigerated storage and transport: modeling and management. Improving the Safety of Fresh Meat, J. Sofos Editor, Colorado, 2005.

KRAŚNIEWSKA, K.; GNIEWOSZ, M. Substances with antibacterial activity in edible films – a review. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, v. 62, p.199-206, 2012.

KUMAR, S.; BUDIN, E. M. Prevention and management of product recalls in the processed food industry: a case study based on an exporter's perspective. *Technovation*, v. 26, p.739-750, 2006.

LAZARIDOU, A.; BILIADERIS, C. G. Thermophysical properties of chitosan, chitosan–starch and chitosan–pullulan films near the glass transition. *Carbohydrate polymers*, v. 48(2), p.179-190, 2002.

LEE, L. S.; FIEDLER, K. D.; SMITH, J. S. Radio frequency identification (RFID) implementation in the service sector: a customer-facing diffusion model. *International Journal of Production Economics*, v. 112, p.587-600, 2008.

LIN, Y. C.; CHOU, C. C. Effect of heat treatment on total phenolic and anthocyanin contents as well as antioxidant activity of the extract from Aspergillus awamori-fermented black soybeans, a healthy food ingredient. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 60(7), p.627-636, 2009.

LIU, B.; XU, H.; ZHAO, H.; LIU, W.; ZHAO, L.; LI, Y. Preparation and characterization of intelligent starch/PVA films for simultaneous colorimetric indication and antimicrobial activity for food packaging applications. *Carbohydrate Polymers*, v. 157, p.842-849, 2017.

LIU, W.; WANG, F. Polyethylene glycol (PEG) promoted hydrodehalogenation of aryl halides. *Tetrahedron Letters*, v. 58(17), p.1673-1676, 2017.

LUCHESE, C. L.; SPEROTTO, N.; SPADA, J. C.; TESSARO, I. C. Effect of blueberry agro-industrial waste addition to cornstarch-based films for the production of a pH-indicator film. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 104, p.11-18, 2017.

LUO, X.; LIM, L. Cinnamil- and Quinoxaline-Derivative Indicator Dyes for Detecting Volatile Amines in Fish Spoilage. *Molecules*, v. 24, 2019.

LOYPIMAI, P.; MOONGNGARM, A.; CHOTTANOM, P. Thermal and pH degradation kinetics of anthocyanins in natural food colorant prepared from black rice bran. *Journal of Food Science and Technology*, v. 53(1), p.461-70, 2016.

MACHADO, M. H. Desenvolvimento e caracterização de filme indicador de pH com extrato de repolho roxo para monitoramento da qualidade de alimentos. *Dissertação de mestrado* – Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2017.

MAHALIK, N. P. Processing and packaging automation systems: A review. *Sensing and Instrumentation for Food Quality and Safety*, v. 3, p.12-25, 2009.

MARÇO, P. H.; POPPI, R. J.; SCARMINIO, I. S. Procedimentos analíticos para identificação de antocianinas presentes em extratos naturais. *Química Nova*, v. 31(5), p.1218-1223, 2008.

MAZZA, G.; BROUILLARD, R. Recent developments in the stabilization of anthocyanins in food products. *Food Chemistry*, v. 25(3), p.207-225, 1987.

MC MEEKIN, T. A.; BARANYI, J.; BOWMAN, J.; DALGAARD, P.; KIRK, M.; ROSS, T.; SCHMID, S.; ZWIETERING, M. H. Information systems in food safety management. *International Journal of Food Microbiology*, v. 112, p.181-194, 2006.

MC MILLIN, K. W. Where is MAP Going? A review and future potential of modified atmosphere packaging for meat. *Meat Science*, v. 80, p.43-65, 2008.

MENSITIERI, G.; MAIO, E. D.; BUONOCORE, G. G.; NEDI, I.; OLIVIERO, M.; SANSONE, L.; IANNACE, S. Processing and shelf life issues of selected food packaging materials and structures from renewable resources. *Trends in Food Science and Technology*, v. 22, p.72-80, 2011.

MOURTZINOS, I.; MAKRIS, D. P.; YANNAKOPOULOU, K.; KALOGEROPOULOS, N.; MICHALI, I.; KARATHANOS, V. T. Thermal Stability of Anthocyanin Extract of *Hibiscus sabdariffa* L. in the Presence of β-Cyclodextrin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 56, p.10303-10310, 2008.

MOUSAVI, A.; SARHAVI, M.; LENK, A.; FAWCETT, S. Tracking and traceability in the meat processing industry: a solution. *British Food Journal*, v. 104, p.7-19, 2002.

NYCHAS, G. J. E.; TASSOU, C. C. Spoilage process and proteolysis in chicken as noted by HPLC method. *Journal of Science Food and Agriculture*, v. 74, p.199-208, 1997.

NYCHAS, G. J. E.; MARSHALL, D.; SOFOS, J. Meat poultry and seafood. Food Microbiology Fundamentals and Frontiers, Capítulo 6, ASM Press, Washington, 2007.

NYCHAS, G. J. E.; SKANDAMIS, P. N.; TASSOU, C. C.; KOUTSOUMANIS, K. P. Meat spoilage during distribution. *Meat Science*, v. 78, p.77-89, 2008.

NITAIGOUR, P. M. Advances in packaging methods, processes and systems. *Challenges*, v. 5, p.374-389, 2014.

NURA, A. Advances in food packaging technology – A review. *Journal of Postharvest Technology*, v. 06(4), p.55-64, 2018.

OANCEA, S.; STOIA, M.; COMAN, D. Effects of Extraction Conditions on Bioactive Anthocyanin Content of Vaccinium Corymbosum in the Perspective of Food Applications. *Procedia Engineering*, v. 42, p.489-495, 2012.

O'RIORDAN T. C.; VORABERGER, H.; KERRY, J. P.; PAPKOVSKY, D. B. Study of migration of active components of phosphorescent oxygen sensors for food packaging applications. *Analytica Chimica Acta*, v. 530, p.135-141, 2005.

PARK, Y. W.; KIM, S. M.; LEE, J. Y.; JANG, W. Application of biosensors in smart packaging. *Molecular and Cellular Toxicology*, v. 11, p. 277-285, 2015.

PAWAR, P. A.; AACHAL, H. P. Biodegradable polymers in food packaging. *American Journal of Engineering Research*, v. 2(5), p.151-164, 2013.

PEDRO, A. C.; GRANATO, D.; ROSSO, N. D. Extraction of anthocyanins and polyphenols from black rice (*Oryza sativa*) by modeling and assessing their reversibility and stability. *Food Chemistry*, v. 191, p.12-20, 2016.

PILIZOTA, V.; SUBARIC, D.; LOVRIC, T. Rheological properties of CMC dispersions at low temperatures. *Food Technology and Biotechnology*, v. 34(2-3), p.87-90, 1996.

PRASAD, P.; KOCHHAR, A. Active Packaging in food industry – a review. *Journal of Environmental Science, Toxicology and Food Technology*, v. 8(5), p.1-7, 2014.

PRIETSCH, L. P. Desenvolvimento de indicador de pH utilizando antocianinas como corante para aplicação em embalagem inteligente. *Tese de doutorado* – Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2016.

PRIETTO, L.; MIRAPALHETE, T. C.; PINTO, V. Z.; HOFFMANN, J. F.; VANIER, N. L.; LIM, L.; DIAS, A. R. G.; ZAVAREZE, E. R. pH-sensitive films containing anthocyanins extracted from black bean seed coat and red cabbage. *LWT – Food Science and Technology*, v. 80, p.492-500, 2017.

RANDELL, K.; AHVENAINEN, R.; LATVA-KALA, K.; HURME, E.; MATTILA-SANDHOLM, T.; HYVONEN, L. Modified atmosphere-packed marinated chicken breast and rainbow trout quality as affected by package leakage. *Journal of Food Science*, v. 60, p.667-672, 1995.

RAWDKUEN, S.; FASEHAB, A.; BENJAKULC, S.; KAEWPRACHUD, P. Application of anthocyanin as a color indicator in gelatin films. *Food Bioscience*, v. 36, p.100-109, 2020.

RISCH, S. J. Food packaging history and innovations. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 57, p.8089-8092, 2009.

RODRIGUES, E. T.; HAN, J. H. Intelligent packaging. Encyclopedia of Agricultural, Food and Biological Engineering, ISBN 978-1439811115, New York, p.528-535, 2003.

SANGATASH, M. M.; NIAZMAND, R.; JAMAB, M. S.; MODARESSI, A. S. Development of antioxidant active films containing sodiumascorbate (SA) and ethylene vinyl alcohol (EVOH) to extendthe shelf life of peanut. *Journal of Food Science and Technology*, v. 53(4), p.1766-1783, 2016.

SANTOS. D. T.; ALBARELLI, J. Q.; BEPPU, M. M.; MEIRELES, M. A. A. Stabilization of anthocyanin extract from jabuticaba skins by encapsulation using supercritical CO_2 as solvent. *Food Research International*, v. 50, p.617-624, 2013.

SARANTOPOULOS, C. I. G. L.; TEIXEIRA, F. G. Propriedades de barreira. Embalagens plásticas flexíveis: principais polímeros e avaliação de propriedades, ISBN 978-85-7029-140-0, Campinas, v. 2, p.313-355, 2017.

SCHANDA, J. Colorimetry: understanding the CIE system. Hoboken: John Wiley e Sons, New Jersey, 2007.

SCHIOZER, A. L.; BARATA, L. E. S. Estabilidade de Corantes e Pigmentos de Origem Vegetal. *Revista Fitos*, v. 3(2), p.6-24, 2013.

SEBTI, I., CHOLLET, E., DEGRAEVE, P., NOEL, C., PEYROL, E. Water sensitivity, antimicrobial, and physicochemical analyses of edible films based on HPMC and/or chitosan. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 55(3), p.693-699, 2007.

ŠEŠLIJA, S.; NEŠIĆ, A.; ŠKORIĆ, M. L.; KRUŠIĆ, M. K.; SANTAGATA, G.; MALINCONICO, M. Pectin/Carboxymethylcellulose Films as a Potential Food Packaging Material. *Journal of Macromolecular Symposia*, v. 378, p.160-164, 2018.

SILVA, R. A.; PETTER, C. O.; SCHNEIDER, I. A. H. Avaliação da perda da coloração artificial de ágatas. *Revista Escola de Minas*, v. 60(3), p.477-482, 2007.

SILVA, A. C. B.; SCHUQUEL, L. Q. S.; SILVA, C. O.; PASCOAL, G. B. Qualidade nutricional e físico-química em cenoura (Daucus carota l.) in natura e minimamente processada. *DEMETRA: Alimentação, Nutrição & Saúde*, v. 11(2), p.355-367, 2016.

SIPAHLI, S.; MOHANLALL, V.; MELLEM, J. J. Stability and degradation kinetics of crude anthocyanin extracts from *H. sabdariffa*. *Food Science and Technology*, v. 37, p.209-215, 2017.

SMOLANDER, M. The use of freshness indicators in packaging. Novel food packaging techniques, Woodhead Publishing Ltd., Cambridge, p.128-143, 2003.

SOBRAL, P. J. A. Propriedades funcionais de biofilmes de gelatina em função da espessura. *Ciência & Engenharia*, v. 8(1), p.60-67, 1999.

SOMPONG, R.; SIEBENHANDL-EHN, S.; LINSBERGER-MARTIN, G.; BERGHOFER, E. Physicochemical and antioxidative properties of red and black rice varieties from Thailand, China and Sri Lanka. *Food Chemistry*, v. 124(1), p.132-140, 2011.

SOTHORNVIT, R.; KROCHTA, J. M. Plasticizer effect on oxygen permeability of lactoglobulina films. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 48(12), p.6298-6302, 2000.

SRINIVASA, P. C.; THARANATHAN, R. N. Chitin/Chitosan – Safe, ecofriendly packaging materials with multiple potential uses. *Food Reviews International*, v. 23(1), p.53-72, 2007.

SUMITANI, M.; TAKAGI, S.; TANAMURA, Y.; INOUE, H. Oxygen indicator composed of an organic/inorganic hybrid compound of methylene blue, reductant, surfactant and saponite. *Analytical Sciences*, v. 20, p.1153-1157, 2004.

SWEETIE, R. K.; RAO, M. S.; CHAWLA, S. P.; SHARMA, A. Shelf-life extension of convenience meat products sold in Indian supermarkets by radiation processing. *Radiation Physics and Chemistry*, v. 79(12), p.1259-1263, 2010.

TACHIBANA, N.; KIMURA, Y.; OHNO, T. Examination of molecular mechanism for the enhanced thermal stability of anthocyanins by metal cations and polysaccharides. *Food Chemistry*, v. 143, p.452-458, 2014.

TERCI, D. B. L.; ROSSI, A. V. Natural pH indicators: using paper or solution? *Química Nova*, v. 25(4), p.684-688, 2002.

TOLDRÁ, F. Meat Biotechnology, 1. ed., Springer, Valencia, 2008.

TONGDEESOONTORN, W.; MAUER, L. J.; WONGRUONG, S.; SRIBURI, P.; RACHTANPUN, P. Effect of carboxymethyl cellulose concentration on physical properties of biodegradable cassava starch-based films. Chemistry Central Journal, v. 5(6), 2011.

TUCKER, G.; HANBY, E.; BROWN, H. Development and application of a new time–temperature integrator for the measurement of P-values in mild pasteurization processes. *Food and Bioproducts Processing*, v. 87, p.23-33, 2009.

VARTIAINEN, J.; VÄHÄ-NISSI, M.; HARLIN, A. Biopolymer films and coatings in packaging applications – a review of recent developments. *Materials Sciences and Applications*, v. 5, p.708-718, 2014.

WANIHSUKSOMBAT, C. H.; HONGTRAKUL, V.; SUPPAKUL, P. Development and characterization of a prototype of a lactic acid–based time–temperature indicator for monitoring food product quality. *Journal of Food Engineering*, v. 100, p.427-434, 2010.

WELCH, C. R.; WU, Q.; SIMON, J. E. Recent Advances in Anthocyanin Analysis and Characterization. *Current Analytical Chemistry*, v. 4(2), p.75-101, 2008.

XIAO-WEI, H.; XIAO-BO, Z.; JI-YONG, S.; YANIN, G.; JIE-WEN, Z.; JIANCHUN, Z.; LIMIN, H. Determination of pork spoilage by colorimetric gas sensor array based on natural pigments. *Journal of Food Chemistry*, v. 145, p.549-554, 2014.

XIONG, Y. L. Myofibrillar protein from different muscle fiber types: implications of biochemical and functional properties in meat processing. *Critical Review in Food Science and Nutrition*, v. 34(3), p.293-320, 1994.

YAM, K. L.; PAPADAKIS, S. E. A simple digital imaging method for measuring and analyzing color of food surfaces. *Journal of Food Engineering*, v. 61, 137-142, 2004.

YANG, L.; PAULSON, A. T. Mechanical and water vapor barrier properties of edible gellan films. *Food Research Internacional*, v. 33, p.563-570, 2000.

YOSHIDA, C. M. P.; MACIEL, V. B. V.; MENDONCA, M. E. D.; FRANCO, T. T. Chitosan biobased and intelligent films: monitoring pH variations. *Food Science and Technology*, v. 55(1), p.83-89, 2014.

ZARAGOZÁ, P.; FUENTES, A.; RUIZ-RICO, M.; VIVANCOS, J. L.; FERNÁNDEZ-SEGOVIA, I.; ROS-LIS, J. V.; BARAT, J. M.; MARTÍNEZ-MAÑEZ, R. Development of a colorimetric sensor array for spoilage assessment. *Food Chemistry*, v. 175, p.315-321, 2015.

ZHAI, X.; LI, Z.; SHI, J.; HUANG, X.; SUN, Z.; ZHANG, D.; ZOU, X.; SUN, Y.; ZHANG, J.; HOLMES, M.; GONG, Y.; POVEY, M.; WANG, S. A colorimetric hydrogen sulfide sensor based on gellan gum-silver nanoparticles bionanocomposite for monitoring of meat spoilage in intelligent packaging. *Food Chemistry*, v. 290, p.135-143, 2019.

ZHAI, X.; SHI, J.; ZOU, X.; WANG, S.; JIANG, C.; ZHANG, J.; HUANG, X.; ZHANG, W.; HOLMES, M. Novel colorimetric films based on starch/polyvinyl alcohol incorporated with roselle anthocyanins for fish freshness monitoring. *Food Hydrocolloids*, v. 69, p.308-317, 2017.

ZHANG, J.; ZOU, X.; ZHAI, X.; HUANG, X. W.; JIANG, C.; HOLMES, M. Preparation of an intelligent pH film based on biodegradable polymers and roselle anthocyanins for monitoring pork freshness. *Food Chemistry*, v. 272, p.306-312, 2019.