ANA MARIA ZETTY ARENAS

**FILME BIODEGRADÁVEL À BASE DE FÉCULA DE MANDIOCA
COMO POTENCIAL INDICADOR DE MUDANÇA DE pH**

São Paulo
2012

ANA MARIA ZETTY ARENAS

**FILME BIODEGRADÁVEL À BASE DE FÉCULA DE MANDIOCA
COMO POTENCIAL INDICADOR DE MUDANÇA DE pH**

Dissertação apresentada à Escola
Politécnica da Universidade de São
Paulo para obtenção do Título de
Mestre em Engenharia

São Paulo
2012

ANA MARIA ZETTY ARENAS

**FILME BIODEGRADÁVEL À BASE DE FÉCULA DE MANDIOCA
COMO POTENCIAL INDICADOR DE MUDANÇA DE pH**

Dissertação apresentada à Escola
Politécnica da Universidade de São
Paulo para obtenção do Título de
Mestre em Engenharia

Área de Concentração:
Engenharia Química

Orientadora:
Prof^a. Titular Carmen C. Tadini

São Paulo
2012

À minha mãe Luz Mary, meu tesouro sagrado, com admiração e gratidão, pelo seu amor incomparável, dedicação e apoio infinito.

À memória de meu pai Porfírio, pelo seu amor e entrega total, por ser o farol que ainda ilumina meu caminho.

Ao meu irmão Christian, exemplo de pessoa e profissional, pelo seu amor e apoio constante.

AGRADECIMENTOS

À Deus, meu mestre por excelência, pela vida e saúde, pelo seu infinito amor e por abençoar meu caminho a cada dia.

Em especial à professora Dra. Carmen Cecília Tadini, a quem expresso minha admiração como exemplo de dedicação e trabalho árduo, pela orientação, paciência, apoio e compreensão ao longo destes anos de trabalho.

Aos professores Dra. Mariza Landgraf, Dr. Antonio C. Vieira Coelho e Dr. Luiz Kulay, pelas importantes correções, discussões e sugestões apresentadas durante o exame de qualificação, que muito contribuíram para o aprimoramento deste trabalho. E também aos professores que muito gentilmente aceitaram fazer parte da banca examinadora. Ao professor Dr. Jorge Gut, pela colaboração e sugestões apresentadas nos seminários de pós-graduação da EPQI.

À minha mãe Luz Mary e à memória do meu pai Porfirio, por ser o motor da minha vida, exemplo de pessoas que com seu infinito amor, bondade e entrega incondicional, me ensinaram o caminho para chegar a estes momentos de imensa alegria. Esta minha conquista também é de vocês!

Ao meu irmão Christian, que mesmo na distância esteve me apoiando, me encorajando e acreditando em mim, pelo seu amor e colaboração, e à minha cunhada Melina, pela companhia e carinho que sempre lhe proporciona a minha família.

Ao meu namorado John Ferney, que me demonstrou que estar presente vai além do conceito físico; pelo seu grande amor, apoio e motivação, especialmente na reta final do mestrado.

Ao professor da Universidade Nacional da Colômbia Dr. Carlos H. Mora, por me mostrar estes novos horizontes, pela confiança, apoio, carinho, motivação e amizade.

Ao Jahn Pierre, com quem surgiu o sonho de vir ao Brasil, pela sua grande ajuda acadêmica e espiritual.

Aos amigos, pelos mágicos momentos compartilhados que tanto bem me fizeram quando a saudade de casa batia forte: Mônica B., Viviana C., Johana G., Rossana R., Montserrat N., Adriana N., Alexander A., Guillermo A., Lenin V., Marcelo M. e Ruben S. Especialmente aos meus eternos amigos, Nubia E., Lina R., Wyslenny S., Carola C. e Victor R., pelo apoio e motivação, pela alegria da nossa amizade e pela força nos momentos difíceis.

Aos colegas e amigos do LEA, pelo privilégio de conviver esses anos todos trocando ideias e partilhando momentos inesquecíveis, pelo carinho e acolhida no Brasil: Ana Cristina, Arlet, Helena, Lívia, Luz, Paula, Rosa, Vanessa, Rafael, Jorge e Ewerton. Muito especialmente à Dra. Otilia C., pelas importantes discussões e contribuição ao projeto. À aluna de iniciação científica Mariana T., que me ajudou na concretização dos experimentos. Aos funcionários do LEA, Ivan e Andres, e aos secretários da EPQI, pelo auxílio durante esses anos. À mestrande e amiga, do IQ, Mariana C., pelas discussões sobre a “química” do meu trabalho.

À todos meus familiares na Colômbia, pelo carinho, entusiasmo e orações, e por sempre vibrarem com as minhas conquistas.

Ao CNPq, pela concessão da bolsa de estudos, que possibilitou minha manutenção no Brasil. À EPQI-USP, pela enorme oportunidade de cursar o mestrado em tão honrosa instituição e permitir-me fazer virar este sonho realidade.

A todos, que direta ou indiretamente, colaboraram para a realização deste trabalho e que sempre me cercaram de carinho: Muito obrigada!

*“Mas esforçai-vos, e não desfaleçam as vossas mãos,
porque a vossa obra tem uma recompensa”.*

(2 Crônicas 15:7)

RESUMO

A cada dia é mais crescente a necessidade e interesse no desenvolvimento de embalagens competitivas e com maior valor agregado. Visando atender a necessidade de consumidores cada vez mais exigentes e preocupados com o meio ambiente, este trabalho propôs o uso do pigmento natural antocianina no desenvolvimento de filmes biodegradáveis para potencial uso como embalagem inteligente, indicadora de mudança de pH. Os filmes foram elaborados pela técnica de *casting* tendo como formulação base fécula de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz), argila esmectita sódica, glicerol, etanol e água, e incorporados com duas concentrações de antocianina (0,05 e 0,10) g/100 g de solução filmogênica, e em uma segunda fase, ácido cítrico foi incorporado à matriz polimérica a fim de estudar a influência do pH da solução filmogênica (2,8 e 4,3) sobre o desempenho do filme empregado como embalagem. Os filmes foram avaliados quanto as suas propriedades mecânicas (resistência máxima à tração e porcentagem de alongação na ruptura), físico-químicas (atividade de água, umidade, espessura), de barreira (permeabilidade ao vapor d'água e ao oxigênio) e análise de mudança de cor.

Em seguida à caracterização, a atividade indicadora de pH foi testada com peixe cru embalado em recipientes de vidro tampados com o filme. Os recipientes foram acondicionados em temperatura ambiente e sob três temperaturas distintas de refrigeração, sendo que recipientes vazios também fechados com o filme foram usados como controle. A avaliação da atividade indicadora de pH foi realizada por meio da análise de mudança de cor do filme correlacionada com o pH do peixe.

Os resultados obtidos foram promissores, uma vez que os filmes avaliados se mostraram bons indicadores de pH, ao mudarem de cor à olho nu em resposta à variação do pH, sendo essa mudança mais acentuada em filmes com maior conteúdo de antocianina.

Palavras-chave: Embalagem inteligente. Filme biodegradável. Indicador de pH. Antocianina.

ABSTRACT

The interest and need for the development of more competitive, higher value-added packages grow faster each day. For attending the needs of a more demanding, environmentally-concerned group of consumers, the present work proposes the use of natural anthocyanin pigment for the development of biodegradable films to be used as intelligent packaging material capable of indicating pH change. These films, made by employing a technique known as *casting*, consist of a basic formulation of cassava starch (*Manihot esculenta* Crantz), sodium smectite clay, glycerol, ethanol, and water, combined with two concentrations of anthocyanin (0.05 and 0.10) g/100 g of a filmogenic solution. In a second phase, citric acid was added to the polymer matrix in order to study the influence of the filmogenic solution pH (2.8 and 4.3) on the packaging performance of the films. These materials were assessed according to their mechanical properties (tensile strength at break and elongation at break percentage), physical and chemical properties (water activity, moisture content and thickness), barrier properties (water vapor and oxygen permeability), and color change.

After this characterization, the pH-indicating activity was tested with raw fish stored in glass containers sealed with the film. Such containers were firstly exposed to room temperature and subsequently to three different refrigeration temperatures. Similarly, some empty containers also sealed with the same film were used as control. The assessment of the pH-indicating activity was undertaken by analyzing the color change of the film correlated with the pH of the fish.

Promising outcomes seemed to have been achieved, since the films that were assessed proved to be efficient pH indicators. The color change was visible to the naked eye in response to pH variation, and such a change was particularly strong in the films with higher anthocyanin content.

Keywords: Intelligent packaging. Biodegradable film. pH indicator. Anthocyanin.

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1 -	Fontes naturais dos polímeros biodegradáveis usados em filmes para embalagens e materiais compósitos.....	25
Figura 2.2 -	Ciclo do carbono de polímeros biodegradáveis.....	26
Figura 2.3 -	Representação estrutural da amilose.....	30
Figura 2.4 -	Representação estrutural da amilopectina.....	30
Figura 2.5 -	Representação das diferentes estruturas de nanocompósitos polímero/argila.....	39
Figura 2.6 -	Estrutura química das antocianinas.	52
Figura 2.7 -	Possíveis mudanças estruturais das antocianinas de acordo com o pH..	56
Figura 3.1 -	Representação esquemática da cápsula de alumínio contendo o filme vedada com parafina.....	66
Figura 3.2 -	Representação esquemática das células A e B.	67
Figura 3.3 -	Representação esquemática da escala Cielab.....	69
Figura 4.1 -	Filme biodegradável elaborado por <i>casting</i> à base de amido de mandioca adicionado com antocianina.....	73
Figura 4.2 -	Variação da $R_{máx}$ dos filmes à base de amido de mandioca em função do pH da solução filmogênica.....	75
Figura 4.3 -	Interação das variáveis Antocianina e pH da solução filmogênica no parâmetro E , dos filmes à base de amido de mandioca.....	75
Figura 4.4 -	Placas de Petri contendo filmes biodegradáveis incorporados com 0,10 g de antocianina/100 g de solução.....	85
Figura 4.5 -	Placas de Petri contendo filmes biodegradáveis incorporados com 0,05 g de antocianina/100 g de solução filmogênica.....	85
Figura 4.6 -	Luminosidade L^* de filmes biodegradáveis incorporados com (0,05 e 0,10) g de antocianina/100 g de solução filmogênica durante sua estocagem a 26 °C e 4 °C, utilizados como embalagem de peixe.....	88
Figura 4.7 -	Parâmetro de cor a^* de filmes biodegradáveis incorporados com (0,05 e 0,10) g de antocianina/100 g de solução filmogênica durante sua estocagem a 26 °C e 4 °C, utilizados como embalagem de peixe.....	89
Figura 4.8 -	Parâmetro de cor b^* de filmes biodegradáveis incorporados com (0,05 e 0,10) g de antocianina/100 g de solução filmogênica durante sua estocagem a 26 °C e 4 °C, utilizados como embalagem de peixe.....	92

Figura 4.9 - Diferença total de coloração dE^* de filmes biodegradáveis incorporados com (0,05 e 0,10) g de antocianina/100 g de solução filmogênica durante sua estocagem a 26 °C e 4 °C, utilizados como embalagem de peixe.....	93
Figura 4.10 - Béqueres contendo peixes comparados com os béqueres controle armazenados a 26 °C utilizando filmes contendo (0,05 e 0,10) g de antocianina, ao longo do armazenamento.....	94
Figura 4.11 - Béqueres contendo peixes comparados com os béqueres controle armazenados a 4 °C utilizando filmes contendo (0,05 e 0,10) g de antocianina, ao longo do armazenamento.....	95
Figura 4.12 - Luminosidade L^* dos filmes biodegradáveis incorporados com 0,10 g de antocianina/100 g de solução filmogênica, com pH_{sf} de 2,8 e 4,3, durante sua estocagem a 6 °C e 12 °C, utilizados como embalagem de peixe.....	98
Figura 4.13 - Parâmetro a^* dos filmes biodegradáveis incorporados com 0,10 g de antocianina/100 g de solução filmogênica, com pH_{sf} de 2,8 e 4,3, durante sua estocagem a 6 °C e 12 °C, utilizados como embalagem de peixe.	101
Figura 4.14 - Parâmetro b^* dos filmes biodegradáveis incorporados com 0,10 g de antocianina/100 g de solução filmogênica, com pH_{sf} de 2,8 e 4,3, durante sua estocagem a 6 °C e 12 °C, utilizados como embalagem de peixe.....	102
Figura 4.15 - Diferença total de coloração dE^* dos filmes biodegradáveis incorporados com 0,10 g de antocianina/100 g de solução filmogênica, com pH_{sf} de 2,8 e 4,3, durante sua estocagem a 6 °C e 12 °C, utilizados como embalagem de peixe.....	103
Figura 4.16 - Potencial Hidrogeniônico (pH) do peixe do tipo pescada-branca (<i>Cynoscion leiarchus</i>) em estado fresco e cru, durante sua estocagem em temperatura de (6 ± 2) °C e (12 ± 2) °C.....	104
Figura 4.17 - Parâmetro a^* dos filmes biodegradáveis incorporados com 0,10 g de antocianina/100 g de solução, com pH_{sf} (2,8 e 4,3), correlacionado com o pH do peixe ao longo do tempo de estocagem a 6 °C.....	105
Figura 4.18 - Parâmetro a^* dos filmes biodegradáveis incorporados com 0,10 g de antocianina/100 g de solução, com pH_{sf} (2,8 e 4,3), correlacionado com o pH do peixe ao longo do tempo de estocagem a 12 °C.....	106
Figura 4.19 - Recipientes contendo peixe comparados com os recipientes controle armazenados a (6 e 12) °C, utilizando filmes biodegradáveis contendo 0,10 g de antocianina/100 g de solução com pH_{sf} (2,8 e 4,3), ao longo do tempo de estocagem.	108
Figura 4.20 - Béqueres contendo soluções ATH_MMT-Na e ATH_PADRÃO.....	110
Figura 4.21 - Espectros de absorção das soluções ATH_PADRÃO e ATH_MMT-Na....	111

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1 -	Tempo de degradação de alguns materiais descartados em lixões.....	22
Tabela 2.2 -	Conteúdo médio de amilose de amidos naturais.....	30
Tabela 2.3 -	Exemplos de indicadores externos e internos e seus princípios de funcionamento utilizados em embalagens inteligentes.....	42
Tabela 2.4 -	Indicadores de cor, seus fabricantes e nomes comerciais.....	44
Tabela 2.5 -	Estruturas, nomes e fontes na natureza das principais antocianinas.....	53
Tabela 3.1 -	Valores de pH e quantidades de antocianina em relação à quantidade de amido de mandioca para a elaboração de filmes compósitos.....	61
Tabela 4.1 -	Resistência máxima à tração ($R_{m\acute{a}x}$) dos filmes à base de amido de mandioca elaborados pelo método <i>casting</i>	74
Tabela 4.2 -	Porcentagem de alongação na ruptura (E) dos filmes à base de amido de mandioca elaborados por <i>casting</i>	74
Tabela 4.3 -	Permeabilidade ao vapor de água (PVA) dos filmes à base de amido de mandioca elaborados por <i>casting</i>	77
Tabela 4.4 -	Coeficiente de permeabilidade ao oxigênio ($P'O_2$) dos filmes à base de amido de mandioca elaborados por <i>casting</i>	79
Tabela 4.5 -	Espessura (e) das amostras de filmes à base de amido de mandioca elaborados por <i>casting</i>	80
Tabela 4.6 -	Teor de umidade dos filmes elaborados por <i>casting</i> , com [0,75 g de glicerol e 0,10 g de argila montmorilonita sódica (MMT-Na)] / 5 g de amido de mandioca.....	81
Tabela 4.7 -	Atividade de água (a_w) das amostras de filmes à base de amido de mandioca elaborados por <i>casting</i>	83
Tabela 4.8 -	Parâmetro de cor L^* de filmes à base de amido de mandioca elaborados por <i>casting</i>	83
Tabela 4.9 -	Parâmetro de cor a^* de filmes à base de amido de mandioca elaborados pelo método <i>casting</i>	84
Tabela 4.10 -	Parâmetro de cor b^* de filmes à base de amido de mandioca elaborados por <i>casting</i>	84
Tabela 4.11 -	Parâmetros de cor L^* , a^* , b^* e dE^* dos filmes à base de amido de mandioca incorporados com antocianina elaborados por <i>casting</i>	87
Tabela 4.12 -	pH do peixe e parâmetros de cor L^* , a^* , b^* e dE^* de filmes à base de amido de mandioca, com pH_{sf} 2,8.....	96
Tabela 4.13 -	pH do peixe e parâmetros de cor L^* , a^* , b^* e dE^* de filmes à base de amido de mandioca, com pH_{sf} 4,3.....	97

LISTA DE SIGLAS

ABIEF	Associação Brasileira da Indústria de Embalagens Plásticas Flexíveis
ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
ABRE	Associação Brasileira de Embalagens
ANOVA	Análise de Variância
AC	Ácido Cítrico
ASTM	American Society for Testing and Materials
AT	Acidez Titulável
ATH	Antocianina
ATH_PADRÃO	Solução de Antocianina Padrão
ATH_MMT-Na	Solução de Antocianina e Argila Montmorilonita Sódica
B3	3 % de Biodiesel Adicionado ao Diesel Fóssil
B5	5 % de Biodiesel Adicionado ao Diesel Fóssil
BCG	Bromocresol Green
BP	Bromocresol Purple
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
DMA	Dimetilamina
GMMT	Glycerol Modified-Montmorillonite
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
ISO	International Organization for Standardization
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
LEA	Laboratório de Engenharia de Alimentos
MMT	Argila Montmorilonita
MMT-Na	Argila Montmorilonita Sódica
MR	Methyl Red
PA	Poliamida
PE	Polietileno
PEAD	Polietileno de Alta Densidade
PET	Polietileno Tereftalato
pH	Potencial Hidrogeniônico
PHA	Polyhydroxy Alkanoates

PLA	Polylactic Acid
PP	Polipropileno
PS	Poliestireno
PVC	Policloreto de Vinila
RIISPOA	Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal
SSO	Specific Spoilage Organisms
TCD	Total Color Difference
TMA	Trimetilamina
TP	Thermoplastic Starch
TVB-N	Total Volatile Basic Nitrogen
TVC	Total Viable Count
UR	Umidade Relativa
USP	Universidade de São Paulo

LISTA DE SÍMBOLOS

A	Área do corpo de prova (m^2)
a^*	Parâmetro de cor, eixo verde – vermelho (adimensional)
a_w	Atividade de água (adimensional)
b^*	Parâmetro de cor, eixo azul – amarelo (adimensional)
E	Elongação na ruptura (%)
dE^*	Diferença total de coloração (adimensional)
D_{ni}	Distância entre as garras do texturômetro (mm)
e	Espessura (mm)
F_{ni}	Força máxima (N)
L	Largura do corpo de prova (mm)
L^*	Luminosidade, parâmetro de cor (adimensional)
pH_{sf}	Potencial hidrogeniônico da solução filmogênica (adimensional)
PO_2	Permeabilidade ao oxigênio ($\text{cm}^3 \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{Pa}^{-1}$)
$P'O_2$	Coeficiente de permeabilidade ao oxigênio ($\text{cm}^3 \cdot \text{m}^{-1} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{Pa}^{-1}$)
PVA	Permeabilidade ao vapor de água ($\text{g} \cdot \text{mm} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{d}^{-1} \cdot \text{kPa}^{-1}$)
p_s	Pressão de saturação do vapor (kPa)
$R_{m\acute{a}x}$	Resistência máxima à tração (MPa)
rpm	Revoluções por minuto
t	Tempo (s; h; d)
T_g	Temperatura de transição vítrea ($^{\circ}\text{C}$)
TPO_2	Taxa de Permeabilidade ao Oxigênio ($\text{cm}^3 \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{d}^{-1}$)
$TPVA$	Taxa de Permeabilidade ao Vapor de Água ($\text{g} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{m}^{-2}$)
UR	Umidade Relativa (%)
Δp	Diferença de pressão parcial (kPa)
w	Ganho de massa (g)

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	18
2	REVISÃO DA LITERATURA	21
2.1	Embalagens plásticas	21
2.2	Embalagens biodegradáveis	23
2.3	Embalagens à base de amido	26
2.3.1	Estrutura do amido	29
2.3.2	Amido termoplástico	31
2.3.3	Plastificação do amido	33
2.4	Nanocompósitos	36
2.4.1	Argila	37
2.4.2	Nanocompósitos polímero/argila	38
2.5	Embalagens inteligentes	40
2.5.1	Indicadores de frescor e pH	45
2.6	Antocianinas	51
2.6.1	Estabilidade da cor	53
2.6.2	Influência do pH	54
3	MATERIAIS E MÉTODOS	57
3.1	Materiais	59
3.2	Elaboração dos filmes biodegradáveis	59
3.3	Avaliação da atividade indicadora de pH dos filmes biodegradáveis	61
3.3.1	Preparo da amostra	61
3.3.2	Determinação da alteração de cor dos filmes biodegradáveis inteligentes	62
3.3.3	Determinação do pH das amostras de peixe	63
3.4	Avaliação da interação antocianina - argila	63
3.4.1	Preparo da amostra	63
3.4.2	Análise de cor	64
3.5	Caracterização dos filmes biodegradáveis	64
3.5.1	Propriedades mecânicas	64
3.5.2	Permeabilidade ao vapor de água	65
3.5.3	Permeabilidade ao oxigênio	67
3.5.4	Análise de Cor	69
3.5.5	Aspecto visual	70
3.5.6	Espessura	71
3.5.7	Atividade de Água	71
3.5.8	Teor de Umidade	71
3.6	Análise dos resultados	71

4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	72
4.1	Elaboração dos filmes	72
4.2	Caracterização dos filmes	73
4.2.1	Propriedades mecânicas	73
4.2.2	Propriedades de barreira	77
4.2.3	Espessura	80
4.2.4	Umidade	81
4.2.5	Atividade de água	82
4.2.6	Propriedades de cor	83
4.3	Avaliação do filme como indicador colorimétrico de pH	86
4.3.1	Primeira Fase	86
4.3.2	Segunda Fase	96
4.4	Avaliação da interação antocianina - argila	110
5	CONCLUSÕES	113
6	SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	115
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	116

1 INTRODUÇÃO

Durante muitos anos os polímeros derivados de petróleo vêm sendo utilizados como materiais de embalagem devido às suas vantagens em relação a outros materiais tradicionais (KOLYBABA et al., 2008; LÓPEZ-RUBIO et al., 2004; MENESES; CORRALES; SIRACUSA et al., 2008; VALENCIA, 2007). No entanto, estes materiais dependem inteiramente deste recurso fóssil não renovável e não são biodegradáveis, gerando assim resíduos sólidos que levam a sérios problemas ambientais (ARVANITOYANNIS; BILIADERIS, 1999; KOLYBABA et al., 2008; MENESES, CORRALES, VALENCIA, 2007; SIRACUSA et al., 2008; SOUZA, 2011; THARANATHAN, 2003).

Neste contexto, o emergente conceito de desenvolvimento sustentável tem mostrado que os filmes biodegradáveis são uma perspectiva interessante como alternativa aos polímeros petroquímicos, uma vez que são gerados a partir de recursos renováveis e podem aumentar a renda no setor agrícola (MENESES; CORRALES; VALENCIA, 2007; SOUZA; DITCHFIELD; TADINI, 2010). Para aplicações específicas, como embalagens de alimentos, a sua utilização é realmente promissora (MENESES; CORRALES; VALENCIA, 2007; SIRACUSA et al., 2008; THARANATHAN, 2003).

Os polímeros biodegradáveis à base de amido de diversas fontes botânicas são bastante promissores, pois além de seu caráter biodegradável e renovável, são comestíveis, têm baixo custo e são amplamente disponíveis (FAMÁ et al., 2006; KECHICHIAN, 2007; PARRA et al., 2004; SOUZA, 2011; VEIGA-SANTOS; DITCHFIELD; TADINI, 2011).

Dentre os filmes à base de amido, estudos indicam que a fécula de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) apresenta resultados comparáveis (FAMÁ et al., 2006; MALI et al., 2006; PARRA et al., 2004; VEIGA-SANTOS, 2004), podendo também ser utilizadas como matriz para agentes indicadores de pH (FAMÁ et al., 2006; MALI et al., 2006; VEIGA-SANTOS; DITCHFIELD; TADINI, 2011).

No entanto, filmes elaborados exclusivamente por amido apresentam-se quebradiços e pouco resistentes, sendo necessária a incorporação de aditivos às matrizes poliméricas. O problema da rigidez é resolvido pela incorporação de

plastificantes como o glicerol, o qual tem mostrado boa eficiência na melhoria das propriedades mecânicas, resultando em materiais com maior porcentagem de alongação (MALI et al., 2006; PARRA et al., 2004; SHIMAZU; MALI; GROSSMANN, 2007). Além disso, seu uso é justificado pelo baixo custo e por ser um subproduto da produção do biodiesel. Contudo, os plastificantes são de natureza hidrofílica e a sua presença na matriz polimérica incrementa a sua transmissão de vapor de água (TALJA et al., 2008) e diminui a temperatura de transição vítrea (T_g) (TALJA et al., 2008).

Deste modo, visando melhorar as propriedades térmicas e mecânicas dos filmes biodegradáveis e a permeabilidade elevada causada pelo efeito do plastificante, a produção de biocompósitos argila/amido foi proposta neste estudo. Os nanocompósitos argila/amido estudados demonstraram uma melhoria nas propriedades mecânicas, térmicas e de barreira (AVELLA et al., 2005; CYRAS et al., 2008).

Visando atender às necessidades de um mercado consumidor cada vez mais exigente e especificamente preocupado com a qualidade e inocuidade dos produtos alimentícios, surgem as embalagens inteligentes (LÓPEZ-RUBIO et al., 2004; ROONEY, 1995; SOUZA; DITCHFIELD; TADINI, 2010) que, além de proteger, indicam uma característica específica do alimento embalado para o consumidor e/ou fabricante, trazendo vantagens em relação às embalagens convencionais (DAINELLI et al., 2008; KERRY; O'GRADY; HOGAN, 2006; SOUZA; DITCHFIELD; TADINI, 2010; VEIGA-SANTOS; DITCHFIELD; TADINI, 2011).

O reconhecimento dos benefícios das tecnologias de embalagens ativas e inteligentes pela indústria de alimentos, o desenvolvimento de sistemas de embalagens economicamente viáveis e a aceitação do consumidor exigem incentivar a pesquisa para a sua implantação comercial.

Por isso, pesquisadores de todo o mundo estão bastante interessados em reduzir o risco de intoxicação das pessoas por ingestão de alimentos inapropriados para o consumo e ao mesmo tempo ajudar na prevenção do desperdício (PACQUIT et al., 2006). Por outro lado, as embalagens inteligentes conhecidas são, em geral, produzidas com material polimérico convencional derivado de petróleo (ARVANITOYANNIS; BILIADERIS, 1998).

Entre os diferentes tipos de embalagens inteligentes, encontram-se as indicadoras de pH, que indicam a correlação entre o produto embalado e seu pH,

através de sensores química ou fisicamente associados à embalagem (HASNECI et al., 2004; HONG; PARK, 2000).

Esse tipo de embalagem é uma alternativa interessante para a indústria de alimentos, especialmente para as de carne e frutos do mar, pois existe um interesse em desenvolver métodos para a avaliação da frescura dos seus produtos, de tal forma que o próprio consumidor possa avaliar as condições de consumo mediante a indicação de alterações de pH do alimento (KERRY; O'GRADY; HOGAN, 2006; PACQUIT et al., 2006).

Os estudos ainda são incipientes sobre os materiais indicadores de pH e a grande maioria estão patenteados (AHVENAINEN et al., 1997; DITCHFIELD; TADINI, 2009; HONEYBOURNE, 1993; QUAN; STEVENS, 1998; MILLERS; WILKES; CONTE, 1999). Entre os indicadores baseados em alterações de cor quando ocorre variação do pH do material embalado, raras são as patentes que abordam a utilização de compostos naturais de grau alimentício, como as antocianinas, e a maioria dessas patentes estão diretamente relacionadas à aplicação em embalagens derivadas de petróleo.

OBJETIVOS

Objetivo geral

Desenvolver filme biodegradável formulado à base de fécula de mandioca reforçado com nanopartículas de argila e incorporado de pigmento natural antocianina em pó como aditivo indicador de mudança do pH.

Objetivos específicos

- Caracterizar o filme biodegradável quanto às suas propriedades mecânicas, de barreira, físico-químicas, cor e aspecto visual.
- Em um estudo de caso, avaliar a potencial mudança de cor do filme em função da alteração de pH do produto embalado.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Embalagens plásticas

Os materiais poliméricos são sólidos, não-metálicos de alto peso molecular compostos de repetidas macromoléculas e têm diferentes características dependendo de sua composição (CALLISTER, 2000). Cada macromolécula que compreende um material polimérico é conhecida como uma unidade *mer*; uma única *mer* é chamada de monômero, enquanto moléculas gigantes que apresentam repetidas unidades *mer* são conhecidas como polímeros (KOLYBABA et al., 2008).

Uma variedade de materiais (renováveis e não-renováveis) é empregada como fonte de matéria-prima para materiais poliméricos modernos. Plásticos que são formados a partir de matérias-primas não-renováveis são geralmente de origem fóssil, têm formato de um compósito em que uma matriz polimérica apresenta uma fase dominante com uma base praticamente impenetrável, em torno de materiais de enchimento como fibras de vidro ou de carbono (WILLIAMS et al., 2000).

Cerca de 30 % dos plásticos de fontes não-renováveis, como o petróleo, são utilizados como embalagens (SIRACUSA et al., 2008), sendo os mais utilizados o polietileno tereftalato (PET), policloreto de vinila (PVC), polietileno (PE), polipropileno (PP), poliestireno (PS) e poliamida (PA). Isto, porque tais materiais apresentam características úteis como maleabilidade, leveza, transparência, facilidade de impressão, boa selagem térmica, resistência à tração e barreira ao oxigênio (ALVES et al., 2006; SIRACUSA et al., 2008; SOUZA; DITCHFIELD; TADINI, 2010).

Porém, esses plásticos convencionais são resistentes à biodegradação (AMINABHAVI et al., 1990) gerando um sério problema de poluição ambiental (ARVANITOYANNIS; BILIADERIS, 1999; KOLYBABA et al., 2008; SIRACUSA et al., 2008; THARANATHAN, 2003;), uma vez que, quando usados como embalagens, sua vida útil é muito curta e, após o seu descarte, demoram 100 anos ou mais, para a decomposição total (MENESES; CORRALES; VALENCIA, 2007; ROSA; FRANCO; CALIL, 2001; SIRACUSA et al., 2008; SOUZA; DITCHFIELD; TADINI, 2010; SOUZA, 2011; STEVENS, 2002).

A cidade de São Paulo gera mais de 13 mil toneladas por dia de resíduos sólidos, dos quais mais de 700 toneladas são constituídos por embalagens plásticas. A forma mais utilizada no Brasil para o descarte de resíduos é a adoção generalizada de lixões, os quais consistem de lançamento dos resíduos ao solo, a céu aberto, o que pode causar danos ao meio ambiente e problemas de saúde pública (PIVA; WIEBECK, 2005). O tempo de degradação de alguns materiais utilizados como embalagens, quando são descartados em lixões é apresentado na Tabela 2.1.

Tabela 2.1 – Tempo de degradação de alguns materiais quando descartados em lixões.

Material ^a	Tempo de degradação
Aço (latas)	10 anos
Alumínio	200 a 500 anos
Isopor	Indeterminado
Madeira	6 meses
Madeira pintada	13 anos
Papel	1 a 6 meses
Plásticos	200 - 450 anos
Plástico (PET)	100 anos
Longa vida	100 anos
Vidro	Indeterminado

^a Fonte: Magalhães (2012)

A produção brasileira anual de polímeros sintéticos é de aproximadamente 2,2 milhões de toneladas, das quais 37,64 % destinam-se à indústria de embalagens, representando uma produção aproximada de R\$ 13,8 bilhões (ABRE, 2009). Dentre as embalagens, 50 % se destinam ao setor alimentício (HARADA, 2005).

O cenário de embalagens flexíveis para alimentos no Brasil está dominado pelos filmes monocamadas que são utilizados para embalar 40 % em peso da produção das principais classes de alimentos. Os filmes laminados contribuem com 25 %, filmes coextrusados 5 % e outros materiais 30 % (MDIC, 2005).

Do total de plásticos rígidos e filmes flexíveis produzidos no Brasil, apenas 16,5 % é reciclado, o que equivale a 200 mil toneladas por ano (MORILHAS; WECHSLER; KRUGLIANSKAS, 2007). A maior limitação para a reciclagem é a diversidade das resinas empregadas, com diferentes aditivos como cargas, colorantes e plastificantes (DAVIS; SONG, 2006; MORILHAS; WECHSLER; KRUGLIANSKAS, 2007).

Assim, toda essa diversidade dos componentes das embalagens dificulta o processo de separação para o re-processamento, tornando a reciclagem um processo de alto custo (DAVIS; SONG, 2006). Aliado a este fato, a reciclagem torna-se limitada, visto que esses materiais plásticos não podem ser reciclados inúmeras vezes (AVELLA et al., 2005; SOUZA, 2011).

2.2 Embalagens biodegradáveis

A *American Society for Testing of Materials* (ASTM, 2003) e a *International Organization for Standardization* (ISO 2005, 2007) definem plásticos degradáveis como aqueles que sofrem uma mudança significativa na estrutura química sob condições ambientais específicas. Estas alterações resultam em uma perda das propriedades físicas e mecânicas, medidas por meio de métodos padronizados.

Nos plásticos biodegradáveis ocorre um processo intrínseco, pelo qual micro-organismos e suas enzimas consomem este polímero como fonte de nutrientes, em condições normais de umidade, temperatura e pressão. Os polímeros melhor adaptados à biodegradação completa são os naturais, aqueles hidrolisáveis a CO_2 e H_2O ou a CH_4 (KROCHTA; MULDER-JOHNSTON, 1997; LIMA, 2004).

Entende-se por biodegradação como um processo natural onde compostos orgânicos, pelo intermédio de mecanismos bioquímicos, são convertidos em compostos mineralizados simples e, então, redistribuídos no meio ambiente, através do ciclo elementar, tal como o do carbono, nitrogênio e enxofre (SALAME, 1986).

O processo de biodegradação depende de diversos fatores, como a atividade microbiana no ambiente, temperatura, pH, peso molecular e cristalinidade do polímero (AVELLA et al., 2005; DAVIS; SONG, 2006).

As embalagens feitas de materiais biodegradáveis são uma grande alternativa para a diminuição da poluição ambiental causada pelas embalagens plásticas

convencionais derivadas do petróleo (ARVANITOYANNIS; BILIADERIS, 1999; KOLYBABA et al., 2008; MENESES, CORRALES, VALENCIA, 2007; SIRACUSA et al., 2008; THARANATHAN, 2003).

Essa problemática ambiental dos polímeros sintéticos têm incentivado pesquisas no mundo inteiro (Itália, Irlanda, França, Grécia, Brasil, E.U.A.) e indústrias como NatureWorks LLC, no sentido de incrementar ou desenvolver materiais poliméricos biodegradáveis, especialmente, aqueles baseados em produtos de origem biológica (SIRACUSA et al., 2008), visando desenvolver embalagens que sejam benéficas tanto para o usuário quanto para o meio-ambiente (MALI; GROSSMANN; YAMASHITA, 2010; SIRACUSA et al., 2008; THURSTON et al. 1994).

Entre as vantagens da utilização de embalagens biodegradáveis quando comparadas às não-biodegradáveis, destacam-se: o processo de fabricação envolvendo somente a utilização de substâncias atóxicas; a utilização de matérias-primas proveniente de fontes renováveis; alta biodegradabilidade e, adicionalmente, a biomassa resultante da biodegradação da embalagem que pode agir como fertilizante (THARANATHAN, 2003).

Segundo Davis e Song (2006) os maiores mercados para os materiais biodegradáveis são: embalagens descartáveis para alimentos e produtos não alimentícios; produtos de uso pessoal e de saúde como: guardanapos, absorventes femininos, fraldas, etc.; produtos de consumo do dia-a-dia, tais como: pratos, copos, caixas de ovos, etc. e, sacos para acolchoamento (*mulching*) agrícola.

Polímeros biodegradáveis provenientes de fontes agrícolas têm a capacidade de misturar-se e/ou processar-se com polímeros de outras fontes para resultar no material desejado. A sua funcionalidade pode ser melhorada usando-o em combinação com outras matérias-primas, tais como plastificantes e aditivos (THARANATHAN, 2003).

O desempenho esperado dos materiais poliméricos biodegradáveis utilizados na embalagem de alimentos é que além de contê-los, os proteja do ambiente e mantenha a sua qualidade (ARVANITOYANNIS, 1999). Para executar essas funções é importante controlar e modificar suas propriedades mecânicas e de barreira, que, conseqüentemente, dependem da estrutura do material da embalagem polimérica.

O polímero biodegradável natural é derivado de quatro fontes principais: animal (colágeno/gelatina), frutos do mar (quitina/quitosana), microbiana (ácido

polilático ou *PLA* e polihidroxialcanoatos ou *PHA*) e origem agrícola (lipídios e hidrocolóides, proteínas e polissacarídeos) (KOLYBABA et al., 2008; THARANATHAN, 2003), como mostrado na Figura 2.1.

Figura 2.1 – Fontes naturais dos polímeros biodegradáveis usados em filmes para embalagens e materiais compósitos (THARANATHAN, 2003).

No final do seu período útil, materiais poliméricos biodegradáveis geralmente são enviados para aterros sanitários ou compostagem (KOLYBABA et al., 2008). O atributo de compostagem é muito importante para esses materiais porque, enquanto a reciclagem é energeticamente custosa, a compostagem permite a eliminação das embalagens no solo, contrário aos plásticos provenientes da indústria petroquímica.

Micro-organismos são capazes de consumir esses materiais em sua totalidade entre (6 – 12) semanas gerando apenas água, dióxido de carbono e biomassa, sem resíduos tóxicos (KOLYBABA et al., 2008; SIRACUSA et al., 2008). Materiais como amido termoplástico podem degradar em 45 dias em compostagem controlada e água (SIRACUSA et al., 2008).

A velocidade de biodegradação depende da temperatura, umidade, número e tipo de micro-organismo (aeróbio e anaeróbio). O objetivo dos polímeros

biodegradáveis é imitar o ciclo de vida da biomassa, que inclui a conservação dos recursos fósseis, água e produção de CO_2 (THARANATHAN, 2003). O ciclo do carbono com a degradação do polímero biodegradável é mostrado na Figura 2.2.

Figura 2.2 – Ciclo do carbono de polímeros biodegradáveis (Adaptado de THARANATHAN, 2003).

2.3 Embalagens à base de amido

A partir da década de 1970, estudos focaram a introdução de amido em matrizes poliméricas derivadas de petróleo, na proporção de (5 a 20) %, levando à obtenção de plásticos considerados biofragmentáveis, mas não totalmente biodegradáveis (GRIFFIN, 1977). Na década de 1990, aumentou o interesse no desenvolvimento de materiais termoplásticos compostos basicamente por amido incorporados com plastificantes para melhorar a elongação do polímero (ALVES et al., 2007; MALI et al., 2004a, 2004b, 2005, 2006; SHIMAZU; MALI; GROSSMANN, 2007; SOUZA; ANDRADE, 2000).

O uso do amido na produção de filmes baseia-se nas propriedades físicas, químicas e funcionais da amilose para formar géis e no seu desempenho para formar filmes. Devido à sua linearidade, as moléculas de amilose em solução, tendem a orientar-se paralelamente, aproximando-se para formar ligações de hidrogênio entre hidroxilas de polímeros adjacentes (WURZBURG, 1986).

Dependendo do processo de produção e da fonte, polímeros biodegradáveis podem ter propriedades semelhantes aos tradicionais (SIRACUSA et al., 2008).

Recentemente, estudos para o desenvolvimento de polímeros provenientes de fontes naturais estão atraindo especial atenção dos pesquisadores. Entre os filmes produzidos à base de polissacarídeos, destacam-se os produzidos à base de amido (FAMÁ et al., 2006; KECHICHIAN, 2007; LOURDIN; DELLA VALLE; COLONNA, 1995; MALI; GROSSMANN; YAMASHITA, 2010; MENESES; CORRALES; VALENCIA, 2007; PARRA et al., 2004; SOUZA, 2011; VEIGA-SANTOS, 2004; VEIGA-SANTOS et al., 2005; VEIGA-SANTOS; DITCHFIELD; TADINI, 2011) devido a sua procedência de fontes renováveis amplamente disponíveis (FAMÁ et al., 2006; KECHICHIAN, 2007), baixo custo (AVÉROUS et al., 2000; KECHICHIAN, 2007; SOUZA, 2011) e por serem uma alternativa mais viável economicamente às resinas tradicionais (CHANDRA; RUSTGI, 1998; SOUZA, 2011).

Os filmes à base de amido são transparentes, fáceis de processar, fornecem boa barreira contra oxigênio e dióxido de carbono, são facilmente biodegradáveis e compatíveis com a maioria dos materiais; o que facilita a mistura na sua elaboração. Suas principais desvantagens são a alta permeabilidade ao vapor de água, solubilidade em água, resistência mecânica baixa e custo de produção elevado quando comparados aos plásticos convencionais derivados do petróleo (SOUZA; DITCHFIELD; TADINI, 2010).

Nos últimos anos a matéria-prima predominante para a produção de polímeros biodegradáveis é o amido de milho, talvez por ser a principal fonte de amido produzido no mundo (64 %), seguido pelo de batata-doce (13 %) e pelo da mandioca (11 %) (SOUZA; DITCHFIELD; TADINI, 2010). Existem muitas fontes de amido, que podem ser empregadas no desenvolvimento de bioplásticos e, assim, cada localidade pode empregar a fonte de amido mais abundante e disponível na sua localidade.

Nesse contexto, é importante salientar a grande produção de fécula de mandioca no Brasil, terceiro maior produtor mundial em 2009, com 24,4 milhões de toneladas (FAOSTAT, 2011). Além disso, a fécula de mandioca possui vantagens frente a outras fontes de amido como: facilidade de extração (MOORTHY, 2004), taxa de retrogradação menor em relação ao amido de outras fontes, resultando em materiais mais estáveis ao longo do tempo (MALI et al., 2004b), baixo custo (FAMÁ

et al., 2006), clareza da sua pasta, baixa temperatura de gelatinização e boa estabilidade do gel (MALI et al., 2006; SOUZA; DITCHFIELD; TADINI, 2010), além de ser atóxica e possuir uma ampla gama de aplicações, mostrando assim ser uma fonte promissora na elaboração de filmes biodegradáveis, como já tem sido comprovado por diversos pesquisadores no mundo (ALVES et al., 2007; FAMÁ et al., 2006; FAMÁ; GOYANES; KECHICHIAN, 2007; MALI et al., 2006; PARRA et al., 2004; SOUZA, 2011; VEIGA-SANTOS; DITCHFIELD; TADINI, 2011).

A fécula da mandioca é facilmente extraída, resultando em um produto de cor branca sem necessidade de se usar agentes de clareamento, uma vez que os tubérculos contêm baixa quantidade de proteínas ($< 0,20\%$), lipídios ($< 0,15\%$), cinzas ($< 0,21\%$) e fósforo ($< 0,007\%$) (MOORTHY, 2004). Ela apresenta coloração branca, é insípida e inodora (HOSENEY, 1999).

Quando filmes biodegradáveis à base de amido são produzidos em escala laboratorial, geralmente são preparados pelo método *casting*, no qual se verte a solução filmogênica sobre um suporte para posterior secagem (DONHOWE; FENNEMA, 1994). A escolha do material da base é importante para a obtenção dos filmes, que possam ser facilmente removidos sem qualquer rasgamento ou enrugamento. Câmaras de secagem por infravermelho são vantajosas na medida em que aceleram o processo de secagem (THARANATHAN; SRINIVASA, RAMESH, 2002). Salienta-se que é desejável que o teor de umidade esteja entre $5\% - 8\%$ no filme seco para facilitar a sua remoção (THARANATHAN, 2003).

A formação do filme, geralmente envolve associações inter- e intramoleculares ou de reticulação (*cross-linking*) das cadeias poliméricas formando uma rede semi-rígida 3D que aprisiona e imobiliza o solvente. O grau de coesão depende da estrutura do polímero, solvente utilizado, temperatura e presença de outras moléculas tais como plastificantes (THARANATHAN, 2003).

Bader e Goritz (1994a, 1994b) encontraram que a estrutura cristalina dos filmes à base de amido, e consequentemente, as propriedades mecânicas e de barreira, são profundamente influenciadas pelas condições de secagem, principalmente a umidade relativa. Filmes secos sob umidades relativas altas apresentam estruturas com maior grau de cristalinidade e maior teor de umidade residual, parâmetro este que tornam os filmes mais susceptíveis a alterações durante o seu armazenamento e utilização (RINDLAV-WESTLING, 1998).

2.3.1 Estrutura do amido

O amido é o polissacarídeo de reserva de energia dos vegetais e está presente nos plastídios de vegetais superiores. Está disponível em abundância na natureza e pode ser obtido de diversas fontes vegetais, como cereais, raízes e tubérculos, assim como de frutas e legumes. No entanto, a extração em nível comercial de amido se restringe aos cereais, como milho, trigo e arroz, e de tubérculos como mandioca e batata (CHIVRAC; POLLET; AVÉROUS, 2009).

Os diferentes amidos apresentam propriedades diferentes e são utilizados na indústria de alimentos com diferentes propósitos, tais como: nutricional, tecnológico, funcional, sensorial e estético. O único outro componente orgânico que ocorre naturalmente em quantidade maior é a celulose (MALI; GROSSMANN; YAMASHITA, 2010).

O amido está armazenado sob a forma de grânulos, que apresentam certo grau de organização molecular, o que os confere um caráter parcialmente cristalino com graus de cristalinidade que variam de 20 % a 45 % (MARTIN et al., 2001). O amido está organizado em uma estrutura macroscópica em que camadas de amilose e amilopectina são depositadas radialmente em torno de um ponto central, chamado hilo. A deposição continuada faz crescer a estrutura e dá origem ao grânulo semicristalino.

O amido é um polímero natural formado de unidades de glicoses ligadas entre si e representado pela fórmula geral $(C_6H_{10}O_5)_n + xH_2O$ (FRANCO et al., 2002). É formado por dois tipos de polímeros de glicose: a amilose e a amilopectina, com estruturas e funcionalidades diferentes.

A amilose (Figura 2.3) é um polímero linear com unidades de D-glicose ligadas por ligações α -(1→4) que conferem à molécula uma estrutura helicoidal, composta por aproximadamente 20 g de amilose/100 g de amido, com grau de polimerização de 200 a 3000, dependendo da fonte do amido. O grão de amido proveniente da fécula de mandioca é composto por 16 % – 20 % de amilose.

A amilopectina (Figura 2.4) é um polímero altamente ramificado, menos hidrossolúvel do que a amilose, com unidades de D-glicose ligadas através de ligações α -(1→4) e as ramificações em α -(1→6). Constitui aproximadamente 80 % dos polissacarídeos existentes no grão de amido (SHIMAZU; MALI; GROSSMANN,

2007). O conteúdo médio de amilose e amilopectina de amidos naturais é ilustrado na Tabela 2.2.

Figura 2.3 – Representação estrutural da amilose (TESTER; KARKALAS; QI, 2004).

Figura 2.4 – Representação estrutural da amilopectina (TESTER; KARKALAS; QI, 2004).

As áreas cristalinas do amido mantêm a estrutura dos grânulos, controlam o seu comportamento na água e os tornam relativamente resistentes ao ataque enzimático e químico (BILIADERIS, 1991).

Tabela 2.2 – Conteúdo médio de amilose de amidos naturais.

Fonte Vegetal	Amilose (%)
Milho ^a	25
Arroz ^a	23
Trigo ^a	15 - 25
Mandioca ^a	16 - 20
Inhame ^b	30
Aveia ^c	16 - 33

^a GARCÍA, 1999.

^b ALVES; GROSSMANN; SILVA, 1999.

^c WANG; WHITE, 1994.

Sob microscopia óptica, os grânulos de amido são diferenciados em camadas claras e escuras. Quando os grânulos de amido são tratados termicamente em meio aquoso as suas camadas ficam distantes. Cerca de dois terços do grânulo de amido não está arranjado de maneira cristalina, ficando evidente que nessas regiões amorfas as moléculas estão parcialmente hidratadas. A separação radial das camadas após tratamento térmico ou ácido mostra que, primeiro são degradadas as camadas escuras, pois são amorfas, não-birrefringentes (FRANCO et al., 2002).

Mishra e Raí (2006) estudaram a morfologia dos amidos de milho, mandioca e batata, constatando que os grânulos do amido de milho e de mandioca são do formato poliedro, com tamanho de (3,6 a 14,3) μm e (7,1 a 25) μm , respectivamente, e o grânulo do amido de batata é elipsóide, com (14,3 a 53,6) μm . Essa variação do tamanho e do formato é devida a sua origem biológica.

2.3.2 Amido termoplástico

Para obter um material termoplástico à base de amido, sua estrutura granular semicristalina precisa ser destruída para dar origem a uma matriz polimérica homogênea e essencialmente amorfa (SOUZA; ANDRADE, 2000; LIU, 2005). Os grânulos de amido apresentam birrefringência (índice de refração no cristal) quando observados em microscópio óptico sob luz polarizada, o que indica certo grau de organização molecular. A parte linear das moléculas de amilopectina forma estruturas helicoidais duplas, estabilizadas por pontes de hidrogênio entre grupamentos hidroxila. São elas que dão origem às regiões cristalinas dos grânulos. A região amorfa é composta pelas cadeias de amilose e pelas ramificações da amilopectina (RIBEIRO; SERAVALLI, 2004).

Segundo Zobel (1964), as regiões cristalinas dos grânulos de amido proporcionam padrões específicos de difração de raios X, definidos com base nos espaços interplanares e na intensidade relativa das linhas de difração, que variam de acordo com a fonte botânica do grânulo.

Os fenômenos que possibilitam a destruição da organização dos grânulos de amido são a gelatinização e a fusão.

A gelatinização é a transformação do amido granular em pasta viscoelástica, fenômeno que acontece durante o aquecimento de dispersões de amido em

presença de excesso de água, na qual ocorrem mudanças irreversíveis nas suas propriedades.

Durante esse aquecimento, as moléculas de amido começam a vibrar mais intensamente, quebram-se as pontes de hidrogênio intermoleculares, permitindo assim que a água penetre nas micelas (zonas cristalinas). O aquecimento contínuo na presença de uma quantidade abundante de água resulta em perda total das zonas cristalinas, a birrefringência desaparece e o amido se torna transparente. A temperatura na qual a birrefringência desaparece é denominada de *temperatura de gelatinização*.

A gelatinização ocorre primeiramente nas regiões amorfas do grânulo. Sob aquecimento contínuo à mesma temperatura, eventualmente, todas as regiões amorfas são desestabilizadas e as regiões cristalinas começam a gelatinizar. Grânulos menores gelatinizam primeiro seguido pelos maiores, evento conhecido como *faixa de temperatura de gelatinização*. Durante a gelatinização, o grão incha muito e a viscosidade da suspensão aumenta, formando uma pasta, até um valor máximo de viscosidade. O posterior aquecimento, além da temperatura de gelatinização, quando a viscosidade é máxima, resulta em degradação da estrutura do amido (MALI; GROSSMANN; YAMASHITA, 2010; RIBEIRO; SERAVALLI, 2004; SOUZA, 2011). Quando a temperatura é suficientemente elevada, ambas as regiões, amorfas e cristalinas, são gelatinizadas. Assim, as regiões amorfas podem ser interpretadas como promotoras de gelatinização das regiões cristalinas do grânulo (FRANCO et al., 2002).

Por outro lado, quando o amido é aquecido em presença de pequenas quantidades de água, o fenômeno que indica o rompimento de seus grânulos é conhecido como *fusão* e exige temperaturas superiores à de gelatinização. Este processo baseia-se nas propriedades termoplásticas de alguns biopolímeros em condições de baixo conteúdo de umidade, e tem sido aplicado por usar tecnologia comum de processo de fusão, como a extrusão (FRITZ et al., 1994; RIBEIRO; SERAVALLI, 2004).

Posteriormente à gelatinização, as moléculas de amido podem iniciar a re-associação também via ligações de hidrogênio, favorecendo a formação de uma estrutura mais ordenada, que, sob condições favoráveis, pode formar uma estrutura novamente cristalina. Este conjunto de alterações recebe o nome de retrogradação ou recristalização (ZOBEL, 1964; VAN SOEST et al., 1996).

A retrogradação é um fenômeno decorrente da reaproximação das moléculas, ocasionado pela redução da temperatura durante o resfriamento do gel, com formação de pontes de hidrogênio intermoleculares e com a consequente formação de zonas cristalinas e expulsão da água existente entre as moléculas (sinérese) (RIBEIRO; SERAVALLI, 2004; VAN SOEST et al., 1996). A retrogradação resulta em redução de volume, aumento da firmeza do gel e sinérese. Em função de sua estrutura linear, as moléculas de amilose se aproximam mais facilmente e são as principais responsáveis pela ocorrência do fenômeno, enquanto na amilopectina o fenômeno parece ocorrer somente na periferia da sua molécula (MALI; GROSSMANN; YAMASHITA, 2010; RIBEIRO; SERAVALLI, 2004).

A recristalização é o mais importante fenômeno que leva ao envelhecimento dos filmes de amido, tornando-os mais rígidos e, ao mesmo tempo, quebradiços (MALI; GROSSMANN; YAMASHITA, 2010).

2.3.3 *Plastificação do amido*

Devido ao fato dos filmes elaborados somente com amido serem pouco flexíveis e quebradiços, é necessária a introdução de aditivos às matrizes poliméricas. O uso de plastificantes em filmes com base de amido tem mostrado resultados satisfatórios na solução da sua rigidez (SHIMAZU; MALI; GROSSMANN, 2007). Segundo a IUPAC, “plastificantes são substâncias incorporadas a plásticos ou elastômeros com a finalidade de aumentar sua flexibilidade, processabilidade ou capacidade de alongamento”. Um plastificante pode reduzir a viscosidade do fundido, abaixar sua temperatura de transição vítrea e diminuir seu módulo de elasticidade (FORINI, 2008).

Os plastificantes mais utilizados em filmes de amido são os polióis, como o glicerol e o sorbitol, os quais têm mostrado uma melhoria nas propriedades mecânicas quando incorporados na matriz polimérica (FAMÁ et al., 2006, FAMÁ; GOYANES; GERSCHENSON, 2007; MALI; GROSSMANN; YAMASHITA, 2010; SOUZA, 2011). A sua incorporação resultou em filmes com maior alongação, melhor flexibilidade e extensibilidade e menor resistência à tração (PARRA et al., 2004; RODRÍGUEZ et al., 2006; VEIGA-SANTOS et al., 2005).

O mecanismo de ação das moléculas do plastificante envolve a diminuição das forças de Van der Waals que atuam entre as cadeias poliméricas diminuindo a

atração intermolecular e, portanto, aumentando a flexibilidade da cadeia polimérica provocando interferências nas condições de processamento e propriedades do produto final (FORINI, 2008).

Segundo a *International Union of Pure and Applied Chemistry* (IUPAC) o glicerol ou propano-1,2,3-triol é um composto orgânico pertencente à função álcool ligado a ácidos graxos tais como ácido esteárico, palmítico e láurico para formar a molécula de triacilglicerol. É líquido à temperatura ambiente (25 °C), higroscópico, inodoro, viscoso e de sabor adocicado. O termo glicerina refere-se ao produto na forma comercial, com pureza acima de 95 %. Por ser o glicerol uma molécula hidrofílica relativamente pequena, pode ser introduzida entre as cadeias poliméricas adjacentes, resultando em decréscimo da atração intermolecular e, portanto em aumento da mobilidade molecular (ALVES et al., 2007).

O glicerol age então como um plastificante bastante efetivo, pois apresenta uma menor capacidade de interação com as moléculas de amido, dando maior mobilidade às cadeias da matriz polimérica devido ao fato de que na sua estrutura química existem três carbonos ligados a três hidroxilas e tem baixo peso molecular (SHIMAZU; MALI; GROSSMANN, 2007). Além do glicerol ter mostrado bom poder plastificante, seu uso também é justificado pela grande quantidade na qual está sendo produzido ao ser um subproduto da produção do biodiesel, o que contribui para seu baixo custo.

Cabe salientar, que o Brasil está entre os maiores produtores e consumidores de biodiesel do mundo, com uma produção anual em 2010 de 2,4 bilhões de litros, segundo a Agência Nacional Brasileira do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis (ANP, 2011). Para cada 90.000 L de biodiesel produzidos por transesterificação são gerados, aproximadamente, 10.000 L de glicerol (MOTA; SILVA; GONÇALVES, 2009).

Assim, as projeções mostram uma produção de cerca de 100 mil toneladas de glicerol por ano com a entrada do B3 (3 % de biodiesel adicionado ao diesel fóssil) em 2008 e cerca de 250 mil toneladas a cada ano, a partir de 2013, com a introdução do B5 (5 % de biodiesel adicionado ao diesel fóssil). Este cenário indica que a viabilização comercial do biodiesel passa pelo consumo deste volume extra de glicerol, buscando aplicações de larga escala e agregando valor à cadeia produtiva (MOTA; SILVA; GONÇALVES, 2009).

Os plastificantes também promovem outras alterações, por causa de algumas modificações estruturais ocorridas na rede do amido, como a diminuição das forças intermoleculares entre cadeias poliméricas adjacentes (MALI et al., 2006), resultando em uma matriz filmogênica menos densa que facilita o movimento das cadeias de polímeros sob estresse, o que leva a um aumento do alongamento e também a uma diminuição na resistência à tração, aumentando com o conteúdo do plastificante (SOUZA; DITCHFIELD; TADINI, 2010; SOUZA, 2011). Além disso, a redução das forças intermoleculares e o caráter hidrofílico do plastificante facilitam a migração de moléculas de vapor d'água e, portanto, os valores de permeabilidade são maiores para os filmes plastificados.

Além disso, devido ao enfraquecimento da força das interações macromoleculares, aumenta a mobilidade das cadeias dos polímeros, com diminuição de possíveis descontinuidades e zonas quebradiças, resultando assim em materiais com menores temperaturas de transição vítrea (T_g) (MALI; GROSSMANN; YAMASHITA, 2010; SOUZA; DITCHFIELD; TADINI, 2010; SOUZA, 2011; TALJA et al. 2007).

No entanto, a quantidade de glicerol adicionado à matriz polimérica deve receber especial atenção, devido ao fato que baixas concentrações de plastificante (abaixo de 20 g/100 g de amido), podem causar efeito contrário ao desejado, de modo que o plastificante interage com a matriz polimérica, mas não em quantidade suficiente para aumentar a mobilidade molecular (SHIMAZU; MALI; GROSSMANN, 2007; SOUZA, 2011), provocando assim uma diminuição na flexibilidade e hidrofiliidade dos filmes, ou seja, um efeito antiplastificante (LOURDIN; BIZOT; COLONNA, 1996; SHIMAZU; MALI; GROSSMANN, 2007).

Para diminuir o efeito do plastificante sobre a permeabilidade ao vapor água elevada dos filmes à base de amido e também melhorar as suas propriedades mecânicas e térmicas, a produção de biocompósitos argila/amido de diferentes tipos de argilas, demonstraram ser uma opção promissora em pesquisas anteriores (AVÉROUS; BOQUILLON, 2004; SOUZA, 2011; TANG; ALAVI; HERALD, 2008).

2.4 Nanocompósitos

O compósito é definido como um material formado por dois ou mais componentes diferentes, em que pelo menos um desses tenha permanecido no estado sólido durante o processamento (SEAVEY et al., 2001) e que ofereça combinações de rigidez e resistência difíceis de atingir separadamente a partir dos componentes individuais (GIANNELIS, 1996).

O nanocompósito é um material híbrido que constitui uma classe de materiais compósitos, em que um agente de reforço (nanocarga) é disperso em nível nanométrico (10^{-9} m) em uma matriz (ALEXANDRE; DUBOIS, 2000). Os componentes de um nanocompósito podem ser de natureza inorgânica/inorgânica, inorgânica/orgânica ou orgânica/orgânica (GRASSMAN; MÜLLER; LÖBMAN, 2002).

As mudanças das propriedades dos nanocompósitos de matriz polimérica estão relacionadas com o nível de dispersão das nanopartículas e com a interação química específica entre as cargas e o polímero (SOUZA, 2011). Por causa das dimensões nanométricas, essas interações podem influenciar a dinâmica molecular do polímero resultando em alterações significativas nas suas propriedades físicas, como o comportamento térmico e/ou mecânico (GILMAN et al., 2000).

Entre as cargas ou preenchedores mais comuns em nanocompósitos de matriz polimérica, encontram-se os carbonatos, os sulfatos, os alumino-silicatos e alguns óxidos metálicos (FORINI, 2008). Os nanocompósitos biodegradáveis, também chamados de nanobiocompósitos, consistem em nanopartículas dispersas em matrizes de polímeros biodegradáveis (AVÉROUS; BOQUILLON, 2004). Nos nanocompósitos, devido ao grau de dispersão das partículas das cargas, efeitos sinérgicos sobre as propriedades mecânicas, térmicas e de barreira são obtidos.

Nanocompósitos poliméricos estão sendo empregados principalmente na área de embalagens e indústrias automotivas, mas também encontram aplicações em outras áreas como aeroespaciais, eletrônicas e em aplicações biotecnológicas (GORRASI et al., 2003; SCHMIDT; SHAH; GIANNELIS, 2002).

Na área de embalagens a aplicação de nanocompósitos visa à melhoria das propriedades de barreira a gases para filmes e embalagens rígidas, representando uma oportunidade promissora para a indústria de embalagens alimentícias (KRISHNAMOORTI; YUREKLI, 2000).

Amido termoplástico reforçado por argila tem sido pesquisado devido ao potencial indiscutível das argilas em melhorar as propriedades mecânicas e de barreira de filmes (FORINI, 2008; PARK et al., 2002; SOUZA, 2011).

2.4.1 Argila

As argilas são empregadas pela humanidade desde a antiguidade nas mais variadas aplicações, na produção de utensílios domésticos e adornos de barro (SANTOS; SANTOS, 1992). São elementos componentes de uma grande parte de solos, e podem ser encontradas no estado puro em depósitos minerais, em seu ambiente de formação e em ambientes naturais (CALLISTER, 2002).

As argilas são responsáveis por uma série de processos naturais, agindo como catalisadores, como por exemplo, em transformações químicas em solos e formação do petróleo (GUERRA et al. 2008).

De modo geral, o termo argilas refere-se às partículas do solo que possuem diâmetro inferior a 2 μm , e das quais podem fazer parte diferentes tipos de minerais: silicatos lamelares de magnésio e de alumínio (filossilicatos), quartzo, feldspato, carbonatos, óxidos metálicos e até mesmo matéria orgânica (LUNA; SCHUCHARDT, 1999).

As composições químicas e mineralógicas, a granulometria, a capacidade de troca de cátions, a área superficial específica, os sais solúveis e a quantidade de matéria orgânica são as principais propriedades primárias das argilas cerâmicas (Biondiv et al., 2000). São comumente definidas como materiais naturais, terrosos, de granulação fina que, quando umedecidos com água apresentam certa plasticidade (SANTOS, 1975).

Segundo Gomes (1988), os argilominerais são silicatos de Al, Fe, Mg hidratados, com estruturas cristalinas em camadas (filossilicatos) por folhas contínuas de tetraedros de SiO_4 , ordenados de forma hexagonal, condensados com folhas octaédricas de hidróxidos de metais tri- e bivalentes.

Os argilominerais fazem parte da composição mineralógica dos solos, e são designados como minerais secundários, que ocorrem quando há modificações das rochas causadas pelo intemperismo. Com isso, adquirem a capacidade de trocar íons, ou seja, têm íons fixados na superfície, entre as camadas e dentro dos canais do retículo cristalino. Esta capacidade de troca catiônica surge em função do

potencial elevado das argilas de reagirem com cátions presentes em soluções por apresentarem cargas negativas em sua superfície externa (LUNA; SCHUCHARDT, 1999).

Argilominerais são tecnologicamente importantes; são compostos formados principalmente de aluminossilicatos hidratados com camadas carregadas neutra ou negativamente (WILHELM et al., 2003). Na literatura, encontram-se resultados interessantes em relação ao uso de diferentes tipos de argilas para incorporação como nanocargas em filmes biodegradáveis a base de amido. Os nanocompósitos argila/amido estudados demonstraram uma melhoria nas propriedades mecânicas, térmicas e de barreira (CYRAS et al., 2008; TANG et al., 2008).

Além da argila ser um potente material de preenchimento, é um mineral abundante na natureza, atóxico e pode ser usado como um dos componentes para alimentos, produtos médicos, cosméticos e cuidados da saúde (CHEN; EVANS, 2005).

Os minerais de argila ou argilominerais são classificados em grupos com base nas semelhanças da estrutura cristalina e da composição química. Os tipos de cargas que mais têm sido pesquisadas são as argilas e os silicatos lamelares, entre os quais se destaca a argila montmorilonita (MMT) por causa de suas propriedades tecnológicas e amplas possibilidades de aplicações industriais, devido à sua versatilidade, disponibilidade (CHIVRAC et al., 2010; FORINI, 2008), facilidade de intercalação e tamanho de sua partícula (WILHELM et al., 2003).

Os argilominerais esmectíticos (antigo grupo das montmorilonitas - MMT) possuem suas camadas constituídas por lâminas de duas folhas tetraédricas de silício (Si) e uma folha central octaédrica de alumínio (Al), unidas entre si por átomos de oxigênio comuns às folhas, empilhadas umas sobre as outras, com maior ou menor ordem dependendo do seu tipo. A espessura entre as camadas varia com a natureza do cátion interlamelar (ALBANEZ, 2008).

2.4.2 Nanocompósitos polímero/argila

Geralmente, quando a argila é dispersa na matriz polimérica, três principais tipos de estruturas podem ser obtidos, como representado na Figura 2.5. Essas estruturas são dependentes da natureza dos componentes usados em sua obtenção (camadas de silicato, cátions orgânicos e matriz polimérica).

A estrutura de fase separada (microcompósito) ocorre quando as cadeias poliméricas não intercalam as camadas de argila levando à obtenção de uma estrutura de propriedades similares às de um compósito convencional. O polímero apenas envolve as estruturas sem conseguir ficar entre as lamelas do silicato. Essas estruturas não são consideradas nanométricas, pois a não intercalação do polímero nas camadas dos silicatos dá origem a estruturas de dimensões micrométricas.

A estrutura intercalada, que acontece quando o polímero consegue ficar entre as camadas lamelares dos silicatos, formando uma estrutura multicamada bem ordenada, com aumento dos espaçamentos basais das camadas estruturais da argila, entretanto, a morfologia das argilas não se altera. Essa estrutura apresenta propriedades superiores à de um compósito convencional.

A estrutura esfoliada acontece quando a argila é completa e uniformemente dispersa em uma matriz polimérica, maximiza as interações polímero/argila e leva a significativas melhorias nas propriedades físicas e mecânicas do material (LEE; CHEN; HANNA, 2008).

Figura 2.5 – Representação das diferentes estruturas de nanocompósitos polímero/argila (adaptado de BEYER, 2002).

Atualmente, são conhecidos vários métodos de preparação de nanocompósitos polímero/argila. No método de delaminação com solvente, a argila e o polímero são dissolvidos em um solvente apropriado (neste caso, a água), agitando-se a solução, e assim, as camadas lamelares são delaminadas devido às suas forças fracas de adesão. O polímero então é adsorvido dentro das camadas

delaminadas e quando o solvente é evaporado, as camadas se reorganizam, resultando na intercalação polímero/silicato, formando o nanocompósito (FORINI, 2008; SOUZA, 2011).

Os nanocompósitos argila/amido estudados demonstraram uma melhoria nas propriedades mecânicas (força máxima de ruptura e módulo de Young), térmicas e de barreira (AVELLA et al. 2005; CYRAS et al. 2008; TANG. et al., 2008). Assim como os plastificantes interagem com o amido, supõe-se que eles também desempenhem uma função importante junto às nanopartículas de argila, afetando a formação da nanoestrutura e as propriedades mecânicas e de barreira de biofilmes nanocompósitos a base de amido e argila.

Com a redução do teor de plastificante, facilitam-se as interações entre as cadeias de amido e as camadas de silicato de argila, permitindo que o plastificante e o amido difundam juntos dentro das camadas de silicato (o plastificante forma pontes de hidrogênio com o amido, substituindo as fortes interações entre os grupos hidroxila das moléculas de amido) (TANG et al., 2008), ocorrendo um aumento do grau de esfoliação das nanopartículas de argila, o que contribui para melhorar as propriedades de barreira das películas.

O alto conteúdo de plastificante incorporado à formulação dos filmes biodegradáveis inibe o processo de esfoliação porque um aumento das interações plastificante-amido compete com as interações plastificante-amido-argila (CHIOU et al., 2007).

2.5 Embalagens inteligentes

A função primária de toda embalagem é proteger o conteúdo de alimentos contra danos físicos, ganho ou perda de umidade, oxidação e deterioração biológica. A função secundária é a de facilitar a distribuição do produto para o consumidor (SIDE, 2002). A embalagem também favorece o marketing eficaz dos alimentos através de canais de distribuição e venda.

Desde o início do século XIX, embalagens de alimentos modernas têm sofrido grandes avanços como resultado das tendências globais e das preferências dos consumidores por qualidade e conveniência. Embalagens de alimentos exigem também uma vida de prateleira mais longa juntamente com o monitoramento da sua

qualidade (DAINELLI et al., 2008; LÓPEZ-RUBIO et al., 2004; ROONEY, 1995; SILVESTRE; DURACCIO; CIMMINO, 2011).

Assim, surgem as *embalagens ativas* e as *inteligentes*. Embalagens ativas interagem com o alimento ou modificam a atmosfera interna à qual o produto está exposto ajudando na sua preservação (DAINELLI et al., 2008; LABUZA; BREENE, 1989).

Embalagens inteligentes são aquelas que, além de proteger, reagem de alguma forma às mudanças em algumas das propriedades do alimento embalado, ou do ambiente no qual este está exposto, em virtude da incorporação de indicadores ou sensores que produzem um sinal como resposta a qualquer alteração das condições iniciais da embalagem, dando informações ao fabricante e ao consumidor sobre o estado dessas propriedades e, portanto, da qualidade dos alimentos embalados (DAINELLI et al., 2008; HAN; HO; RODRIGUES, 2005; KERRY; O'GRADY; HOGAN, 2006; SUMMERS, 1992).

Assim, embalagens inteligentes "fazem mais do que apenas proteger o produto respondendo em tempo real às suas mudanças" (ROONEY, 1995). Embora diferente do conceito de embalagens ativas, características de embalagens inteligentes podem ser utilizadas para verificar a eficácia e a integridade dos sistemas de embalagens ativas (HUTTON, 2003; SOUZA; DITCHFIELD; TADINI, 2010; SOUZA, 2011).

As embalagens tornaram-se elementos essenciais para a comercialização de alimentos, uma vez que a distribuição de produtos no mercado exige muitas vezes que o mesmo percorra longas distâncias até seu destino final. Durante o período de tempo entre a embalagem do produto e o consumo do mesmo, alterações ou danos indesejáveis podem modificar sua qualidade de forma irreversível (LÓPEZ-RUBIO et al., 2004; SOUZA, 2011; STRATHMANN et al., 2005).

Dispositivos de embalagens inteligentes podem ser um componente integral ou uma propriedade inerente da embalagem, os quais podem ser usados para monitorar um grande número de atributos dos alimentos embalados (KERRY; O'GRADY; HOGAN, 2006).

Os sistemas de embalagens inteligentes utilizam sensores ou indicadores, os quais são baseados na taxa de polimerização, difusão, reações químicas ou enzimáticas, para uma variedade de medições incluindo fluorescência baseada na detecção de oxigênio gasoso, monitoramento da temperatura, por meio de

indicadores tempo-temperatura, compostos tóxicos, indicadores de maturação, integridade da embalagem, frescor via monitoramento de componentes específicos, e identificação do produto por rádio frequência e biossensores (DE KRUIJF et al., 2002; KERRY; O'GRADY; HOGAN, 2006; POTTER; CAMPBELL; CAVA, 2008; ZHOU; XU; LIU, 2010), como resumido na Tabela 2.3.

Tabela 2.3 – Exemplos de indicadores externos e internos e seus princípios de funcionamento utilizados em embalagens inteligentes^a.

Técnica	Princípio / reagentes	Informação fornecida	Aplicação
Indicadores de tempo – temperatura (externos)	Mecânico, químico, enzimático	Condições de armazenamento	Alimentos armazenados sob condições de refrigeração ou congelamento
Indicadores de oxigênio (interno)	Corantes indicadores redox, corantes indicadores de pH, enzimas	Condições de armazenamento Vazamento da embalagem	Alimentos armazenados em embalagens com concentração de oxigênio reduzido
Indicador de dióxido de carbono	Químico	Condições de armazenamento Vazamento da embalagem	Embalagem de alimentos com atmosfera controlada ou modificada
Indicadores de crescimento microbiano (interno / externo) e indicadores de frescor	Corantes indicadores de pH, todo tipo de corantes indicadores com certos metabólitos	Qualidade microbiana dos alimentos (ex. deterioração)	Alimentos perecíveis como carne, peixe e aves.
Indicadores patogênicos (internos)	Diversos métodos químicos e imunoquímicos reagentes com toxinas	Bactéria patogênica específica como a <i>Escherichia coli</i> O157: H7	Alimentos perecíveis como carne, peixe e aves.

^a Adaptado de OHLSSON; BENGTTSSON, 2002.

Fatores essenciais para a aplicação extensiva de embalagens inteligentes são: o custo, a robustez e a compatibilidade com os diferentes materiais de embalagem. Para estes sistemas de embalagem ser práticos, eles devem ser fáceis de usar, eficazes e ter bom custo-benefício.

A data de validade dos alimentos é estimada pelas indústrias considerando condições de distribuição e armazenamento (especialmente temperatura) para a

qual o produto alimentar está previsto ser submetido. No entanto, sabe-se que tais condições nem sempre são as reais, e os alimentos são frequentemente expostos às variações de temperatura; isto é particularmente preocupante para os produtos que requerem cadeia de frio.

Indicadores tempo-temperatura foram inicialmente utilizados em alguns produtos alimentares no final do século XX, permitindo aos fornecedores confirmar se os alimentos foram mantidos em temperatura adequada (TAOUKIS; LABUZA, 1989). Eles se dividem em duas categorias: a primeira baseia-se na migração de um corante através de um material poroso, que é dependente da temperatura e do tempo; a segunda faz uso de uma reação química (iniciada quando a etiqueta é aplicada sobre a embalagem) que resulta em uma mudança de cor.

Estes indicadores permitem aos consumidores se sentir confiantes sobre o produto a ser comprado. Além disso, verificando como os alimentos se movimentam através da cadeia de abastecimento, empresas podem identificar e abordar os seus pontos de debilidade nesta cadeia.

Microporos e defeitos de vedação em sistemas de embalagem podem levar produtos alimentares para uma inesperada exposição alta ao oxigênio, o que pode resultar em indesejáveis mudanças.

Devido que o oxigênio permite a multiplicação dos micro-organismos aeróbios durante o armazenamento dos alimentos, ocorre um interesse crescente em desenvolver sensores de oxigênio não-tóxicos e irreversíveis para garantir a ausência de oxigênio em sistemas de embalagem de alimentos sob vácuo ou nitrogênio.

Lee et al. (2002) desenvolveram um indicador de oxigênio colorimétrico UV-ativado que usa nanopartículas de TiO_2 , para fotossintetizar a redução do corante azul de metileno por trietanolamina em um meio de encapsulamento do polímero, utilizando-se luz UVA. Após a irradiação UV, os branqueadores de sensores permanecem incolores, até que são expostos ao oxigênio, onde é restaurada a sua cor azul original. A taxa de recuperação de cor é proporcional ao nível de exposição ao oxigênio.

Mills e Hazafy (2009) utilizaram SnO_2 nanocristalinos como um fotossensibilizador em um indicador de O_2 colorimétrico com a cor do filme dependendo da exposição ao O_2 . Recentemente, também foram introduzidos

indicadores de pH baseados em nanopartículas de silicato modificados organicamente (JURMANOVIĆ et al., 2010).

Os indicadores de frescor monitoram a qualidade dos alimentos embalados reagindo a mudanças que ocorrem no produto alimentar fresco como resultado do crescimento microbiológico.

Conforme relatado por Smolander (2004) sobre os indicadores de frescor para embalagens de alimentos, um pré-requisito crucial para o sucesso no desenvolvimento deste tipo de indicadores é o conhecimento dos metabólitos indicadores de qualidade, que podem ser compostos voláteis, por exemplo, produtos voláteis de origem microbiana, tais como dióxido de carbono, compostos nitrogenados, aminas biogênicas, toxinas, bem como bactérias patogênicas em si.

Bodenhamer (2000) patenteou um sistema baseado no depósito sobre o código de barras, de uma camada de plástico carregada com anticorpos específicos de micro-organismos patogênicos, tais como *Salmonella* ou *Listeria*, cuja presença pode ser detectada na leitura do código de barras.

Apesar de existir uma pesquisa ativa nesta área, as aplicações comerciais de sistemas inteligentes têm sido principalmente limitadas ao uso de indicadores visuais de tempo-temperatura e indicadores de oxigênio, como mostrado na Tabela 2.4.

Tabela 2.4 – Indicadores de cor, seus fabricantes e nomes comerciais^a.

Fabricante	País	Nome comercial
<i>Indicadores de tempo-temperatura</i>		
Lifelines Technology Inc.	Estados Unidos de America	Fresh-Check
Trigon Smartpak Ltd	Reino Unido	Smartpack
3M Packaging Systems Division	Estados Unidos de America	MonitorMark
Visual Indicator Tag Systems	Suécia	Vitsab
<i>Indicadores de oxigênio</i>		
Mitsubishi Gas Chemical Co., Ltd	Japão	Angeles Eye
Toppan Printing Co., Ltd	Japão	-
Toagosei Chem. Industry Co., Ltd	Japão	-
Finetec Co., Ltd	Japão	-

^a Adaptado de OHLSSON; BENGTTSSON, 2002.

As razões para isso podem ser o custo alto de um rótulo indicador, restrições legislativas e até mesmo a aceitação de varejistas e proprietários de marcas. O medo pode ser que os indicadores revelem possíveis irregularidades ocorridas, por exemplo, na gestão ou no controle da cadeia de frio.

As questões de inocuidade são, principalmente, a partir dos indicadores necessariamente colocados no interior da embalagem primária, seja para o contato direto com a atmosfera circundante do alimento ou com o alimento em si, por causa do potencial de migração indesejável de componentes químicos sintéticos aos alimentos.

Os estudos que envolvem embalagens inteligentes, na sua grande maioria, já estão patenteados. Muitas pesquisas têm sido empreendidas em uma ampla gama de disciplinas, sendo que a grande maioria de embalagens inteligentes indicadoras de frescor de alimentos utiliza corantes químicos sintéticos e está relacionada à aplicação em polímeros derivados do petróleo (HOGAN, 2006; KERRY; O'GRADY; SOUZA; DITCHFIELD; TADINI, 2010; VEIGA-SANTOS; DITCHFIELD; TADINI, 2011; ZHOU; XU; LIU, 2010).

Devido à deterioração dos alimentos geralmente estar acompanhada por uma mudança do pH e, à inviabilidade do consumidor detectar e conhecer qual o pH adequado de um alimento, um sistema de embalagem que muda de cor com a alteração do pH do alimento embalado poderia permitir ao consumidor avaliar seu frescor e qualidade, sem a necessidade de abrir a embalagem, no próprio local de compra (CHEN et al., 2004; KERRY; O'GRADY; HOGAN, 2006; VEIGA-SANTOS; DITCHFIELD; TADINI, 2011).

2.5.1 Indicadores de frescor e pH

Um indicador pode ser definido como uma substância que indica a presença ou ausência de outra substância ou o grau de reação entre duas ou mais substâncias por meio de uma mudança característica, especialmente cor. Em contraste com os sensores, os indicadores não incluem componentes do receptor e transdutor e transmitem informações através da mudança visual direta (KERRY; O'GRADY; HOGAN, 2006; ROSS, 1989).

Indicadores de frescor são utilizados para indicar se a qualidade do produto foi prejudicada devido à exposição a condições desfavoráveis durante o armazenamento e/ou transporte (SUMMERS, 1992). Dessa forma, a embalagem é geralmente equipada com um dispositivo de mudança de cor reversível que comunica aos consumidores o frescor do produto embalado (AHVENAINEN; HURME, 1997).

Indicadores visuais são substâncias capazes de mudar de cor dependendo das características físico-químicas do meio no qual estão contidas, em função de diversos fatores, tais como pH, potencial elétrico, complexação com íons metálicos e adsorção em sólidos. Podem ser classificados de acordo com o mecanismo de mudança de cor ou os tipos de titulação nos quais são aplicados (ROSS, 1989).

Entre os indicadores visuais, encontram-se os indicadores de pH, também chamados indicadores ácido-base, os quais são substâncias orgânicas fracamente ácidas ou fracamente básicas que apresentam cores diferentes para suas formas protonadas e desprotonadas (BÁNYAI, 1972; BACCAN et al., 1979). Quando adicionados a uma solução, os indicadores de pH ligam-se aos íons H^+ ou OH^- . A ligação a estes íons provoca uma alteração da configuração eletrônica destes indicadores e, conseqüentemente, altera-lhes a cor (BÁNYAI, 1972). Estes corantes são dotados de propriedades halocrômicas, que é a capacidade de mudar de coloração em função do pH do meio (BÁNYAI, 1972; BACCAN et al., 1979).

O uso de indicadores de pH é uma prática bem antiga que foi introduzida por Robert Boyle (BOYLE, 1963¹ apud TERCI; ROSSI, 2002), que conseguiu os primeiros indicadores de pH em solução e papel. Boyle preparou um licor de violeta e observou que o extrato desta flor tornava-se vermelho em solução ácida e verde em solução básica. Gotejando o licor de violeta sobre um papel branco e, em seguida, algumas gotas de vinagre, observou que o papel tornava-se vermelho.

Após anos de estudos foi verificado que extratos de determinadas flores em contato com soluções ácidas e básicas mudavam de cor. No início do século XX, as antocianinas foram relacionadas como sendo os pigmentos responsáveis pela coloração de diversas flores e que seus extratos apresentavam cores que variavam em função da acidez ou alcalinidade do meio. As mudanças estruturais das antocianinas que ocorrem com a variação do pH, são responsáveis pelo aparecimento das espécies com colorações diferentes, permitindo assim que estes pigmentos sejam utilizados como indicadores naturais de pH (TERCI; ROSSI, 2002).

¹ BOYLE, R. Experiments upon Colors, London v. 2, 1663.

Entre os tipos de “embalagens inteligentes”, os indicadores de pH, que relatam a correlação entre o produto embalado e seu pH ao longo do período de armazenamento têm grande importância, especialmente, na indústria alimentar, na qual vem sendo utilizados como indicadores de frescor nos alimentos (HAN; HO; RODRIGUES, 2005; SOUZA; DITCHFIELD; TADINI, 2010; VEIGA-SANTOS; DITCHFIELD; TADINI, 2011).

Deste modo, o uso de indicadores de pH apresenta uma segurança adicional para os fabricantes e consumidores, pois podem detectar a deterioração do produto ainda dentro do prazo de validade. Também podem ser utilizados para minimizar as perdas, pois podem indicar se um produto ainda está apto para o consumo mesmo que a data de validade tenha sido atingida (KERRY; O'GRADY; HOGAN, 2006; PACQUIT et al., 2006; SOUZA; DITCHFIELD; TADINI, 2010; VEIGA-SANTOS; DITCHFIELD; TADINI, 2011).

Entende-se por “alimento deteriorado” um produto que é considerado inaceitável para o consumidor, geralmente causado por micro-organismos deteriorantes, que são os que promovem alterações indesejáveis no alimento como mudanças na coloração, textura e sabor (FRANCO, 1996). As maiores razões para um alimento ser considerado deteriorado são mudanças sensoriais capazes de alterar as características esperadas para o alimento; mudanças químicas como a oxidação de gorduras, escurecimento enzimático, entre outras e, danos físicos (GARBUTT, 1997; MILLER; KROCHTA, 1997).

Cada tipo de produto apresenta uma composição diferente, por isso a microbiota à qual está sujeito e, as possíveis alterações do produto final são distintas. Os micro-organismos presentes competem por nutrientes e normalmente um deles é dominante e promove a alteração indesejável no alimento (GARBUTT, 1997).

A formação de diferentes metabólitos indicadores de frescor nos alimentos é dependente do tipo de produto, às condições de armazenamento e ao sistema de embalagem. Existe uma variedade de metabólitos marcadores associados com os produtos, o desenvolvimento de indicadores de qualidade pode ser baseado nestes metabólitos (KERRY; O'GRADY; HOGAN, 2006). Um exemplo disto são as alterações na concentração de ácidos orgânicos tais como ácido butírico, *L*-ácido láctico e ácido acético durante o armazenamento apresentam potencial como

metabólitos indicadores para numerosos produtos à base de carne (SHU; HAKANSON; MATTIASON, 1993).

Os indicadores de pH encontrados na literatura estão baseados em princípios como: a detecção da variação do pH, devido ao crescimento microbiano (FREADMAN; BEACH, 2003; HUI; FELDMAN, GORHAM, 2002); materiais que adquirem ou perdem sua fluorescência com a variação de pH (TSIEN; MIYAWAKI; LLOPIS, 2003) e a substâncias químicas que mudam de cor com a variação do pH do produto (IGUCHI et al., 2003; PARK et al., 2003). Aminas biogênicas, tais como histamina, putrescina, tiramina e cadaverina têm sido identificadas como indicadores de decomposição de produtos cárneos de origem animal (KANIOU et al., 2001).

Devido à preocupações toxicológicas associadas com estes compostos e à sua falta de impacto na qualidade sensorial, o desenvolvimento de indicadores eficazes de aminas seriam de grande benefício para o consumidor de frutos do mar e de produtos cárneos (KANIOU et al., 2001).

Os sistemas de detecção descritos por Miller, Wilkes e Conte (1999) patenteados como Tecnologia COX "*FreshTag*", são etiquetas indicadoras de cor que consistem de uma pequena etiqueta fixada à face exterior da embalagem. Consiste de um pavio reagente com as aminas voláteis produzidas durante a deterioração de peixe e outros produtos do mar, contido dentro de um *chip* de plástico. Estas aminas entram em contato com o reagente fazendo com que o pavio na etiqueta se torne rosa brilhante.

O dióxido de carbono produzido durante o crescimento microbiano pode, em muitos casos, ser um indicativo de deterioração da qualidade de alimentos. Em produtos cárneos embalados em atmosfera modificada com alta concentração de dióxido de carbono (tipicamente 20 % e 80 %), a indicação de crescimento microbiano por alterações no teor de dióxido de carbono é problemática, embora a aplicação de corantes indicadores de pH possam ser uma alternativa promissora em outros sistemas de embalagem de carne (KERRY; O'GRADY; HOGAN, 2006).

Existem ainda os indicadores de sulfeto de hidrogênio que podem ser utilizados para determinar a qualidade da atmosfera modificada em produtos avícolas embalados. Baseia-se na detecção da mudança de cor da mioglobina causada pela produção de sulfureto de hidrogênio. Durante o processo de envelhecimento de carnes de aves embaladas, o sulfeto de hidrogênio é liberado pelas carnes. O indicador correlaciona à cor da mioglobina, a qual é correlacionada

com a deterioração da qualidade do produto de aves domésticas (cortes de frango fresco embalado) (AHVENAINEN et al., 1997).

Além dos indicadores de sulfeto de hidrogênio, existem também indicadores sensíveis aos metabólitos microbianos. Cameron e Talasila (1995) pesquisaram a detecção de mudanças da respiração no produto embalado, por meio da medição do etanol no espaço livre dos pacotes, utilizando as enzimas álcool oxidase e peroxidase.

Outro exemplo de um indicador de frescor é o sistema sensor de diamina à base de corantes. O diacetil é um metabólito volátil emitido a partir de carne deteriorada por micro-organismos, que pode migrar através da embalagem de carne permeável para reagir com o corante e mudar a cor do indicador (HONEYBOURNE, 1993).

Além dos indicadores dependentes de metabólitos microbianos, existem também outros tipos de indicadores que são baseados em diversos fatores de deterioração dos alimentos. DeCicco e Keeven (1995) descreveram um indicador baseado na mudança de cor de substâncias cromogênicas devido às enzimas produzidas pelas bactérias contaminantes. Este tipo de indicador é adequado para detectar a contaminação em produtos líquidos de cuidado da saúde.

O *Lawrence Berkeley National Laboratory* desenvolveu um material de detecção da enterotoxina de *Escherichia coli* 0157: H7 (QUAN; STEVENS, 1998), composto de moléculas de polidiacetileno *cross-polimerizado* que podem ser incorporadas na embalagem. À medida que a toxina se liga às moléculas, a cor do filme muda de forma permanente do azul para o vermelho (SMOLANDER, 2000).

Indicadores de cor em filmes de náilon ou polietileno foram desenvolvidos para o acondicionamento de Kimchi (produto vegetal fermentado tradicional da Coreia). Os filmes são compostos de hidróxido de cálcio que atua como absorvente de dióxido de carbono, púrpura de bromocresol ou vermelho de metilo como corantes químicos indicadores de pH, e uma mistura de poliuretano e poliéster dissolvidos em solventes orgânicos como um meio de ligação (HONG, 2002). Este é aplicado sobre um filme de náilon e, em seguida, laminado com um filme de polietileno, para formar o indicador impresso. Durante o processo de distribuição, os produtos Kimchi estão sujeitos a fermentação natural. O dióxido de carbono, subproduto da fermentação, torna-se o marcador da maturação do Kimchi, uma vez que a concentração de dióxido de carbono está correlacionada com o pH e a acidez

titulável do produto. A absorção do dióxido de carbono no hidróxido de cálcio altera o pH dos componentes indicadores e, conseqüentemente, mudam a sua cor do corante (HONG, 2002).

O uso de corantes (por exemplo, azul de bromotimol) como indicadores de pH para controlar a formação de dióxido de carbono, devido ao crescimento microbiano é uma das aplicações mais frequentes na indústria de embalagens de alimentos (HAN; HO; RODRIGUES, 2005). O aumento nos níveis de dióxido de carbono pode ser usado para detectar a contaminação microbiana em alguns produtos devido aos corantes indicadores de pH que reagem com a presença deste subproduto. Outros corantes reagentes indicadores de pH incluem o azul de xilenol, púrpura de bromocresol, vermelho de cresol, vermelho de fenol e alizarina. Além do dióxido de carbono, outros metabólitos (tais como SO_2 , NH_4 , aminas voláteis e ácidos orgânicos) têm sido utilizados como moléculas alvo de monitoração para indicadores sensíveis ao pH (AHVENAINEN, 2003).

Cabe salientar, que entre os produtos de origem animal, o pescado é um dos mais susceptíveis ao processo de deterioração, em decorrência dos métodos de captura, ao pH próximo à neutralidade, à elevada atividade de água nos tecidos, ao elevado teor de nutrientes facilmente utilizáveis por micro-organismos, ao teor de lipídios insaturados, à rápida ação destrutiva das enzimas naturalmente presentes nos tecidos, aos inúmeros micro-organismos presentes nas águas e à alta atividade metabólica da microbiota (LEITÃO, 1984).

Compostos voláteis são produzidos como resultado do catabolismo bacteriano dos constituintes dos pescados (aminoácidos) e muitas vezes são utilizados como indicadores de deterioração microbiana, tal como a amônia e outras bases voláteis (FRASER; SUMAR, 1998).

Um sensor de mudança de cor foi relacionado à concentração de aminas, no início da degradação microbiana no espaço livre da embalagem, e também relacionado a mudanças em populações microbianas não-patogênicas de peixes frescos inteiros (*Gadus morhua* e *Merlangius merlangus*). Aminas voláteis, tais como trimetilamina (TMA), amônia (NH_3) e dimetilamina (DMA) conhecidas como Nitrogênio Básico Volátil Total (N-BVT), são as substâncias responsáveis pelo odor e sabor característico de peixes no início de sua degradação microbiana (PACQUIT et al., 2006).

Assim, a pesquisa de embalagens indicadoras de pH é muito promissora e ainda incipiente, especialmente no que se refere a filmes poliméricos biodegradáveis (SOUZA; DITCHFIELD; TADINI, 2010; VEIGA-SANTOS; DITCHFIELD; TADINI, 2011). Entre os indicadores de pH do material embalado baseados em alterações de cor, muito poucas patentes utilizam compostos naturais como as antocianinas.

2.6 Antocianinas

As antocianinas são pigmentos derivados de sais flavílicos, solúveis em água, responsáveis pela ampla gama de cores azul, violeta, vermelho e rosa da maioria de flores e frutos. As mais de 450 tipos de antocianinas que foram isoladas e caracterizadas, também estão presentes em algumas folhas, raízes, bulbos, tubérculos, sementes, caules, cereais e legumes (BRIDLE; TIMBERLAKE, 1997, FREITAS, 2005).

O termo antocianina, derivado das palavras gregas *anthos* (flor) e *kyanos* (azul), foi introduzido em 1835 por Ludwig Clamor Marquart, para designar substâncias azuis extraídas de algumas flores. Atualmente, o termo é empregado para indicar genericamente toda esta família de pigmentos naturais, independentemente da coloração que possam apresentar (SHIBATA; SHIBATA; KASIWAGI, 1919² apud FREITAS, 2005).

Na natureza, as antocianinas encontram-se associadas a moléculas de açúcares; quando livres destes açúcares são denominadas antocianidinas (agliconas) (BRIDLE; TIMBERLAKE, 1997). As antocianinas compõem o maior grupo de pigmentos solúveis em água do reino vegetal e são encontradas em maior quantidade nas angiospermas (BRIDLE; TIMBERLAKE, 1997).

Diferentemente das clorofilas e dos carotenóides, a absorção eletrônica das antocianinas está distribuída por toda a região visível do espectro eletromagnético (400 nm – 700 nm) (BRIDLE; TIMBERLAKE, 1997, FREITAS, 2005).

A infinidade de cores observadas nas antocianinas e antocianidinas é produto de combinações de vários fatores, como o pH local do meio, o número de

² SHIBATA, K.; SHIBATA, Y.; KASIWAGI, I. *J. Am. Chem. Soc.*, v. 41, p. 208-220, 1919.

substituintes, a presença ou não de outras moléculas capazes de estabilizar a cor (“co-pigmentos”), a associação com outros flavonóis, a complexação, a autoassociação e a natureza do microambiente em que a antocianina se encontra (EL HAJJI et al., 1997³ apud FREITAS, 2005).

As funções das antocianinas nas plantas, flores e frutos são de proteção à ação da luz, antioxidantes, possuem mecanismo de defesa e ainda função biológica. As cores vivas e intensas que elas produzem têm um papel importante nos mecanismos reprodutores das plantas, tais como a polinização e a dispersão de sementes (FREITAS, 2005; CASTAÑEDA-OVANDO et al., 2009).

A estrutura química básica das antocianinas é baseada em uma estrutura policíclica de quinze carbonos, mostrada na Figura 2.6.

Figura 2.6 - Estrutura química das antocianinas (LOPEZ; JIMÉNEZ; VARGAS, 2000).

Devido a mudanças nos grupos ligados à sua estrutura fenólica, existe uma enorme diversidade de antocianinas encontradas na natureza, o que confere as diferentes cores que ocorrem em várias frutas, flores e folhas (TERCI; ROSSI, 2002).

As antocianinas podem ser glicosadas por diferentes açúcares nas posições 3, 5 e 7, mas sempre ocorre a glicosilação na posição C-3. Glicose, arabinose, galactose e ramnose são os açúcares mais comuns ligados às antocianinas. Di- e trissacarídeos, formados pela combinação destes quatro monossacarídeos, podem também glicosilar algumas antocianidinas (TIMBERLAKE; BRIDLE, 1975). Em muitos casos, os açúcares são acilados pelos ácidos p-cumárico, cefeico, ferúlico e sinápico (MAZZA; BROUILLARD, 1987).

³ EL HAJJI, H.; DANGLES, O.; FIGUEIREDO, P.; BROUILLARD, R. *Helv. Chim. Acta*, 80, p. 398-413, 1997.

Na Tabela 2.5 são mostradas as estruturas químicas das antocianinas e algumas fontes naturais das mesmas. Nas plantas que fazem parte da alimentação, as antocianinas se encontram difundidas, no mínimo em 27 famílias, 73 gêneros e em uma grande variedade de espécies (BRIDLE; TIMBERLAKE, 1997).

Tabela 2.5 – Estruturas, nomes e fontes na natureza das principais antocianinas (BOBBIO; BOBBIO, 1995).

Estrutura do cátion flavilium	Estrutura do Anel B	Nome	Encontrado em
Pelargonidina	Morango, amora vermelha, bananeira.
	Cianidina	Jabuticaba, figo, cereja, uva, cacau, ameixa, jambolão, amora, repolho roxo.
	Delfinidina	Berinjela, romã e maracujá.
	Malvidina	Uva, feijão.
	Peonidina	Uva, cereja.
	Petunidina	Frutas Diversas, petúlias.

2.6.1 Estabilidade da cor

Os grupos metoxila e hidroxila, além da presença do açúcar e do ácido, têm um efeito importante sobre a cor e a estabilidade das antocianinas.

A antocianina poderá ter diferentes cores, dependendo do pH, da estrutura e da concentração dos pigmentos, da temperatura de armazenamento e, da presença de oxigênio, luz e co-pigmentos (MAZZA; BROUILLARD, 1987).

Com o aumento do número de hidroxilas, a coloração das antocianinas muda de rosa para azul; a presença de grupo metoxila no lugar da hidroxila reverte à tendência anterior (MAZZA; BROUILLARD, 1987).

A presença de um ou mais grupos acila na molécula de antocianina inibe a hidrólise do cátion *flavilium* (vermelho) para formar a base carbitol (incolor), permitindo a formação preferencial da base quinoideal (azul), resultando em pigmentos menos sensíveis às mudanças de pH (ou seja, eles mantêm a coloração em meio levemente acidificado a neutro) (BRIDLE; TIMBERLAKE, 1997).

Dangles, Saito e Brouillard (1993) quantificaram este efeito usando pelargonidina 3-soforosídio-5-glucosídio acilada com ácido cafeico, evidenciando que os valores de pK_n (constante de hidratação), aumentaram com o incremento da acilação, confirmando que os pigmentos tornaram-se mais resistentes à reação de hidratação que leva a formação de carbitol (forma incolor) e portanto, intrinsecamente mais coloridos (para um dado valor de pH).

As antocianinas isoladas são altamente instáveis e muito suscetíveis à degradação (GIUSTI; WROLSTAD, 2003). A sua estabilidade é maior sob condições ácidas, mas pode ocorrer degradação por vários mecanismos, iniciando com perda da cor, seguida do surgimento de coloração amarelada e formação de produtos insolúveis.

2.6.2 Influência do pH

É bem conhecido que as propriedades das antocianinas, incluindo a expressão da cor, são altamente influenciadas pela estrutura da antocianina e o pH (CABRITA, FOSSEN, ANDERSEN, 2000; JACKMAN et al., 1987).

A sensibilidade ao pH é o principal fator limitante no processamento e utilização das antocianinas, afetando a sua cor e a estabilidade química (CABRITA; FOSSEN; ANDERSEN, 2000; MAZZA; BROUILLARD, 1987).

Todas as antocianidinas (agliconas) têm como estrutura básica o íon *flavilium*, o qual é altamente reativo. Atribui-se a essa estrutura seis formas de ressonância, com a maior carga parcial positiva nos carbonos 2 e 4. A estabilidade do cátion é

dependente de reações nos radicais 2 e 4. A presença de um íon oxônio adjacente ao carbono 2 é a razão pela qual as antocianidinas apresentam uma natureza anfótera.

Em meios ácidos, quatro estruturas de antocianinas existem em equilíbrio: o cátion *flavilium*, a base quinoidal, a pseudobase carbinol e a chalcona. O pH do meio exerce um papel muito importante no equilíbrio entre as diferentes formas de antocianinas e, conseqüentemente, na modificação da cor.

Segundo Brouillard e Dubois (1977), em solução aquosa podem existir quatro formas estruturais de antocianinas em equilíbrio: o cátion flavílio (AH^+), a base quinoidal (A), a pseudobase ou carbinol (B) e a chalcona (C). Em condições ácidas (pH inferior a 3), a antocianina existe primariamente na forma de cátio flavílio (AH^+) de cor vermelha intensa. Com o aumento do pH ocorre a rápida perda do próton para produzir as formas quinoidais (A), azuis ou violetas. Em paralelo ocorre a hidratação do cátion flavílio (AH^+), gerando a pseudobase incolor ou carbinol (B) que atinge o equilíbrio lentamente com a chalcona incolor ou amarelo tênue (C). As quantidades relativas de cátion (AH^+), formas quinoidais (A), pseudobase (B) e chalcona (C) na condição de equilíbrio variam conforme o pH e a estrutura da antocianina (IACOBUCCI; SWEENEY, 1983).

As reações $A \rightarrow AH^+$, $AH^+ \rightarrow B$, $B \rightarrow A$, $B \rightarrow C$ são todas endotérmicas, portanto, qualquer aumento de temperatura favorece a forma chalcona (RIBEIRO; SERAVALLI, 2004).

Como exposto, devido à sua grande instabilidade, a molécula de antocianina, pode facilmente sofrer mudanças estruturais com a variação do pH, interagindo com íons H^+ , OH^- e a água. Podem também sofrer alterações de acordo com o meio solvente se prótico ou aprótico, explicadas pelo esquema das principais transformações mostradas na Figura 2.7.

Assim, estudos sobre a estabilidade das antocianinas e a variação de cor com o pH mostram que as alterações na cor desses compostos são mais significativas na região alcalina devido à sua instabilidade (CABRITA; FOSSEN; ANDERSEN, 2000).

Figura 2.7 – Possíveis mudanças estruturais das antocianinas de acordo com o pH (TERCI; ROSSI, 2002).

A estabilização química das antocianinas é o principal foco de estudos recentes, devido às suas aplicações abundantes e potenciais, seus efeitos benéficos e sua utilização como alternativa a corantes artificiais (REIN, 2005).

Indicadores de pH sintéticos como o verde bromocresol, fenolftaleína e vermelho de metila, entre outros podem ser empregados para tais fins, porém, o contato com alimentos e a migração desses compostos no produto são questões particularmente importantes para o uso de indicadores de pH sintéticos e a sua quantidade para utilização é sempre limitada. O emprego de pigmentos sintéticos, muitos dos quais derivados de petróleo têm sido severamente restringidos pelos países desenvolvidos (LOPEZ; JIMÉNEZ; VARGAS, 2000).

Portanto, compostos naturais, tais como os carotenoides (BAMORE et al., 2003) e antocianinas apresentam potencial indicador de pH e devem ser estudados (TERCI; ROSSI, 2002).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

O desenvolvimento do trabalho foi conduzido no Laboratório de Engenharia de Alimentos (LEA), do Departamento de Engenharia Química da Universidade de São Paulo, Brasil.

Inicialmente, foram realizados ensaios preliminares para a elaboração dos filmes biodegradáveis, utilizando na formulação amido de mandioca, glicerol e argila dissolvidos em água destilada e etanol e incorporados com resíduo de produtos da indústria vinícola (fonte de antocianina), proveniente do Estado do Paraná, Brasil, a fim de dar utilidade a um resíduo industrial. Dentre os filmes produzidos, os que apresentaram melhor aparência visual foram caracterizados quanto às suas propriedades mecânicas.

Destes testes preliminares, concluiu-se que o resíduo proveniente da indústria vinícola apresentava condições inadequadas para a elaboração dos filmes com potencial indicador de pH. Salienta-se que já no recebimento do resíduo vinícola se constatava que ele estava inadequado para o uso, devido ao seu alto conteúdo de sólidos em suspensão, de difícil padronização, difícil armazenamento, antocianinas facilmente degradadas e odor forte; este talvez proveniente da fermentação dos açúcares contidos nesse produto. Além disso, provavelmente durante o seu armazenamento ocorreram também mudanças na cor e no aroma devido à redução da concentração de antocianinas monoméricas e formação de pigmentos poliméricos (MALACRIDA; MOTTA, 2005). As reações responsáveis por essas transformações incluem, frequentemente, a condensação direta entre antocianinas e flavonóis e a polimerização das próprias antocianinas (FRANCIA-ARICHA et al., 1997).

Por tal motivo, optou-se por trabalhar com a antocianina comercial em pó, devido a sua grande estabilidade, pureza e alto potencial como indicadora de pH, além de ser independente do efeito sazonal, contrário ao ocorrido com o resíduo vinícola, que é produzido somente nos meses de março e abril (safra).

A utilização de antocianina em pó na elaboração de filmes com potencial indicador de pH foi sugerida por Veiga-Santos, Ditchfield e Tadini (2011) que utilizaram extrato aquoso de uva e espinafre como fonte de antocianina e clorofila,

respectivamente, na formulação de filmes inteligentes. Os autores verificaram ser a antocianina melhor indicadora de pH do que a clorofila.

Inicialmente, realizou-se um balanço de massa baseado no estudo de Malacrida e Motta (2005) e Veiga-Santos, Ditchfield e Tadini (2011), os quais trabalharam com extratos aquosos de uva. A concentração de antocianina foi definida como sendo 0,01 g/ 100 g de solução filmogênica, porém os filmes ficaram muito claros com essa concentração. Dessa forma, a mudança de cor seria apenas perceptível pelo teste de colorimetria. Assim, decidiu-se aumentar a concentração de antocianina para 0,05 e 0,10 g/ 100 g de solução filmogênica.

A primeira etapa do trabalho compreendeu a elaboração de filmes incorporados com duas concentrações de antocianina (0,05 e 0,10) g/ 100 g de solução filmogênica. Os filmes elaborados foram caracterizados quanto às suas propriedades mecânicas, permeabilidade ao vapor de água, espessura e análise de cor.

Posteriormente, foi avaliada sua atividade indicadora de mudança de pH com peixe cru armazenado em temperatura ambiente (26 ± 2) °C e sob refrigeração (4 ± 2) °C. A escolha do peixe foi baseada na alta perecibilidade deste produto, cujas aminas voláteis liberadas no início de sua degradação microbiana conhecidas como Nitrogênio Básico Volátil Total (N-BVT), alcalinizam o meio (PACQUIT et al., 2006). Dessa forma, torna-se um importante alimento a ser estudado com os filmes indicadores de pH, que apresentam boa sensibilidade em pH básico, por conterem antocianinas.

A segunda etapa do trabalho consistiu na incorporação de ácido cítrico anidro na solução filmogênica, com formulações contendo fécula de mandioca, glicerol e nanopartículas de argila dissolvidos em água e etanol, e adicionados com as duas concentrações de antocianina já estabelecidas, diminuindo, assim, o pH da solução filmogênica e deste modo avaliando a influência do pH sobre a matriz polimérica junto com a antocianina.

Os filmes foram caracterizados quanto às suas propriedades mecânicas e de barreira, atividade de água, conteúdo de umidade, espessura e análise de cor. Todos os testes foram realizados em duplicata.

Finalmente, as duas formulações que apresentaram os melhores resultados na análise de cor, isto é, filmes contendo 0,10 g de antocianina/ 100 g de solução filmogênica com pH (2,8 e 4,3), foram usados para testar uma nova metodologia

para a análise da atividade indicadora de mudança de pH do filme, avaliada com peixe cru armazenado em duas condições que simulassem as condições de estocagem do mercado. A avaliação da atividade indicadora de pH foi realizada por meio da análise de mudança de cor do filme correlacionada com o pH do peixe.

3.1 Materiais

Para a formação das matrizes poliméricas dos filmes biodegradáveis utilizou-se como formulação base fécula de mandioca (amilose: 19,7 g/100 g, Cargill Agrícola S.A., Brasil), glicerol P.A. (pureza: 99,5 %, umidade máxima: 0,5 g/100 g, Labsynth Ltda, Brasil), argila montmorilonita sódica proveniente da Patagônia, Argentina (nome comercial: Argel T, usada sem purificação, Bentonit União Nordeste S.A., Brasil) dissolvidos em água destilada e etanol P. A. (pureza: 99,5 %, umidade máxima: 0,2 g/100 g, Labsynth Ltda, Brasil). Os aditivos estudados foram antocianina natural em pó (fonte: casca de uva, cor: 1.125 a 1.375 unidades, pico de absorbância: 520 nm, umidade máxima: 7 %, Chr. Hansen S.A., Brasil) e ácido cítrico anidro P.A. (pureza: 99,5 %, umidade máxima: 0,5 %, Labsynth Ltda, Brasil).

3.2 Elaboração dos filmes biodegradáveis

Os filmes foram elaborados pelo método de “*casting*”, no qual se verte a solução filmogênica sobre uma placa de superfície lisa, deixando-a solidificar por secagem do material.

Inicialmente, foi realizada a dispersão das nanopartículas de argila, de modo a garantir um estado de dispersão das partículas, ou seja, a intercalação das lâminas da argila com o amido. Para isso, 0,10 g de argila montmorilonita sódica foram suspensas em água destilada sob agitação por 1 h, usando agitador magnético. Em seguida, a suspensão foi deixada em repouso por 24 h prévias à elaboração dos filmes.

Depois do período de descanso, foi formada a solução filmogênica base através da incorporação da suspensão de argila com 5,0 g de fécula de mandioca, 0,75 g de glicerol (utilizado como plastificante) e água destilada até obter 100 g de

solução filmogênica, e em seguida homogeneizada e aquecida em forno micro-ondas Family Plus (PANASONIC, Brasil) até atingir a gelatinização do amido, a uma temperatura de $70\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$. Durante esse aquecimento, a solução foi agitada manualmente com baqueta de vidro por intervalos de tempo variáveis (15, 30 e 45) s, visando obter uma solução homogênea e obter uma melhor distribuição do calor gerado. As quantidades de cada componente da formulação base foram definidas em pesquisas anteriormente realizadas no LEA. Todas as formulações foram realizadas em duplicata.

Durante a primeira fase do trabalho, após o resfriamento natural da solução filmogênica até a temperatura ambiente, foram adicionadas duas concentrações de antocianina natural (0,05 e 0,10) g/100 g de solução filmogênica, pigmento utilizado como indicador de mudança de pH, e a seguir, foram incorporadas 14,25 g de etanol anidro, visando diminuir a viscosidade da solução, facilitando assim o espalhamento sobre as placas no processo de *casting*. A solução foi agitada manualmente até atingir uma solução homogênea.

A segunda fase do trabalho consistiu na avaliação das formulações anteriores, seguindo a mesma metodologia da primeira fase, mas desta vez incorporando ácido cítrico anidro à matriz polimérica, a fim de abaixar o pH da solução filmogênica, aproveitando assim uma maior escala na qual ocorra a mudança de cor como indicadora de pH e, além disso, testar o desempenho do ácido cítrico sobre as propriedades mecânicas e de barreira dos filmes.

Para isso, avaliou-se a influência da antocianina natural nas duas concentrações já estabelecidas (0,05 e 0,10) g/ 100 g de solução filmogênica, e dos pH da solução filmogênica (2,8 e 4,3) de acordo com o planejamento fatorial completo 2^2 , feito em duplicata, sendo +1 seu valor máximo e -1 seu valor mínimo em relação ao pH e ao conteúdo de antocianina. Os conteúdos de antocianina e os valores do pH da solução filmogênica estão mostrados na Tabela 3.1.

O pH da solução filmogênica foi medida diretamente com pHmetro Tec-3MP (TECNAL, Brasil), até atingir o pH desejado. Todas as quantidades de antocianina e ácido cítrico estabelecidas nesse planejamento foram criteriosamente selecionadas após testes preliminares.

Tabela 3.1 – Valores de pH e quantidades de antocianina em relação à quantidade de solução filmogênica para a elaboração de filmes compósitos, de acordo com o planejamento fatorial 2² com repetição.

Formulação	Valores codificados		Valores reais	
	Antocianina	pH	Antocianina ¹	pH _{sf}
C	-1	-1	0,05	2,8
D	-1	+1	0,05	4,3
A	+1	-1	0,10	2,8
B	+1	+1	0,10	4,3

¹ g/ 100 g de solução filmogênica

Em seguida, a solução filmogênica foi filtrada em peneira com poros de 0,297 mm de abertura e colocada no banho ultrassônico USC-1800 (UNIQUE, Brasil) sob vácuo, a fim de eliminar o ar incorporado durante a agitação evitando, dessa forma, a formação de bolhas no filme.

A seguir, 42 g dessa solução filmogênica foram dispostas em placas de petri de polipropileno de 14,0 cm de diâmetro e submetidas à secagem em estufa (FABBE, modelo 119) a temperatura de 35 °C ± 2 °C por (16-20) h. A quantidade da solução foi estabelecida em estudos anteriores no LEA, uma vez que se deseja obter, ao final da secagem, uma massa de 2,10 g de sólidos, já que é uma medida que resulta em filmes com espessura média de 100 µm ± 10 µm, adequada para seu manuseio.

Antes de realizar qualquer análise, os filmes foram acondicionados em dessecador por no mínimo dois dias, à temperatura ambiente de 24 °C ± 2 °C e com umidade relativa controlada com solução de cloreto de sódio (75 % UR). Como os filmes à base de amido apresentam caráter hidrofílico, foi escolhido um ambiente com alta umidade relativa para acondicioná-los, visando avaliar seu comportamento em condições típicas de países com clima tropical (ASTM E96/E96M, 2010).

3.3 Avaliação da atividade indicadora de pH dos filmes biodegradáveis

3.3.1 Preparo da amostra

Na primeira fase avaliou-se a atividade indicadora de mudança de pH pela mudança de cor dos filmes correspondentes às formulações D e B, ou seja, com

(0,05 e 0,10) g de antocianina/100 g de solução filmogênica, respectivamente; em triplicata. Para isso, porções de 8,5 g de peixe do tipo pescada-branca (*Cynoscion leiarchus*) em estado fresco e cru, adquirido em um supermercado local (São Paulo, SP, Brasil) foram embaladas em béqueres de vidro tampados com o filme de modo que este ficasse a 7 cm de distância do peixe. Os béqueres foram acondicionados em temperatura ambiente (26 ± 2) °C e sob refrigeração (4 ± 2) °C, sendo que potes vazios também fechados com o filme foram usados como controle. Todos os testes foram realizados uma semana após a elaboração dos filmes, em triplicata.

Foi realizado o registro da temperatura de armazenamento e análise de cor do mesmo filme a cada 24 h.

Durante a segunda fase, novamente foi avaliada a atividade indicadora de mudança de pH pela alteração de cor dos filmes correspondentes às formulações A e B, isto é, filmes contendo 0,10 g de antocianina/100 g de solução filmogênica com pH (2,8 e 4,3). Desta vez, 50 g divididas em cinco porções de 10 g de peixe do tipo pescada-branca (*Cynoscion leiarchus*) em estado fresco e cru, adquirido em um supermercado local (São Paulo, SP, Brasil) foram embalados em recipientes de vidro tampados com o filme de modo que este ficasse a 13 cm de distância do peixe, aos quais se sobrepôs uma tampa metálica branca com um orifício no centro. Isto foi realizado com a finalidade de evitar que a alta umidade presente na geladeira afetasse a estrutura do filme. Recipientes vazios tampados nas mesmas condições foram utilizados como controle. Os recipientes foram acondicionados em temperatura de (6 ± 2) °C e de (12 ± 2) °C, simulando as condições de armazenamento no mercado.

Todos os testes foram realizados uma semana após a elaboração dos filmes em triplicata.

Foi realizado o registro da temperatura de armazenamento, pH da amostra e análise de cor do mesmo filme a cada 24 h.

3.3.2 Determinação da alteração de cor dos filmes biodegradáveis inteligentes

A análise de cor foi determinada no mesmo filme a cada 24 h, a fim de medir a mudança de cor após o efeito da alteração de pH do peixe, correlacionando-a com a quantidade de antocianina adicionada à cada formulação, em triplicata.

Os testes foram feitos tirando o filme do recipiente, e passando-o pelo Colorímetro ColorQuest XE previamente calibrado, usando a escala Cielab, como explicado no item 3.5.4.

3.3.3 Determinação do pH das amostras de peixe

O pH das amostras de peixe foi determinado pelo método eletrométrico segundo metodologia do INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 1985.

A cada 24 h, foram dispostas 10,0 g de amostra de peixe em béquer de 200 mL e diluídas com auxílio de 100 mL de água destilada. O conteúdo foi agitado até que as partículas do peixe ficassem uniformemente suspensas. Em seguida, foi medido diretamente o pH da solução obtida com pHmetro Tec-3MP (TECNAL, Brasil).

3.4 Avaliação da interação antocianina - argila

3.4.1 Preparo da amostra

A fim de avaliar a influência da argila montmorilonita sódica na estabilização da cor da antocianina, foi realizada a análise de cor da solução de antocianina no maior nível de antocianina do planejamento experimental (+1), com e sem adição de argila, simulando as mesmas condições da elaboração da solução filmogênica.

Inicialmente, foi realizada a dispersão das nanopartículas de argila, para o qual 0,05 g de argila montmorilonita sódica foram suspensas em 50 g de água destilada sob agitação por 1 h, usando agitador magnético. Em seguida, a suspensão foi deixada em repouso por 24 h prévias à incorporação da antocianina.

Depois do período de descanso, foram incorporadas 0,05 g de antocianina em pó à suspensão de argila, e em seguida homogeneizadas e centrifugadas em centrífuga marca Tominaga TD-65, Japão, a 30.000 rpm durante 10 min. Estas amostras contendo a argila em suspensão incorporadas com a antocianina foram nomeadas como ATH_MMT-Na.

Do mesmo modo, foi realizada a solução padrão (ATH_PADRÃO) através da incorporação de 0,05 g de antocianina em 50 g de água destilada, e em seguida homogeneizadas e centrifugadas nas mesmas condições anteriores.

3.4.2 *Análise de cor*

Uma vez centrifugadas as soluções, foram retiradas alíquotas de 40 mL do sobrenadante e levadas a análise de cor no Colorímetro ColorQuest XE, previamente calibrado, no modo de transmitância total, como explicado no item 3.5.4. Todos os testes foram realizados em triplicata.

Após a medição da cor, foi realizado o registro da temperatura e pH das amostras por meio da medição direta na solução com pHmetro Tec-3MP (TECNAL, Brasil).

3.5 **Caracterização dos filmes biodegradáveis**

3.5.1 *Propriedades mecânicas*

Resistência máxima à tração ($R_{máx}$) [MPa] e porcentagem de alongação na ruptura (E) [%] foram obtidos das curvas força-deformação, usando o software EXPONENT, versão 4.0.13.0, do teste de tração realizado no texturômetro TA.XT Plus (Stable Micro Systems, Reino Unido), com o probe A/TGT, de acordo com o método ASTM D882-10 (2010), modificado conforme a necessidade.

Para cada formulação de filme, amostras retangulares de dimensões 80 mm x 25 mm, cortadas com guilhotina de dois cortes (2G-15, REGMED), pré-condicionadas (23 °C; 75 % UR), por no mínimo 48 h, foram usadas para o teste. Para cada formulação foram avaliadas de 12 a 15 amostras, de modo a se obter a média e desvio padrão dos resultados.

Antes de realizar o ensaio, foi medida a espessura dos filmes com micrômetro de ponta plana (MITUTOYO, Brasil), com resolução de 1 μ m, em cinco posições aleatórias em cada amostra.

A $R_{m\acute{a}x}$ é a relação entre a força máxima ($F_{m\acute{a}x}$) medida e a área mínima ($A_{m\acute{i}n}$) inicial do corpo de prova, a qual é calculada com os valores de largura (L) e espessura mínima ($e_{m\acute{i}n}$) do corpo de prova, utilizando a Equação (1).

$$R_{m\acute{a}x} = \frac{F_{m\acute{a}x}}{A_{m\acute{i}n}} = \frac{F_{m\acute{a}x}}{L.e_{m\acute{i}n}} \quad (1)$$

A E é a relação porcentual entre a elongação (E_{rup}) do corpo de prova na ruptura e o seu comprimento inicial, que corresponde à distância entre as garras (D_{garras}) como mostrado na Equação (2).

$$E = \frac{E_{rup}}{D_{garras}} . 100 \quad (2)$$

As condições usadas durante o teste de tração foram: velocidade do pré-teste: 0,80 mm·s⁻¹; velocidade do teste: 0,80 mm·s⁻¹; velocidade do pós-teste: 1,0 mm·s⁻¹; distância máxima: 150 mm; distância inicial entre as garras: 50 mm.

3.5.2 Permeabilidade ao vapor de água

As amostras foram caracterizadas pelo método gravimétrico segundo metodologia ASTM E96/E96M-10 (2010). Cada amostra de filme foi cortada em formato de disco e colocada sobre uma cápsula de permeação de alumínio de área igual a 44 cm² e selada com parafina, utilizando o equipamento PVA/4 (REGMED, Brasil), dessa forma, garantindo que toda transferência e absorção de umidade ocorressem unicamente através da área exposta do filme.

A seguir, dentro da cápsula, colocou-se sílica gel previamente ativada em estufa a 100 °C por 24 h (Figura 3.1), cuidando para sempre deixar uma distância de aproximadamente 6 mm entre o filme e a camada de sílica gel, que é um dessecante, com alta afinidade ao vapor de água, o que permite quantificar o ganho de massa ao longo do tempo, ou seja, a quantidade de vapor de água que permeia pelo filme testado.

Figura 3.1 – Representação esquemática da cápsula de alumínio contendo o filme vedada com parafina.

A umidade relativa no exterior da cápsula foi estabelecida como sendo 75 % (solução saturada de cloreto de sódio) e no interior da cápsula, 0 % (sílica gel ativada). Como a umidade relativa fora da cápsula é sempre maior que dentro, ocorre um transporte de vapor de água de fora para dentro da cápsula, o qual é determinado através do ganho de massa da sílica gel.

Três cápsulas foram montadas contendo sílica gel e o filme, e uma única cápsula foi preparada com amostras do filme, entretanto sem sílica e considerada como controle, de modo que a variação de massa do filme pôde ser medida e corrigida em relação ao ganho de massa da sílica, isto devido ao caráter hidrofílico do filme.

O ganho de massa de cada cápsula foi determinado ao longo do tempo e a taxa de permeabilidade ao vapor de água foi calculada de acordo com a Equação (3).

$$TPVA = \frac{w}{t \times A} \quad (3)$$

em que: $TPVA$ é a taxa de permeabilidade ao vapor de água [$\text{g} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{m}^{-2}$]; w/t [$\text{g} \cdot \text{h}^{-1}$], é obtida da regressão linear da curva do ganho de massa $\times$ tempo e A a área exposta do filme [m^2].

O cálculo da permeabilidade ao vapor de água (PVA) [$\text{g} \cdot \text{mm} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{d}^{-1} \cdot \text{kPa}^{-1}$] considera a espessura dos filmes (e) [mm], a pressão de saturação do vapor na temperatura do ensaio (p_s) [kPa] e as umidades relativas interna (UR_1) e externa (UR_2) das cápsulas, de acordo com a Equação (4).

$$PVA = TPVA \times \frac{e}{p_s (UR_1 - UR_2)} \quad (4)$$

As cápsulas foram pesadas durante 48 h, totalizando 10 medidas, sendo cinco medidas realizadas a cada 24 h.

3.5.3 Permeabilidade ao oxigênio

O ensaio foi realizado segundo metodologia ASTM F1927-07 (2007), no equipamento OXTRAN 2/21 (MOCON, EUA), que mede a quantidade de oxigênio que passa através de uma unidade de área paralela à superfície de um material de embalagem durante certo período de tempo. Esse equipamento consiste de duas células de teste (A e B), onde as amostras a serem testadas são colocadas conforme a Figura 3.2.

Figura 3.2 – Representação esquemática das células A e B.

Durante o processo, o gás oxigênio é liberado entre as duas células, em uma vazão de $20 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, enquanto que o gás de arraste, composto por uma mistura de 98 % de nitrogênio e 2 % de hidrogênio, com vazão de $10 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, passa pelo lado de fora das células. Conforme o oxigênio permeia o filme, ele se mistura ao gás de arraste e passa por um sensor coulométrico, que mede a corrente elétrica formada através de reações catódicas e anódicas e que é proporcional à quantidade de oxigênio.

A leitura é realizada a cada 30 min e, a cada quatro leituras, faz-se uma do zero. Essa leitura do zero serve para medir a quantidade de oxigênio existente no

gás de arraste antes dele entrar em contato com o oxigênio permeado, para que essa quantidade possa ser descontada posteriormente. Assim, o procedimento segue a seguinte sequência de leituras: zero, célula A, célula B, célula A, célula B, zero, e assim por diante.

O equipamento é conectado a um microcomputador, cujo software fornece todos os resultados. A cada leitura realizada, um valor de taxa de permeabilidade ao oxigênio (TPO_2) [$\text{cm}^3 \text{ m}^{-2} \text{ d}^{-1}$] é fornecido. Com esses valores, pode-se fazer um gráfico $TPO_2 \times \text{tempo}$. O experimento termina quando a curva $TPO_2 \times \text{tempo}$ se mostra constante, isto é quando nota-se que os valores de TPO_2 estão estabilizados.

Assim, a taxa de permeabilidade ao oxigênio é obtida, sendo essa o maior valor dado durante toda a análise. Usa-se o maior valor de taxa de permeabilidade ao oxigênio e não a média dos valores, nem o último valor fornecido, porque, o objetivo é saber qual foi a maior quantidade de oxigênio que passou pelo material de embalagem. A permeabilidade ao oxigênio (PO_2) [$\text{cm}^3 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1} \text{ Pa}^{-1}$] é dada pela Equação (5):

$$PO_2 = \frac{TPO_2}{\Delta p} \quad (5)$$

sendo: Δp a diferença de pressão parcial de oxigênio entre os dois lados do filme [kPa], que corresponde à pressão atmosférica (101,3 kPa) quando as amostras estão sujeitas ao gás oxigênio puro (100 %) de um lado e gás de arraste contendo 98 % de nitrogênio e 2 % de hidrogênio do outro lado.

Para calcular o coeficiente de permeabilidade ao oxigênio ($P'O_2$) [$\text{cm}^3 \text{ m}^{-1} \text{ s}^{-1} \text{ Pa}^{-1}$], basta multiplicar o valor da permeabilidade ao oxigênio (PO_2) pelo valor médio da espessura (e) [mm] medida em cinco posições aleatórias da amostra testada, como mostra a Equação 6:

$$P'O_2 = PO_2 \times e \quad (6)$$

Todas as análises são realizadas em modo contínuo. Como o equipamento não tem compensador barométrico, a pressão colocada como padrão é de 92,7 kPa, que é a pressão atmosférica da cidade de São Paulo, Brasil, onde foram conduzidos os ensaios. A temperatura da câmara é controlada para ficar em 23 °C. A umidade

do ambiente é controlada em 75 % com água padrão HPLC (High Performance Liquid Chromatography).

3.5.4 Análise de Cor

A cor foi determinada em Colorímetro ColorQuest XE (Hunter Lab, USA), utilizando o sistema CIELAB, iluminante D65 e ângulo observador padrão 10°, segundo metodologia ASTM D2244-09b (2009).

Foi medida a cor em amostras em espectro de onda de 400 nm a 700 nm, com posição do filtro UV nominal, com área de visão de uma polegada quadrada, no modo de transmitância total, que incide um feixe de luz normal à superfície do filme, a partir de uma fonte através da amostra. Essa luz transmitida é percebida pelo sensor do aparelho do lado oposto ao da fonte, que mede a sua intensidade para vários comprimentos de onda. Isso significa que a cor foi obtida das medições de valores para a luz transmitida.

Os testes foram feitos tomando-se amostras representativas de cada formulação (filmes intactos de cor uniforme) e passando-as pelo colorímetro, em triplicata.

A Comissão Internacional de Iluminação define os padrões de medição de cor internacionalmente e gerencia o método de referência de cor usado no projeto, o espaço Lab. L^* , a^* , e b^* representam os parâmetros espaciais (L, a, b), que são coordenadas associadas a um espaço vetorial retangular onde cada cor representa um ponto. Cada parâmetro diz respeito a um componente da cor na amostra, baseado no princípio do olho humano para a percepção de cores, e está disposto como é mostrado na Figura 3.3.

Figura 3.3 – Representação esquemática da escala Cielab.

- (L) percebe tons claros ou escuros, é o único parâmetro finito, que vai de $L = 0$, ausência total de luz, até $L = 100$, branco difuso;
- (a) percebe tons vermelhos a verdes, sendo aos vermelhos associados valores positivos e aos verdes negativos;
- (b) percebe tons amarelos a azuis, sendo aos amarelos associados valores positivos e aos azuis negativos.

O método prevê também a orientação dos valores medidos por um padrão branco, ou padrão de comparação. Esse padrão é denominado branco, pois os seus valores de transmitância total e os parâmetros (L^* , a^* , b^*) medidos para ele serão desconsiderados das amostras consequentes. Cada formulação do filme foi usada como padrão branco no seu primeiro dia de armazenamento.

Da escala Cielab, tem-se que o cálculo do parâmetro dE^* , associado à intensidade da cor, é dado pelo módulo da diferença de vetores da amostra e do padrão branco, ou outro padrão de comparação, e é dado pela Equação (7) a partir dos parâmetros da escala *Lab* medidos pelo equipamento.

$$dE^* = \sqrt{(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2} \quad (7)$$

As medidas de cor foram realizadas com o intuito de observar a variação da cor dos filmes ao longo do tempo de armazenamento, uma vez contendo o produto embalado.

Na avaliação da interação antocianina–argila, explicada no item 3.4, foi calculada adicionalmente a cromaticidade métrica, dada pela Equação (8):

$$C_{ab}^* = \sqrt{(a^*)^2 + (b^*)^2} \quad (8)$$

3.5.5 Aspecto visual

Refere-se à aparência do filme avaliada por observações táteis e visuais. O filme deve apresentar uma superfície homogênea e contínua, ou seja, foram excluídos das análises aqueles filmes defeituosos que apresentaram fissuras e

bolhas após o processo de secagem, ou aqueles que continham partículas insolúveis ou poros abertos.

3.5.6 *Espessura*

A espessura média das amostras pré-condicionadas (23 °C; 75 % UR) foi medida com micrômetro de ponta plana (MITUTOYO, Sul Americana Ltda., modelo 103-137, Brasil), com resolução de 1 μm , por meio de 5 medições em posições aleatórias de cada amostra de filme.

3.5.7 *Atividade de Água*

A atividade de água foi medida diretamente em equipamento Aqualab (Decagon Devices, Inc. Series 3 TE, USA) em amostras de filme de 2 cm^2 cortadas e condicionadas 48 h prévias à realização dos ensaios (24 $\pm$ 2) °C, 75 % UR; em triplicata.

3.5.8 *Teor de Umidade*

O conteúdo de umidade de equilíbrio foi determinado por gravimetria em amostras de filme previamente cortadas com 1 cm de lado e condicionadas 48 h prévias à realização dos ensaios (24 $\pm$ 2) °C, 75 % UR, submetidas a secagem em estufa a 105 °C durante 4 h (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 2005), em triplicata. O intervalo de tempo de quatro horas necessário para o equilíbrio do sistema foi determinado em testes preliminares que demonstraram não haver diferença significativa na massa dos filmes após 4 h em estufa a 105 °C.

3.6 **Análise dos resultados**

Os resultados dos ensaios foram analisados estatisticamente por Análise de variância (ANOVA) utilizando o programa Statgraphics Centurion XV (Statpoint), considerando o erro puro. O teste de Tukey foi aplicado para análise das diferenças significativas entre os resultados obtidos, no intervalo de confiança de 95 %.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As propriedades mais relevantes para a avaliação de embalagens inteligentes indicadoras de pH em alimentos baseiam-se na sua capacidade de mudança de cor, sendo consideradas como ideais aquelas cuja mudança seja facilmente visível a olho nu. Por outro lado, suas propriedades mecânicas e de barreira cumprem um importante papel na avaliação de embalagens para alimentos, nas quais é fundamental conhecer o seu uso final. Apesar da seleção de algumas formulações consideradas ideais, é conhecido que nenhuma formulação deve ser rejeitada, pois todas as formulações elaboradas poderiam ser usadas para diversos fins.

Essas propriedades dos filmes são o resultado das interações entre os materiais usados na formulação (macromolécula, solvente, plastificante e outros aditivos), das características das macromoléculas utilizadas, do processo de produção, do processo de dispersão da solução filmogênica como o espalhamento e, das condições de secagem.

Como neste trabalho se pretende avaliar o uso do filme biodegradável inteligente como embalagem de um alimento de origem animal, escolheu-se a resistência máxima à tração e a permeabilidade ao vapor de água como parâmetro principal de seleção do filme junto com os parâmetros de cor que sofreram maior mudança.

4.1 Elaboração dos filmes

Todas as formulações usadas, independentemente dos conteúdos de antocianina e ácido cítrico usados, produziram filmes biodegradáveis translúcidos, homogêneos e flexíveis, com coloração variando de rosa a violeta claro, dependendo da quantidade de antocianina e ácido cítrico incorporados, como mostrado na Figura 4.1.

Após a etapa de secagem, os filmes foram facilmente retirados das placas. Os filmes que apresentaram bolhas não foram empregados nos testes. Através de

análise visual e tátil dos filmes biodegradáveis contendo ácido cítrico, percebeu-se que estes mostraram-se pegajosos e com maior higroscopicidade.

Figura 4.1 - Filme biodegradável elaborado por *casting* à base de amido de mandioca adicionado com antocianina (foto de Eduardo César Soares Faria de Oliveira).

4.2 Caracterização dos filmes

Análise de variância (ANOVA) *two-way* foi aplicada nos resultados das diferentes propriedades dos filmes biodegradáveis produzidos com duas quantidades de antocianina: 0,05 g/100 g e 0,10 g/100 g de solução filmogênica em dois diferentes pHs: 2,8 e 4,3, no intervalo de confiança de 95 %. Nesta análise, ambos os fatores (concentração de antocianina e pH) foram de igual interesse, assim como a possibilidade de interação entre eles.

4.2.1 Propriedades mecânicas

Nas Tabelas 4.1 e 4.2 são mostrados os valores médios e respectivos desvios-padrão da resistência máxima à tração e da elongação na ruptura dos filmes, respectivamente, de acordo com a quantidade de antocianina utilizada e pH da solução filmogênica, obtidos dos testes de tração descritos no item 3.5.1.

Tabela 4.1 – Resistência máxima à tração ($R_{m\acute{a}x}$) dos filmes à base de amido de mandioca elaborados pelo método *casting*, incorporados com antocianina e ácido cítrico, armazenados a (25 ± 2) °C e 75 % UR.

$R_{m\acute{a}x}$ [MPa]			
pH_{sf}	Antocianina ¹		DMS
	0,05	0,10	
2,8	$3,50 \pm 1,06^{aA}$	$2,92 \pm 0,77^{aA}$	1,13
4,3	$5,51 \pm 0,73^{aA}$	$6,50 \pm 0,75^{aB}$	2,64
DMS	2,93	1,95	

¹ g/ 100g de solução filmogênica

* Letras iguais na mesma linha (minúsculas) ou na mesma coluna (maiúsculas) indicam que não há diferença significativa entre os resultados ($P > 0,05$).

Tabela 4.2 – Porcentagem de alongação na ruptura (E) dos filmes à base de amido de mandioca elaborados pelo método *casting*, incorporados com antocianina e ácido cítrico, armazenados a (25 ± 2) °C e 75 % UR.

E [%]			
pH_{sf}	Antocianina ¹		DMS
	0,05	0,10	
2,8	$228,51 \pm 15,30^{aA}$	$173,78 \pm 11,12^{bA}$	34,30
4,3	$150,06 \pm 10,65^{aB}$	$175,59 \pm 10,80^{aA}$	32,90
DMS	37,50	31,80	

¹ g/ 100g de solução filmogênica

* Letras iguais na mesma linha (minúsculas) ou na mesma coluna (maiúsculas) indicam que não há diferença significativa entre os resultados ($P > 0,05$).

Na Tabela 4.1, observa-se uma interação entre o conteúdo de antocianina e o pH da solução filmogênica (pH_{sf}) sobre a resistência máxima à tração ($R_{m\acute{a}x}$) dos filmes biodegradáveis. Percebe-se que para formulações dos filmes elaboradas com maior conteúdo de antocianina, o pH influenciou significativamente a $R_{m\acute{a}x}$ das amostras aumentando seu valor com o acréscimo do pH_{sf} , como pode ser observado na Figura 4.2. Pela análise de variância verificou-se que a variável que apresentou efeito significativo sobre a $R_{m\acute{a}x}$ foi apenas o pH da solução filmogênica.

Figura 4.2 - Variação da $R_{máx.}$ dos filmes à base de amido de mandioca em função do pH da solução filmogênica para cada conteúdo de antocianina estudado.

Como observado na Tabela 4.2, para o percentual de elongação (E), a variável antocianina influenciou significativamente ($P < 0,05$) para o pH_{sf} 2,8; enquanto que o pH_{sf} influenciou significativamente o valor de E para os filmes elaborados com menor conteúdo de antocianina como mostrado na Figura 4.3.

Figura 4.3 - Interação das variáveis Antocianina e pH da solução filmogênica no parâmetro E , dos filmes à base de amido de mandioca.

Veiga-Santos, Ditchfield e Tadini (2011) produziram filmes à base de fécula de mandioca sem adição de argila, incorporados com extratos aquosos de espinafre e uva, como fonte de clorofila e antocianina, respectivamente, em concentrações

variando de (0,00 a 0,49) g de extrato de espinafre/100 g de solução filmogênica e (0,00 a 3,79) g de extrato de uva/ 100 g de solução filmogênica, cujos valores de $R_{máx}$ ($1,79 \pm 0,16$ a $4,19 \pm 0,63$) MPa foram menores do que os obtidos no presente trabalho, o que já era esperado devido à presença de esmectita intercalada na matriz, atuando como reforçador.

Os resultados da resistência máxima à tração e alongação na ruptura de todas as formulações avaliadas no presente estudo, são superiores aos resultados da $R_{máx}$ e E obtidos por Kechichian et al. (2010) que produziram filmes biodegradáveis à base de amido de mandioca com pós de canela e cravo, como aditivos antimicrobianos, e encontraram que a $R_{máx}$ variou entre (1,2 - 2,2) MPa e a E esteve entre (58 e 140) %. Os autores atribuíram esses valores baixos à presença de aditivos naturais na matriz polimérica.

Souza et al. (2012) obtiveram filmes à base de amido de mandioca, plastificados com (0,75 a 1,25) g de glicerol/100 g de solução filmogênica e reforçados com (0 a 0,1) g de nanopartículas de argila esmectita sódica/100 g de solução filmogênica, pela técnica *casting*. A $R_{máx}$ variou entre ($2,07 \pm 0,33$ e $4,51 \pm 0,69$) MPa e a E variou entre ($88,80 \pm 14,14$ e $200,24 \pm 33,50$) % nos filmes armazenados a 75% de UR. Nota-se que estes resultados de $R_{máx}$ e E são comparáveis ou até menores, do que os filmes obtidos no presente estudo.

Segundo Wang, Yu e Han (2007) a presença de ácido cítrico na matriz polimérica destrói a estrutura do amido e facilita a permeação do plastificante.

Wilhelm et al. (2003) estudaram filmes de amido de cará plastificados com 20 g de glicerol/100 g de amido, acondicionados a 43 % UR, por 3 semanas, e obtiveram deformação de 11 % para materiais sem argila e 5 % para aqueles com proporção de argila/amido de 30/70.

Ning et al. (2009) elaboraram por extrusão amido termoplástico (TPS)/nanocompósitos de montmorilonita modificada com glicerol (GMMT). O teste das propriedades ocorreu após uma semana. TPS e ácido cítrico (3 % em peso em base amido) e TPS modificado (CTPS) foram preparados por difusão de glicerol, amido e ácido cítrico. Eles relataram que na presença de ácido cítrico a despolimerização do polissacarídeo era propícia para a intercalação ou esfoliação parcial da GMMT. Quando foi adicionado 3 % em peso de ácido cítrico a este composto complexo, a plastificação do TPS em CTPS/nanocompósitos MMT foi melhor. Na presença de ácido cítrico, grânulos de amido residual não foram detectados. Isto foi atribuído ao

ácido cítrico que acelera a fragmentação e a dissolução do grânulo de amido, podendo destruir a sua estrutura.

Uma consideração muito importante na comparação dos resultados das propriedades mecânicas, obtidos no presente estudo com a literatura é a atividade de água, fornecida pela solução saturada usada no acondicionamento dos filmes antes da realização dos testes. Shimazu, Mali e Grossmann (2007) demonstraram que a atividade de água (a_w) influencia as propriedades mecânicas dos filmes à base de fécula de mandioca, em que quanto menor a a_w da solução saturada presente no dessecador, maior será a $R_{máx}$ apresentada pelo material.

4.2.2 Propriedades de barreira

As Tabelas 4.3 e 4.4 apresentam os valores médios e os desvios-padrão da permeabilidade ao vapor de água e do coeficiente de permeabilidade ao oxigênio dos filmes, de acordo com a quantidade de antocianina utilizada e pH da solução filmogênica, obtidos dos testes de permeabilidade ao vapor de água e ao oxigênio, descritos no item 3.5.2 e 3.5.3, respectivamente.

Tabela 4.3 – Permeabilidade ao vapor de água (PVA) dos filmes à base de amido de mandioca elaborados pelo método *casting*, incorporados com antocianina e ácido cítrico, armazenados a $(25 \pm 2) ^\circ\text{C}$ e 75 % UR, em comparação ao PVA do celofane.

PVA [$\text{g}\cdot\text{mm}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{dia}^{-1}\cdot\text{kPa}^{-1}$]			
pH	Antocianina ¹		DMS
	0,05	0,10	
2,8	$5,45 \pm 1,21^{aA}$	$7,54 \pm 2,13^{aA}$	2,30
4,3	$7,50 \pm 2,35^{aA}$	$6,45 \pm 1,04^{aA}$	2,58
DMS	2,40	2,44	
Celofane	$7,27^2$		

* Letras iguais na mesma linha (minúsculas) ou na mesma coluna (maiúsculas) indicam que não há diferença significativa entre os resultados ($P > 0,05$).

¹ g/ 100g de solução filmogênica

² TAYLOR, C. C. Cellophane. In: *The Wiley Encyclopedia of Packaging Technology*, M. Bakker, ed., New York: John Wiley&Sons, p. 159-163, 1986.

ANOVA mostrou que os valores de permeabilidade ao vapor de água dos filmes não são estatisticamente diferentes.

A permeabilidade ao vapor de água é importante para conhecer possíveis mecanismos de transferência de massa e interações soluto/polímero nos filmes biodegradáveis (SOUZA, 2011). De acordo com a termodinâmica dos processos irreversíveis, a diferença de potencial químico da água é a força motriz da transferência de água através de um filme. Quando o processo ocorre à temperatura e pressão constantes, a diferença de potencial químico da água é proporcional à diferença de concentração de vapor de água entre as duas faces do filme (BERTUZZI et al., 2007).

A permeabilidade ao vapor de água é afetada por vários fatores do material, como: a fonte de amido (GRAAF; KARMAN; JANSSEN, 2003); a proporção entre amilose e amilopectina (RINDLAV-WESTLING et al., 1998); o grau de cristalinidade (MALI et al., 2006); aditivos incorporados à matriz polimérica (TANG; ALAVI; HERALD, 2008), espessura e, as condições de armazenamento (MALI et al., 2006).

Os filmes biodegradáveis produzidos neste trabalho apresentam bons resultados de *PVA*, quando comparados com Alves et al. (2007) que encontraram valores de permeabilidade ao vapor de água variando entre $(20,74 \pm 1,73 \text{ e } 42,34 \pm 0,86) \text{ g}\cdot\text{mm}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{dia}^{-1}\cdot\text{kPa}^{-1}$, para filmes biodegradáveis elaborados com 2 % de fécula de mandioca, (20 a 45) % de glicerol e (6,3 a 25,0) % de amilose, sendo que o maior e menor valor de *PVA* foi associado a maior quantidade de glicerol.

Os resultados obtidos são comparáveis com os relatados por García et al. (2004) que produziram filmes biodegradáveis à base de metilcelulose e quitosana com valores de $(6,52 \pm 0,05 \text{ e } 7,80 \pm 0,10) \text{ g}\cdot\text{mm}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{dia}^{-1}\cdot\text{kPa}^{-1}$, respectivamente.

Talja et al. (2008) relataram valores de *PVA* menores $(1,06 \text{ g}\cdot\text{mm}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{dia}^{-1}\cdot\text{kPa}^{-1})$ do que os produzidos no presente trabalho, em filmes à base de amido de batata, sem adição de plastificantes.

Comparando os filmes produzidos neste trabalho com o celofane, amplamente usado na indústria de embalagens de alimentos, observa-se que os filmes biodegradáveis à base de fécula de mandioca apresentaram valores de *PVA* compatíveis, o que os tornam bastantes vantajosos para essa aplicação.

Baixo conteúdo de plastificante facilita as interações entre as cadeias de amido e as camadas de silicato de argila. O plastificante forma pontes de hidrogênio com o amido, substituindo as fortes interações entre os grupos hidroxila das moléculas de amido, permitindo que o amido e o plastificante difundam juntos dentro das camadas de silicato (TANG; ALAVI; HERALD, 2008).

Tabela 4.4 – Coeficiente de permeabilidade ao oxigênio ($P'O_2$) dos filmes à base de amido de mandioca elaborados pelo método *casting*, incorporados com antocianina e ácido cítrico, armazenados a $(25 \pm 2) ^\circ\text{C}$ e 75 % UR, em comparação aos dados de $P'O_2$ do celofane.

$P'O_2 (\times 10^{-13}) [\text{cm}^3 \cdot \text{m}^{-1} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{Pa}^{-1}]$			
pH	Antocianina ¹		DMS
	0,05	0,10	
2,8	$3,62 \pm 0,42^{aA}$	$3,01 \pm 0,19^{aA}$	1,39
4,3	$3,48 \pm 0,34^{aA}$	$2,67 \pm 0,27^{aA}$	1,33
DMS	1,64	0,99	
Celofane	1,85 ²		

* Letras iguais na mesma linha (minúsculas) ou na mesma coluna (maiúsculas) indicam que não há diferença significativa entre os resultados ($P > 0,05$).

¹ g/100g de solução filmogênica

² TAYLOR, C. C. Cellophane. In: *The Wiley Encyclopedia of Packaging Technology*, M. Bakker, ed., New York: John Wiley&Sons, p. 159-163, 1986.

Com relação ao $P'O_2$, o teor de antocianina e o pH da solução filmogênica dos filmes biodegradáveis, não influenciaram significativamente os resultados, embora observa-se uma tendência de perda do $P'O_2$ com o aumento da antocianina.

Todos os resultados de $P'O_2$ obtidos no presente estudo são similares aos menores valores de $P'O_2$ relatados por Souza (2011), que encontrou valores de $P'O_2$ de $(3,18 \times 10^{-13}) \text{ cm}^3 \cdot \text{m}^{-1} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{Pa}^{-1}$ em filmes ativos à base de amido de mandioca contendo a mesma formulação base deste estudo, e armazenados sob as mesmas condições de umidade relativa, isto é, 0,75 g de glicerol e 0,10 g de argila montmorilonita sódica em 100 g de solução filmogênica, e adicionados com óleo essencial de canela, armazenados a 75 % UR. No mesmo estudo, Souza (2011) encontrou valores maiores de $P'O_2$ $(7,80 \text{ e } 16,60) \times 10^{-13} \text{ cm}^3 \cdot \text{m}^{-1} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{Pa}^{-1}$, nos filmes variando o teor de glicerol de (1,13 e 1,50) g/ 100 g de solução filmogênica, respectivamente.

Todos os valores obtidos de $P'O_2$ no presente trabalho, independente da concentração de antocianina e de pH empregados, são desejados, e muito inferiores aos obtidos por Mali et al. (2004a), os quais apresentaram valores de permeabilidade ao oxigênio variando entre $(2,6 \text{ e } 3,9) \times 10^{-10} \text{ cm}^3 \cdot \text{m}^{-1} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{Pa}^{-1}$ para filmes à base de amido de batata doce e teores de glicerol variando entre (1,30 e 2,00) %. A baixa permeabilidade ao oxigênio dos filmes obtidos neste estudo pode

ser atribuída à argila, cujas camadas impermeáveis dificultam o caminho para o permeante atravessar o nanocompósito (CHOUDALAKIS; GOTSIS, 2009).

Comparando os filmes produzidos neste trabalho com o celofane, nota-se que os filmes biodegradáveis à base de fécula de mandioca possuem valores de $P'O_2$ bastante baixos, sendo apenas um pouco maiores do que o celofane, o que é bastante desejado em embalagens de alimentos susceptíveis à degradação oxidativa.

4.2.3 Espessura

A Tabela 4.5 mostra os valores médios e os desvios-padrão da espessura dos filmes, de acordo com a quantidade de antocianina utilizada e pH da solução filmogênica, obtidos conforme item 3.5.6.

Tabela 4.5 – Espessura (e) das amostras de filmes à base de amido de mandioca elaborados pelo método *casting*, incorporados com antocianina e ácido cítrico, armazenados a $(25 \pm 2) ^\circ\text{C}$ e 75 % UR.

e [μm]			
pH	Antocianina ¹		DMS
	0,05	0,10	
2,8	$119,62 \pm 15,16^{aA}$	$126,52 \pm 12,59^{bA}$	6,59
4,3	$113,75 \pm 12,08^{aA}$	$115,43 \pm 12,39^{aB}$	5,64
DMS	6,10	6,05	

¹ g/ 100g de solução filmogênica

* Letras iguais na mesma linha (minúsculas) ou na mesma coluna (maiúsculas) indicam que não há diferença significativa entre os resultados ($P > 0,05$).

A análise de variância (ANOVA) mostrou que a espessura foi influenciada significativamente pelo conteúdo de antocianina para o pH_{sf} 2,8, por outro lado, foi observado que o pH da solução filmogênica apresentou um efeito significativo sobre a espessura para os filmes elaborados com o maior conteúdo de antocianina.

Na Tabela 4.5, pode ser observado que filmes com maior conteúdo de ácido apresentaram os valores maiores de espessura.

Estes resultados já eram esperados, devido ao aumento no teor de sólidos totais presente no filme por causa da incorporação tanto do pó de antocianina quanto de ácido cítrico granulado na matriz polimérica para abaixar o pH_{sf} .

As variações na espessura de um material implicam em problemas no seu desempenho mecânico e perda de barreira, que comprometem o desempenho da embalagem (SARANTOPÓULOS et al., 2002). O controle da espessura dos filmes é importante para se avaliar a uniformidade desses materiais, a repetibilidade da medida de suas propriedades e a comparação dos resultados entre filmes biodegradáveis. Porém, o controle da espessura dos filmes biodegradáveis é difícil, sobretudo nos processos de produção do tipo *casting* (HENRIQUE; CEREDA; SARMENTO, 2008).

4.2.4 Umidade

A Tabela 4.6 mostra os valores médios e os desvios-padrão da umidade em base seca (bs) dos filmes, de acordo com a quantidade de antocianina utilizada e o pH da solução filmogênica, obtidos conforme descrito no item 3.5.8.

Tabela 4.6 – Teor de umidade em base seca (bs) dos filmes elaborados pelo método *casting*, com [0,75 g de glicerol e 0,10 g de argila montmorilonita sódica (MMT-Na)] / 5 g de amido de mandioca, incorporados com antocianina e ácido cítrico, armazenados a $(25 \pm 2) ^\circ\text{C}$ e 75 % UR.

Umidade (bs) [g/5 g de amido]			
pH	Antocianina ¹		DMS
	0,05	0,10	
2,8	14,64 $\pm$ 0,06 ^{aA}	14,67 $\pm$ 0,25 ^{aA}	0,42
4,3	14,49 $\pm$ 0,36 ^{aA}	14,46 $\pm$ 0,38 ^{aA}	0,83
DMS	0,58	0,73	

¹ g/ 100g de solução filmogênica

* Letras iguais na mesma linha (minúsculas) ou na mesma coluna (maiúsculas) indicam que não há diferença significativa entre os resultados (P >0,05).

Da Tabela 4.6, pode-se notar que o conteúdo de umidade de todas as formulações dos filmes apresentaram valores médios muito próximos, de (14,46 a 14,67) g/5 g de amido (bs). ANOVA mostrou que tanto para o teor de antocianina quanto para o pH da solução filmogênica, não houve diferenças estatisticamente significativas na umidade dos filmes.

Esses resultados já eram esperados, uma vez que neste estudo, todos os filmes foram armazenados nas mesmas condições, isto é a $25 ^\circ\text{C} \pm 2 ^\circ\text{C}$ e 75 % UR

e, continham a mesma quantidade de glicerol na matriz polimérica.

Segundo Chivrac et al. (2010) um fator bastante influente na umidade dos filmes é a umidade relativa de armazenamento das amostras. Os filmes de amido tendem a absorver grandes quantidades de água em condições de elevada umidade relativa, devido à sua natureza hidrofílica, influenciando fortemente suas propriedades físicas e de barreira (MALI et al., 2005).

O teor de glicerol, também influenciou a umidade dos filmes uma vez que é um composto higroscópico e, portanto, incrementa a umidade do filme conforme se eleva o conteúdo do plastificante.

Em geral, sistemas plastificante-água-amido apresentam maior sensibilidade à umidade ambiente quando o plastificante está presente em altas concentrações (> 27 %), permitindo a formação de ligações de hidrogênio entre o plastificante e a água (LOURDIN et al., 1997).

Comparando estes resultados com valores apresentados na literatura, os filmes biodegradáveis produzidos neste trabalho apresentaram resultados de umidade comparáveis, sendo inferiores aos relatados por Carvalho (2012), que encontrou valores de umidade de $(20,74 \pm 0,80)$ g/100 g (bs) de filmes elaborados com [1,25 g glicerol e 0,20 g de MMT-Na]/ 5 g de amido de mandioca, o que mostra que embora esses filmes contenham o dobro de MMT-Na do que os filmes desenvolvidos neste estudo, o incremento do teor de glicerol é mais influente na umidade dos filmes, contribuindo para um aumento nesta propriedade.

Tang, Alavi e Herald (2008) encontraram valores de umidade (bs) entre (10,47 e 15,03) % (bs) para filmes plastificados à base de amido de milho com (5 a 20) % em peso de glicerol, armazenados a 23 °C e 50 % de UR, durante três dias.

4.2.5 Atividade de água

A Tabela 4.7 mostra os valores médios e os desvios-padrão da atividade de água dos filmes, de acordo com a quantidade de antocianina utilizada e o pH da solução filmogênica, obtidos como descrito no item 3.5.7.

Tabela 4.7 – Atividade de água (a_w) das amostras de filmes à base de amido de mandioca elaborados pelo método *casting*, incorporados com antocianina e ácido cítrico, armazenados a $(25 \pm 1) ^\circ\text{C}$ e 75 % UR.

a_w			
pH	Antocianina ¹		DMS
	0,05	0,10	
2,8	$0,753 \pm 0,003^{aA}$	$0,752 \pm 0,004^{aA}$	0,008
4,3	$0,750 \pm 0,003^{aA}$	$0,753 \pm 0,003^{aA}$	0,007
DMS	0,007	0,008	

¹ g/ 100g de solução filmogênica

* Letras iguais na mesma linha (minúsculas) ou na mesma coluna (maiúsculas) indicam que não há diferença significativa entre os resultados ($P > 0,05$).

A atividade da água (a_w) dos filmes medida a 75 % de UR e $(25 \pm 1) ^\circ\text{C}$ apresentou resultados bastante próximos (0,750 a 0,753); não sendo estatisticamente influenciados pelo teor de antocianina dos filmes nem pelo pH_{sf}. Os valores de a_w , encontrados são inferiores a 0,80, que de acordo com Barbosa-Cánovas et al., (2007) o crescimento de micro-organismos é muito baixo.

4.2.6 Propriedades de cor

As Tabelas 4.8, 4.9 e 4.10 apresentam os valores médios e os desvios-padrão dos parâmetros de cor L^* , a^* , b^* dos filmes, respectivamente, de acordo com a quantidade de antocianina utilizada e o pH da solução filmogênica, obtidos da análise de cor descrita no item 3.5.4.

Tabela 4.8 – Parâmetro de cor L^* de filmes à base de amido de mandioca elaborados pelo método *casting*, incorporados com antocianina e ácido cítrico, armazenados a $(25 \pm 2) ^\circ\text{C}$ e 75 % UR.

L^*			
pH	Antocianina ¹		DMS
	0,05	0,10	
2,8	$58,95 \pm 3,32^{aA}$	$53,13 \pm 1,17^{bA}$	2,31
4,3	$70,04 \pm 2,26^{aB}$	$55,55 \pm 2,00^{bB}$	1,86
DMS	2,41	1,52	

¹ g/ 100g de solução filmogênica

* Letras iguais na mesma linha (minúsculas) ou na mesma coluna (maiúsculas) indicam que não há diferença significativa entre os resultados ($P > 0,05$).

Tabela 4.9 – Parâmetro de cor a^* de filmes à base de amido de mandioca elaborados pelo método *casting*, incorporados com antocianina e ácido cítrico, armazenados a $(25 \pm 2) ^\circ\text{C}$ e 75 % UR.

a^*			
pH	Antocianina ¹		DMS
	0,05	0,10	
2,8	$17,68 \pm 1,30^{aA}$	$30,16 \pm 3,16^{bA}$	2,08
4,3	$13,33 \pm 3,89^{aB}$	$15,22 \pm 1,75^{aB}$	2,66
DMS	2,46	2,31	

¹ g/ 100g de solução filmogênica

* Letras iguais na mesma linha (minúsculas) ou na mesma coluna (maiúsculas) indicam que não há diferença significativa entre os resultados ($P > 0,05$).

Tabela 4.10 – Parâmetro de cor b^* de filmes à base de amido de mandioca elaborados pelo método *casting*, incorporados com antocianina e ácido cítrico, armazenados a $(25 \pm 2) ^\circ\text{C}$ e 75 % UR.

b^*			
pH	Antocianina ¹		DMS
	0,05	0,10	
2,8	$-5,88 \pm 0,55^{aA}$	$-8,60 \pm 1,65^{bA}$	1,05
4,3	$-5,31 \pm 1,17^{aA}$	$-4,89 \pm 1,52^{aB}$	1,17
DMS	0,77	1,45	

¹ g/ 100g de solução filmogênica

* Letras iguais na mesma linha (minúsculas) ou na mesma coluna (maiúsculas) indicam que não há diferença significativa entre os resultados ($P > 0,05$).

Pelos dados obtidos na Tabela 4.8, verificou-se que o aumento do teor de antocianina diminui significativamente o parâmetro L^* , que indica a luminosidade, isto é, os filmes ficaram mais escuros conforme o aumento da concentração de antocianina como já era esperado. Entretanto, o decréscimo do pH_{sf} evidenciou filmes mais escuros, sendo o menor valor do parâmetro L^* apresentado no filme elaborado com menor pH_{sf} e maior nível de antocianina, e o maior valor de L^* (filmes mais claros) foi obtido para aqueles contendo 0,05 g de antocianina e pH_{sf} de 4,3.

Isto ocorre devido ao fato que a antocianina apresenta uma coloração vermelha mais intensa quando em pH abaixo de 3, obtido com a incorporação de ácido cítrico na matriz polimérica, em que a antocianina existe primariamente na forma de cátion flavílio.

É preciso salientar que todos os resultados foram percebidos visualmente como mostrados na Figura 4.4 e Figura 4.5.

Figura 4.4 – Placas de Petri contendo filmes biodegradáveis incorporados com 0,10 g de antocianina/100 g de solução: pH_{sf} 2,8 (A); pH_{sf} 4,3 (B).

Figura 4.5 – Placas de Petri contendo filmes biodegradáveis incorporados com 0,05 g de antocianina/100 g de solução filmogênica: pH_{sf} 2,8 (C); pH_{sf} 4,3 (D).

Na Tabela 4.9, pode-se observar que nas concentrações de antocianina estudadas (0,05 g e 0,10 g) e no pH_{sf} 2,8 o parâmetro a^* (eixo verde – vermelho) da escala Cielab, apresentou variações significativas, segundo ANOVA ($P < 0,05$), sendo maior com o conteúdo maior de antocianina. Os valores positivos do parâmetro a^* indicam a predominância da cor vermelha (Figura 4.4 e 4.5). Como relatado anteriormente uma maior concentração de antocianina acentua a cor vermelha, e com o meio fortemente ácido produz um cátion flavílio da mesma tonalidade, sendo coerentes com a aparência visual dos filmes (TERCI; ROSSI, 2002). Não se encontrou variação significativa no parâmetro a^* dos filmes biodegradáveis no pH_{sf} 4,3 (ver B e D nas Figuras 4.4. e 4.5).

Com relação ao parâmetro b^* (eixo azul – amarelo) da escala Cielab (Tabela 4.10), ANOVA indicou que no pH_{sf} 2,8 a concentração de antocianina influenciou os resultados, sendo menor para a maior quantidade de antocianina.

Observa-se que, no maior teor de antocianina e no menor valor de pH_{sf} , foram obtidos os menores valores do parâmetro b^* .

Os valores negativos do parâmetro b^* indicam a presença da cor azul, indicando uma tendência de cor visual para o roxo, devido à presença não predominante da base quinoidal da antocianina, nos valores de pH estudados.

No entanto, diversos autores afirmam que há uma relação de interação entre os parâmetros a^* e b^* , significando que as alterações de um ou de outro parâmetro estão diretamente relacionados à cor do produto objeto de estudo (WYSZECKI; STILES, 2000; CHOUBERT; BACCAUNAUD, 2006).

4.3 Avaliação do filme como indicador colorimétrico de pH

Como explicado sucintamente no item 3.3, o estudo foi dividido em duas fases para avaliar o potencial dos filmes biodegradáveis como indicador de mudança de pH.

4.3.1 Primeira Fase

Na primeira fase, foram usados no estudo, filmes biodegradáveis obtidos a partir das formulações adicionadas com (0,05 e 0,10) g de antocianina/100g de solução filmogênica. Para isto, porções de peixe cru foram embaladas em béqueres de vidro tampados com o filme de modo que este ficasse a aproximadamente 7 cm de distância do peixe, sendo que béqueres vazios também fechados com o filme foram usados como controle. Os béqueres foram acondicionados sob refrigeração (4 ± 1) °C e em temperatura ambiente (26 ± 2) °C. A fim de acompanhar o produto (peixe) até sua decomposição foram realizadas a cada 24 h, a análise de cor do mesmo filme e o registro da temperatura de armazenamento.

Observou-se que a cor dos filmes adicionados com dois teores diferentes de antocianina, armazenados a duas diferentes temperaturas ao longo do tempo alterou como era esperado, com mudança nos parâmetros de cor L^* , a^* , b^* e dE^* do material, indicando correlação entre alterações de coloração e a deterioração do produto.

ANOVA indicou que tanto o teor de antocianina quanto a temperatura e o tempo de armazenamento influenciaram significativamente a luminosidade L^* de todos os filmes usados na embalagem do peixe.

Como mostrado na Tabela 4.11, o L^* diminuiu conforme aumentou o teor de antocianina, visto que a sua presença deixa os filmes mais escuros.

A temperatura e tempo de estocagem também alteraram significativamente o L^* dos filmes, uma vez que armazenados sob refrigeração (4 °C) o valor de L^* se mostrou maior para estes filmes do que para aqueles armazenados à temperatura ambiente (26 °C). Na Tabela 4.11 é possível observar duas grandes mudanças no parâmetro L^* dos filmes com o tempo de estocagem, e as mudanças neste parâmetro na transição entre os dois grupos.

Tabela 4.11 – Parâmetros de cor L^* , a^* , b^* e dE^* dos filmes à base de amido de mandioca incorporados com antocianina elaborados pelo método *casting*, durante sua estocagem em temperatura ambiente (26 °C) e sob refrigeração (4 °C), utilizados como embalagem de peixe.

Fator	L^*	a^*	b^*	dE^*
Antocianina [g/100g de solução]				
0,05	70,30 ± 5,29 ^a	2,48 ± 1,47 ^a	-1,91 ± 1,17 ^a	6,98 ± 2,80 ^a
0,10	55,36 ± 4,62 ^b	8,38 ± 5,92 ^b	-4,67 ± 1,54 ^b	14,50 ± 5,72 ^b
DMS	2,04	2,06	0,46	1,85
Temperatura [°C]				
4	64,00 ± 10,10 ^A	6,32 ± 0,69 ^A	-3,80 ± 0,15 ^A	13,13 ± 6,25 ^A
26	61,19 ± 7,14 ^B	4,54 ± 0,85 ^A	-2,79 ± 0,19 ^B	11,17 ± 5,69 ^B
DMS	2,16	2,19	0,48	1,96
Tempo [dias]				
0	65,37 ± 4,81 ¹	10,47 ± 4,53 ¹	-4,25 ± 1,29 ¹	5,29 ± 1,16 ¹
1	60,70 ± 8,88 ¹	6,49 ± 5,19 ²	-3,81 ± 1,42 ¹	10,50 ± 5,08 ²
2	61,18 ± 10,12 ^{1,2}	4,03 ± 2,04 ²	-3,67 ± 2,12 ¹	12,50 ± 5,52 ²
3	62,57 ± 10,33 ^{1,2}	3,43 ± 0,56 ²	-2,40 ± 0,24 ²	12,90 ± 5,89 ²
4	64,60 ± 10,05 ²	2,36 ± 0,51 ²	-2,33 ± 0,89 ²	12,40 ± 6,85 ²
DMS	4,29	4,34	0,96	3,89

* Letras minúsculas iguais na mesma coluna indicam que não há diferença significativa com relação ao conteúdo de antocianina ($P > 0,05$ teste de Tukey).

* Letras maiúsculas iguais na mesma coluna indicam que não há diferença significativa com relação à temperatura ($P > 0,05$ teste de Tukey).

* Números iguais sobrescritos na mesma coluna indicam que não há diferença significativa com relação ao tempo de estocagem ($P > 0,05$ teste de Tukey).

A Figura 4.6 mostra um decréscimo no L^* ao longo do tempo de estocagem à temperatura ambiente. Sob refrigeração os filmes apresentaram um decréscimo no

L^* até o primeiro dia de estocagem, a partir do qual o L^* aumentou. Os filmes sob refrigeração se mostraram mais pegajosos e de difícil manuseio, o que pode ser explicado pela absorção de umidade destes dentro do refrigerador, a qual é maior do que no ambiente. Como os filmes são higroscópicos a umidade absorvida interferiu nas suas propriedades, entre elas, o parâmetro L^* .

Figura 4.6 – Luminosidade L^* de filmes biodegradáveis incorporados com (0,05 e 0,10) g de antocianina/100 g de solução filmogênica durante sua estocagem em temperatura ambiente (26 °C) e sob refrigeração (4 °C) utilizados como embalagem de peixe.

Com relação ao parâmetro a^* (eixo verde – vermelho) dos filmes, ANOVA apresentou diferenças estatisticamente significativas tanto para o teor de antocianina quanto para o tempo de armazenamento e não evidenciou influência significativa para este parâmetro quando variou-se a temperatura de estocagem, embora filmes armazenados a 26 °C apresentassem valores menores para a^* do que os armazenados a 4 °C (Tabela 4.11).

O parâmetro a^* é o fator mais importante na avaliação da atividade indicadora de pH dos filmes biodegradáveis incorporados com antocianina obtidos neste trabalho, devido à evidente componente vermelha presente nos mesmos.

Como explicado no item 4.2.6, o parâmetro a^* apresentou valores positivos para ambos os teores de antocianina, sendo significativamente maiores quando incorporada a maior concentração do pigmento na matriz polimérica.

Por outro lado, fica evidente que o parâmetro a^* foi fortemente influenciado pelo tempo de estocagem dos filmes usados na embalagem do peixe, e que todos os valores de a^* diminuíram ao longo do tempo, evidenciando a perda do componente vermelho do filme, como já era esperado.

No entanto, se observa que no filme com 0,05 g de antocianina/100g e armazenado a 26 °C, a queda do parâmetro a^* foi menos evidenciada (Figura 4.7).

Figura 4.7 – Parâmetro de cor a^* de filmes biodegradáveis incorporados com (0,05 e 0,10) g de antocianina/100 g de solução filmogênica durante sua estocagem em temperatura ambiente (26 °C) e sob refrigeração (4 °C) utilizados como embalagem de peixe.

Este comportamento era justamente o esperado, já que quando o peixe se deteriora ele libera uma variedade de aminas voláteis básicas como trimetilamina (TMA), amônia (NH_3) e dimetilamina (DMA) conhecidas como nitrogênio básico volátil total (TVB-N, do inglês *Total Volatile Basic Nitrogen*) e são as substâncias liberadas em peixes depois de ter passado a sua fase inicial de frescura (PACQUIT et al., 2006).

Essas substâncias apresentam um pH básico detectado pelas antocianinas contidas na embalagem, obtendo como resposta a mudança de cor das mesmas, com perda significativa da sua componente vermelha.

Pesquisas em peixes marinhos recém-capturados estudados imediatamente após o transporte mostram que o conteúdo de TVB-N não muda quando eles estão frescos (OEHLENSCHLÄGER, 1997).

Com o tempo, os níveis de TVB-N aumentam como resultado do metabolismo bacteriano. Peixe fresco e frutos do mar abrigam uma microbiota bastante heterogênea. Porém, durante o armazenamento, pode haver a multiplicação de um grupo de bactérias específicas, conhecidas como organismos de deterioração específicos (SSO, do inglês *Specific Spoilage Organisms*), que supera os outros deteriorantes e tornam as mudanças químicas mais frequentes. Em peixes de água doce, temperados e armazenados em condições refrigeradas (0 - 4) °C, os SSO típicos envolvidos são *Pseudomonas* spp. e *Shewanella putrefaciens* (HUSS, DALGAARD, GRAM, 1997).

Deste modo, as substâncias nitrogenadas fazem com que o pH do meio fique alcalino e possa ser detectado com indicadores de pH apropriados. Nesse sentido, as antocianinas são pigmentos com grande potencial para uso em rótulos indicadores de pH colorimétricos, pois elas são encontradas em diferentes formas químicas que dependem do pH do meio em que estão presentes.

As antocianinas e antocianidinas estão sujeitas a transformações químicas em meio aquoso no estado fundamental, envolvendo uma série de equilíbrios reversíveis e dependentes do pH do meio, explicados no item 2.6.2. Todas estas transformações provocam profundas mudanças na coloração das antocianinas.

Em condições ácidas (pH inferior a 3), a antocianina está na forma de cátion flavílio, de cor vermelha intensa. Com o aumento do pH ocorre a desprotonação do cátion flavílio que resulta na formação da base quinoidal, azul ou violeta. Em paralelo ocorre a hidratação do cátion flavílio, gerando a pseudobase incolor ou carbinol que atinge o equilíbrio lentamente com a chalcona incolor ou amarelo pálido (BROUILLARD; DUBOIS, 1977).

As quantidades relativas de cátion (AH^+), formas quinoidais (A), pseudobase (B) e chalcona (C) na condição de equilíbrio variam conforme o pH e a estrutura da antocianina (IACOBUCCI; SWEENEY, 1983).

O cátion flavílio e a base quinoidal são os únicos componentes que absorvem na região visível, sendo que o cátion sempre absorve em comprimentos de onda menores que a base (FREITAS, 2005).

A estabilidade das antocianidinas (agliconas) é influenciada pelos substituintes do seu terceiro anel aromático e a presença de grupos adicionais hidroxila ou metoxila diminuem a estabilidade da aglicona em meio neutro (FLESCHHUT et al, 2006). Em contraste com agliconas, monoglicosídeos, e

principalmente, derivados diglicosídeos são mais estáveis em condições de pH neutro (FLESCHHUT et al., 2006).

Estudos sobre a estabilidade das antocianinas e a variação de cor com o pH mostram que as alterações na cor desses compostos são mais significativas na região alcalina devido à sua instabilidade (CABRITA, FOSSEN, ANDERSEN, 2000; MARKAKIS, 1982).

Com relação ao parâmetro b^* (eixo azul – amarelo) dos filmes, ANOVA indicou que todos os resultados apresentaram diferenças estatisticamente significativas tanto para o teor de antocianina quanto para o tempo e temperatura de armazenamento, apresentando valores negativos que indicam uma pequena tendência dos filmes à cor azul (Tabela 4.11). Observou-se, que no maior teor de antocianina (0,10 g), e na menor temperatura de estocagem (4 °C), o parâmetro b^* apresentou os menores valores, como é apresentado na Figura 4.8.

Foi possível observar um sutil incremento no parâmetro b^* de todas as amostras ao longo do tempo de estocagem, especialmente a partir do segundo dia, excetuando a formulação (0,10 g Antocianina a 4 °C) que sofreu uma queda neste parâmetro entre o primeiro e segundo dia de armazenamento, seguido de seu aumento.

No início dos testes, todos os valores mostraram-se negativos (azuis) e com o tempo, tenderam para valores positivos (amarelos). Isto ocorreu possivelmente devido a que o nitrogênio básico volátil total (TVB-N) originado pela deterioração do peixe, alcalinizou o meio. Como acima citado, com o aumento do pH ocorre a desprotonação do cátion flavílio que resulta na formação da base quinoidal, azul ou violeta, e em paralelo ocorre a hidratação do cátion flavílio, gerando a pseudobase incolor ou carbinol que atinge o equilíbrio lentamente com a chalcona incolor ou amarelo pálido (BROUILLARD; DUBOIS, 1977).

Figura 4.8 – Parâmetro de cor b^* de filmes biodegradáveis incorporados com (0,05 e 0,10) g de antocianina/100 g de solução filmogênica durante sua estocagem em temperatura ambiente (26 °C) e sob refrigeração (4 °C) utilizados como embalagem de peixe.

Como mostrado na Tabela 4.11, ANOVA indicou que tanto o teor de antocianina quanto a temperatura e o tempo de armazenamento influenciaram significativamente a diferença total de coloração (dE^*) de todos os filmes testados nesta fase.

Como era esperado, a dE^* aumentou significativamente com o aumento da concentração de antocianina, visto que é o pigmento responsável pela coloração apresentada nos filmes, e portanto, da mudança de cor dos mesmos.

A temperatura de estocagem também alterou significativamente a dE^* dos filmes, uma vez que armazenados a temperatura ambiente (26 °C) a degradação do peixe é acelerada, produzindo assim maior quantidade de TVB-N, significando em uma elevação do pH do meio, e portanto, mudando mais rapidamente de cor, do que os filmes armazenados a 4 °C.

Por outro lado, é possível observar duas grandes mudanças no parâmetro dE^* dos filmes com o tempo de estocagem, fortemente afetado pelo parâmetro a^* (eixo verde – vermelho), no qual a maior alteração de coloração dos mesmos ocorreu entre o primeiro e segundo dia de estocagem, manifestado pela perda de coloração vermelha para azul/cinza dos filmes, que gradativamente ficaram mais escuros ao longo do tempo de armazenamento.

Na Figura 4.9 é claramente visível que a maior alteração de coloração dos filmes ocorreu naqueles com maior teor de antocianina incorporada na matriz polimérica.

Figura 4.9 – Diferença total de coloração dE^* de filmes biodegradáveis incorporados com (0,05 e 0,10) g de antocianina/100 g de solução filmogênica durante sua estocagem em temperatura ambiente (26 °C) e sob refrigeração (4 °C) utilizados como embalagem de peixe.

Nas Figuras 4.10 e 4.11 é possível verificar que a mudança de cor foi detectada ao olho nu, confirmando os resultados obtidos pela análise de cor.

Figura 4.10 - Béqueres contendo peixes (lado esquerdo da foto) comparados com os béqueres controle (lado direito da foto) armazenados a 26 °C utilizando filmes contendo (0,05 e 0,10) g de antocianina/100 g de solução filmogênica, ao longo do armazenamento.

Figura 4.11 - Béqueres contendo peixes (lado esquerdo da foto) comparados com os béqueres controle (lado direito da foto) armazenados a 4 °C utilizando filmes contendo (0,05 e 0,10) g de antocianina/100 g de solução filmogênica, após quatro dias de armazenamento.

4.3.2 Segunda Fase

Na segunda fase, foram usados filmes contendo 0,10 g de antocianina/100 g de solução filmogênica com pH (2,8 e 4,3). Desta vez, as porções do peixe cru foram embaladas em recipientes de vidro tampados com o filme de modo que este ficasse a 13 cm de distância do peixe, aos quais se sobrepôs uma tampa metálica. Os recipientes foram acondicionados em temperaturas de $(6 \pm 1) ^\circ\text{C}$ e de $(12 \pm 1) ^\circ\text{C}$, simulando as condições de armazenamento no mercado. Recipientes vazios tampados nas mesmas condições foram utilizados como controle. O estudo da F2 foi realizado durante três dias como é mostrado nas Tabelas 4.12 e 4.13 e nas Figuras 4.12, 4.13, 4.14 e 4.15.

A fim de acompanhar o produto (peixe) até sua decomposição, a cada 24 h foram realizadas a análise de cor do mesmo filme e o registro da temperatura de armazenamento, e a medição do pH do produto (peixe).

Tabela 4.12 – pH do peixe e parâmetros de cor L^* , a^* , b^* e dE^* de filmes à base de amido de mandioca, com pH_{sf} 2,8, incorporados com antocianina e ácido cítrico, elaborados pelo método *casting*, durante sua estocagem a $6 ^\circ\text{C}$ e $12 ^\circ\text{C}$, utilizados como embalagem de peixe.

Fator	L^*	a^*	b^*	dE^*	pH_{peixe}
T [$^\circ\text{C}$]					
6	$59,37 \pm 8,72^A$	$28,98 \pm 5,83^A$	$-7,19 \pm 0,96^A$	$9,40 \pm 7,92^A$	$6,94 \pm 0,56^A$
12	$54,25 \pm 3,20^B$	$17,55 \pm 10,94^B$	$-6,43 \pm 1,89^A$	$15,13 \pm 9,80^B$	$7,21 \pm 0,70^B$
DMS	2,23	3,15	1,18	2,21	0,033
t [dias]					
0	$52,76 \pm 1,10^1$	$29,49 \pm 3,82^1$	$-7,91 \pm 1,22^1$	$3,60 \pm 2,55^1$	$6,42 \pm 0,02^1$
1	$63,13 \pm 11,42^2$	$31,05 \pm 6,12^1$	$-7,15 \pm 1,39^1$	$13,61 \pm 8,13^2$	$6,68 \pm 0,06^2$
2	$56,52 \pm 2,41^1$	$18,55 \pm 10,85^2$	$-6,04 \pm 1,47^1$	$13,90 \pm 10,44^{2,3}$	$7,24 \pm 0,39^3$
3	$54,81 \pm 3,35^1$	$13,97 \pm 8,69^2$	$-6,13 \pm 1,45^1$	$17,95 \pm 8,53^3$	$7,95 \pm 0,14^4$
DMS	4,25	1,49	2,25	4,21	0,063

* Letras maiúsculas iguais na mesma coluna indicam que não há diferença significativa com relação à temperatura ($P > 0,05$ teste de Tukey).

* Números iguais sobrescritos na mesma coluna indicam que não há diferença significativa com relação ao tempo de estocagem ($P > 0,05$ teste de Tukey).

Tabela 4.13 – pH do peixe e parâmetros de cor L^* , a^* , b^* e dE^* de filmes à base de amido de mandioca, com pH_{sf} 4,3, incorporados com antocianina, elaborados pelo método *casting*, durante sua estocagem a 6 °C e 12 °C, utilizados como embalagem de peixe.

Fator	L^*	a^*	b^*	dE^*	pH_{peixe}
T [°C]					
6	51,44 ± 2,54 ^A	8,72 ± 6,07 ^A	-3,38 ± 0,83 ^A	7,90 ± 5,15 ^A	6,96 ± 0,55 ^A
12	54,81 ± 4,28 ^B	6,87 ± 6,27 ^B	-3,29 ± 0,97 ^A	9,10 ± 5,64 ^B	7,22 ± 0,70 ^B
DMS	1,21	0,98	0,40	0,64	0,035
t [dias]					
0	55,29 ± 0,86 ¹	14,54 ± 1,00 ¹	-4,17 ± 0,23 ¹	1,16 ± 0,50 ¹	6,44 ± 0,03 ¹
1	55,32 ± 6,32 ¹	12,65 ± 2,14 ¹	-3,76 ± 0,28 ^{1,2}	6,24 ± 1,42 ²	6,70 ± 0,07 ²
2	51,53 ± 1,51 ²	2,04 ± 1,19 ²	-3,29 ± 0,25 ²	13,02 ± 1,08 ³	7,26 ± 0,39 ³
3	50,36 ± 1,26 ²	1,96 ± 1,11 ³	-2,13 ± 0,78 ³	13,58 ± 0,71 ³	7,97 ± 0,16 ⁴
DMS	2,31	1,87	0,77	1,22	0,067

* Letras maiúsculas iguais na mesma coluna indicam que não há diferença significativa com relação à temperatura ($P > 0,05$ teste de Tukey).

* Números iguais sobrescritos na mesma coluna indicam que não há diferença significativa com relação ao tempo de estocagem ($P > 0,05$ teste de Tukey).

Nas Tabelas 4.12 e 4.13 é possível observar que todos os filmes adicionados com antocianina com pH_{sf} 2,8 e 4,3, respectivamente, armazenados a temperaturas de 6 °C e 12 °C ao longo do tempo de estocagem do peixe, reagiram, como era esperado, com mudanças significativas ($P < 0,05$) nos parâmetros de cor L^* , a^* e dE^* do material, conforme houve mudança no pH do peixe, indicando correlação entre alterações de coloração dos filmes e mudanças no pH do produto embalado (peixe). ANOVA indicou que somente o parâmetro b^* não apresentou diferenças estatisticamente significativas ao longo do tempo de armazenamento nos filmes com pH_{sf} 2,8, isto é, em filmes com a incorporação de ácido cítrico na matriz polimérica.

A análise estatística demonstrou que tanto a temperatura quanto o tempo de armazenamento de ambos os filmes adicionados com antocianina com pH_{sf} 2,8 e 4,3 mostrados nas Tabelas 4.12 e 4.13, respectivamente, influenciaram significativamente a luminosidade L^* dos filmes.

Observou-se que o aumento da temperatura de estocagem dos filmes com pH_{sf} 2,8 diminuiu significativamente os valores do parâmetro L^* , expressando um escurecimento dos filmes incorporados com ácido cítrico (Tabela 4.12). O contrário ocorreu nos filmes com pH_{sf} 4,3, que se tornaram um pouco mais claros quando a temperatura foi maior pelo aumento no valor de L^* (Tabela 4.13).

A análise de variância mostrou que o tempo de estocagem também alterou significativamente o parâmetro L^* dos filmes, sendo possível observar um aumento considerável nos seus valores somente no primeiro dia de estocagem dos filmes com pH_{sf} 2,8 (Tabela 4.12). Por outro lado, esta mesma análise indicou que o parâmetro L^* dos filmes com pH_{sf} 4,3 ao longo do tempo de estocagem diminuiu significativamente de 55,29 para 50,36 (Tabela 4.13).

As mudanças ao longo do tempo do parâmetro L^* das diferentes formulações e temperaturas de estocagem dos filmes embalando peixe são mostradas na Figura 4.12.

Nos filmes pH_{sf} 2,8 a 6 °C e pH_{sf} 4,3 a 12 °C, observou-se um aumento na luminosidade L^* no início, seguido de queda e mantendo-se estável pelos 2 dias. Entretanto, os filmes com pH_{sf} 2,8 a 12 °C e 4,3 a 6 °C apresentaram um comportamento oscilatório, não indicando estabilidade dos valores de L^* .

Embora a luminosidade L^* tenha apresentado diferenças estatisticamente significativas em todos os dias de estocagem, somente a partir do 2º dia de armazenamento, essas mudanças foram visualmente perceptíveis, tornando-se mais escuro.

Figura 4.12 – Luminosidade L^* dos filmes biodegradáveis incorporados com 0,10 g de antocianina/100 g de solução filmogênica, com pH_{sf} de 2,8 e 4,3, durante sua estocagem a 6 °C e 12 °C, utilizados como embalagem de peixe.

Com relação ao parâmetro a^* (eixo verde – vermelho) dos filmes usados na embalagem do peixe, ANOVA indicou que tanto a temperatura quanto o tempo de armazenamento, alteraram significativamente esse parâmetro (Tabelas 4.12 e 4.13).

Nas Tabelas 4.12 e 4.13, observa-se que o aumento da temperatura de estocagem de 6 °C para 12 °C dos filmes com pH_{sf} 2,8 e 4,3 diminuiu significativamente os valores do parâmetro a^* .

Pode-se notar claramente, que os valores de a^* são significativamente maiores em pH_{sf} 2,8 do que em pH_{sf} 4,3, devido às soluções de antocianinas apresentarem uma coloração vermelha intensa quando em pH abaixo de 3, por existirem primariamente na forma de cátion flavílio, como explicado no item 4.3.1.

Por outro lado, ANOVA mostrou que o tempo de estocagem influenciou significativamente o parâmetro a^* tanto dos filmes com pH_{sf} 2,8 quanto aqueles com pH_{sf} 4,3, apresentando maior variação nos últimos, em que pode ser observada uma diminuição significativa a partir do 2º dia de armazenamento.

Embora ANOVA tenha apresentado diferenças estatisticamente significativas ($P < 0,05$) no parâmetro a^* para todos os filmes e temperaturas de estocagem, somente foi possível verificar visualmente variação da cor nos filmes com pH_{sf} 4,3, isto é, em filmes sem incorporação de ácido cítrico na matriz polimérica. Em filmes com pH_{sf} 2,8 armazenados a 6 °C não foi possível perceber visualmente mudanças na coloração ao longo do tempo, isto é devido à presença de ácido cítrico incorporado na matriz polimérica, que acidifica fortemente o meio, no qual o cátion flavílio das antocianinas é termodinamicamente estável (FREITAS, 2005).

A Figura 4.13 apresenta a variação do parâmetro a^* em função do tempo de estocagem, onde é possível observar que os filmes com pH_{sf} 2,8 a 6 °C apresentaram os maiores valores do parâmetro a^* ao longo do tempo de estocagem. O aumento dos valores no parâmetro a^* dos filmes com pH_{sf} 2,8 até o 1º dia, pode ser atribuído ao ácido cítrico incorporado na matriz polimérica dessas formulações, visto que ácidos orgânicos atuam como copigmento das antocianinas.

A copigmentação intermolecular é um fenômeno em que pigmentos e outros compostos orgânicos incolores, ou íons metálicos, formam moléculas ou associações complexas, gerando um aumento na intensidade da cor (efeito hiperacrômico) ou um deslocamento no comprimento máximo de absorção (efeito batocrômico) (BOULTON, 2001; MAZZA; BROUILLARD, 1987).

Os copigmentos podem ser ácidos orgânicos, flavonóides, alcalóides, aminoácidos, nucleotídeos, polissacarídeos, metais ou outra antocianina (ASEN; STEWART; NORRIS, 1972; MAZZA; BROUILLARD, 1987).

A presença de flavonóides não antociânicos podem proteger as antocianinas contra a degradação. Stringheta (1991) relatou que o aumento da quantidade de ácido tânico propiciou um acréscimo proporcional na estabilidade das antocianinas presentes, com uma redução significativa nos seus níveis de degradação.

A intensidade dos efeitos de copigmentação depende de vários fatores, incluindo tipo e concentração de antocianinas e copigmentos, pH e temperatura do solvente. O valor de pH para uma copigmentação máxima está em torno de 3,5 e pode variar ligeiramente em função do sistema pigmento-copigmento (RIBEIRO; SERAVALLI, 2004).

Por outro lado, filmes com pH_{sf} 4,3 apresentaram comportamento similar independente da temperatura de estocagem, em que os valores a^* decresceram ao longo do tempo de armazenamento, com posterior estabilização deste parâmetro até o dia 3. De todos os filmes estudados, os filmes pH_{sf} 4,3 a 12 °C foram os que apresentaram os menores valores do parâmetro a^* em todos os tempos de estocagem, isto devido à evidente perda do componente vermelho dos filmes, como resposta à rápida deterioração do peixe nessa temperatura de estocagem.

Assim, filmes com pH_{sf} 4,3 mostraram-se bastante efetivos na indicação do aumento de pH do peixe, manifestado pela mudança de cor, como consequência do incremento de TVB-N liberado no início da sua deterioração (OEHLenschläger, 1997; PACQUIT et al., 2006), como explicado no item 4.3.1.

Com relação ao parâmetro b^* (eixo azul – amarelo) dos filmes utilizados na embalagem do peixe, não foi observada alteração significativa neste parâmetro com a temperatura de estocagem, para nenhuma das formulações estudadas. Por outro lado, ANOVA apresentou diferenças estatisticamente significativas no parâmetro b^* dos filmes com o tempo de armazenamento, somente para filmes com pH_{sf} 4,3, isto é, para filmes sem incorporação de ácido cítrico, como mostrado nas Tabelas 4.12 e 4.13.

Figura 4.13 – Parâmetro a^* dos filmes biodegradáveis incorporados com 0,10 g de antocianina/100 g de solução filmogênica, com pH_{sf} de 2,8 e 4,3, durante sua estocagem a 6 °C e 12 °C, utilizados como embalagem de peixe.

Na Tabela 4.13 é possível observar o aumento do parâmetro b^* dos filmes com pH_{sf} 4,3 ao longo do tempo de estocagem do peixe, ficando evidente a perda do componente azul dos filmes.

Na Figura 4.14, pode-se observar que todos os filmes estudados apresentaram valores negativos no parâmetro b^* , indicando a componente azul dos filmes incorporados com antocianina, sendo que os filmes com pH_{sf} 4,3 apresentaram os maiores valores do parâmetro b^* .

A tendência dos filmes de perderem o componente azul com o tempo de estocagem, ocorre provavelmente porque, como explicado no item 4.3.1, o TVB-N produto da deterioração do peixe, alcaliniza o meio. Com o incremento do pH ocorre a desprotonação do cátion flavílio que resulta na formação da base quinoidal, azul ou violeta, e em paralelo ocorre a hidratação do cátion flavílio, gerando a pseudobase incolor ou carbinol que atinge o equilíbrio lentamente com a chalcona levemente amarela (BROUILLARD; DUBOIS, 1977).

As quantidades relativas de cátion (AH^+), formas quinoidais (A), pseudobase (B) e chalcona (C) na condição de equilíbrio variam conforme o pH e a estrutura da antocianina (IACOBUCCI; SWEENEY, 1983).

Figura 4.14 – Parâmetro b^* dos filmes biodegradáveis incorporados com 0,10 g de antocianina/100 g de solução filmogênica, com pH_{sf} de 2,8 e 4,3, durante sua estocagem a 6 °C e 12 °C, utilizados como embalagem de peixe.

Nas Tabelas 4.12 e 4.13, a análise de variância mostrou que o aumento da temperatura de estocagem e do tempo de armazenamento de ambos os filmes com pH_{sf} (2,8 e 4,3) incrementou significativamente a diferença total de coloração dE^* .

A Tabela 4.12 evidencia que em filmes com pH_{sf} 2,8, o parâmetro dE^* apresentou um incremento significativo de 3,60 para 17,95, porém esta variação só foi perceptível visualmente nos filmes pH_{sf} 2,8 armazenados a 12 °C após o segundo dia de estocagem.

Em filmes com pH_{sf} 4,3 o parâmetro dE^* aumentou significativamente, de 1,16 para 13,58 (Tabela 4.13). As mudanças na coloração destes filmes foram confirmadas visualmente pela nítida alteração de cor nos sistemas.

As mudanças ao longo do tempo do parâmetro dE^* das diferentes formulações e temperaturas de estocagem dos filmes embalando peixe são mostradas na Figura 4.15.

Os filmes pH_{sf} (4,3_6 °C e 4,3_12 °C), apresentaram um comportamento similar em que ocorreu um incremento significativo no parâmetro dE^* , seguido da estabilidade nos valores deste parâmetro. Comportamento similar foi observado nos filmes pH_{sf} 2,8_12 °C com comportamento muito similar ao parâmetro L^* (ver Figura 4.12).

Por outro lado, filmes com pH_{sf} 2,8_6 °C apresentaram comportamento oscilatório. Nenhuma referência foi encontrada na literatura relatando o mesmo efeito em filmes poliméricos incorporados com antocianina e ácido cítrico.

Figura 4.15 – Diferença total de coloração dE^* dos filmes biodegradáveis incorporados com 0,10 g de antocianina/100 g de solução filmogênica, com pH_{sf} de 2,8 e 4,3, durante sua estocagem a 6 °C e 12 °C, utilizados como embalagem de peixe.

Ao avaliar o efeito da temperatura e tempo de armazenamento no pH do peixe, ANOVA mostrou que o incremento de ambos os fatores ocasionou um acréscimo no pH do mesmo (Tabela 4.12 e Tabela 4.13).

A Figura 4.16 apresenta as mudanças no pH do peixe ao longo do tempo, nas diferentes temperaturas de estocagem.

Como observado na Figura 4.16, o valor médio encontrado de pH em ambas as temperaturas de estocagem no dia 0 foi de 6,43, os quais mudaram para 7,82 e 8,09, em temperaturas de 6 °C e 12 °C, respectivamente, no terceiro dia de armazenamento.

Figura 4.16 – Potencial Hidrogeniônico (pH) do peixe do tipo pescada-branca (*Cynoscion leiarchus*) em estado fresco e cru, durante sua estocagem em temperatura de $(6 \pm 2) ^\circ\text{C}$ e $(12 \pm 2) ^\circ\text{C}$.

Estes resultados já eram esperados, uma vez que a deterioração do peixe, aumenta o pH para níveis mais elevados devido à decomposição de aminoácidos e da ureia e à desaminação oxidativa da creatina (LEITÃO, 1988). O aumento do pH é afetado pela espécie do peixe, tipo e carga microbiana, história do peixe, métodos de captura, manuseio e armazenamento (ASHIE; SMITH; SIMPSON, 1996).

A conservação do peixe apresenta muitos problemas, uma vez que a decomposição ocorre rapidamente, fazendo com que o peixe seja considerado um dos produtos de origem animal mais susceptível ao processo deteriorativo (LEITÃO, 1984).

Ogawa e Maia (1999) descreveram que as modificações de pH do peixe são ocasionadas pela sua decomposição. A atividade enzimática e a ação das bactérias modificam a concentração de íons de hidrogênio livre. Em geral, valores de pH próximo a 7,0 são indicativos de decomposição. À medida que os valores passam de neutros e alcalinos, o produto torna-se impróprio para o consumo.

Montagner *et al.* (2003) em seus estudos sobre os efeitos do armazenamento de corvina (*Micropogonias furnieri*) a uma temperatura de 4°C , apresentaram um pH de 6,5 no primeiro dia, atingindo o pH máximo permitido na legislação ao sexto dia com pH 6,8, limite tolerável para o consumo do peixe.

Sales; Oliveira e Costa (1988) avaliaram o pH de algumas espécies de pescado, os quais foram lavados com água corrente e acondicionados em caixas de isopor, com gelo, em camadas alternadas, na proporção de 25 kg de gelo para 1 kg

de peixe, durante 20 dias. Os valores encontrados para o pH do músculo de pescado eviscerado, variaram de 6,70 a 7,08 para a tilápia (*Oreochromis spp.*), 6,78 a 7,95 para o tucunaré (*Cichla temensis*) e 6,80 a 8,20 para a pescada do Piauí (*Cynoscion sp.*).

Comparando a pescada do Piauí (*Cynoscion sp.*) com a pescada-branca utilizada neste estudo (*Cynoscion leiarchus*), nota-se que, os valores de pH da pescada-branca usados no presente trabalho, foram sempre inferiores tanto no início como no fim do armazenamento.

Lahiry, Moorjani e Baliga (1963) afirmaram que enquanto avança a deterioração bacteriana, há acúmulo de produtos de natureza básica, tais como TMA, DMA, amônia e algumas bases orgânicas, por isso, os valores de pH dos músculos do pescado aumentam de forma lenta no início e rapidamente no final da deterioração. Porém, mudanças de pH, devido à deterioração bacteriana, diferem marcadamente com a variedade do pescado e da época do ano.

A legislação brasileira considera deteriorado e, portanto, impróprio para o consumo, o peixe com pH da carne externa superior ou igual a 6,8, e da carne interna superior ou igual a 6,5, segundo o decreto - Lei n.º 30.691, artigo 44 do RIISPOA (BRASIL, 1952).

Figura 4.17 – Parâmetro a^* dos filmes biodegradáveis incorporados com 0,10 g de antocianina/100 g de solução, com pH_{sf} (2,8 e 4,3), correlacionado com o pH do peixe ao longo do tempo de estocagem a 6 °C.

Figura 4.18 – Parâmetro a^* dos filmes biodegradáveis incorporados com 0,10 g de antocianina/100 g de solução, com pH_{sf} (2,8 e 4,3), correlacionado com o pH do peixe ao longo do tempo de estocagem a 12 °C.

As Figuras 4.17 e 4.18, apresentam a correlação do parâmetro de cor a^* com o pH do peixe ao longo do tempo de estocagem armazenado a 6 °C e 12 °C, respectivamente. Foi escolhido o parâmetro a^* visto que é o mais influente na coloração dos filmes incorporados com antocianina apresentados neste estudo.

Como pode ser observado nas Figuras 4.17 e 4.18, a alteração do parâmetro de cor a^* foi diretamente correlacionado com a mudança de pH do peixe, causada pela sua deterioração.

Filmes com pH_{sf} 4,3, isto é, filmes sem incorporação de ácido cítrico na matriz polimérica, acompanharam satisfatoriamente a alteração do pH do peixe, como era desejado, apresentando uma queda significativa nos seus valores com tendência a zero, assim mostrando a perda da coloração vermelha de ambos os filmes armazenados a 6 °C e 12 °C, nitidamente perceptíveis ao olho nu. A alteração de cor dos filmes foi pronunciada com o incremento do pH do peixe no dia 2, em que os filmes com pH_{sf} 4,3 apresentaram coloração cinza-azulada.

Nesse dia de estocagem, o peixe atingiu um pH de $7,26 \pm 0,39$, encontrando-se muito acima do limite estabelecido pela legislação brasileira. Segundo RIISPOA (Brasil, 1952) um peixe fresco deve apresentar pH inferior a 6,8. Deste modo, conclui-se que no dia 2 de estocagem o peixe estava deteriorado e, portanto,

impróprio para o consumo, e que ambos os filmes com pH_{sf} 4,3, apresentaram-se excelentes indicadores dessa mudança de pH no peixe.

Por outro lado, filmes com pH_{sf} 2,8 apresentaram uma tendência similar àqueles com pH_{sf} 4,3, embora o filme (pH_{sf} 2,8_6 °C) tenha apresentado um leve acréscimo não significativo no dia 1 de estocagem, os demais valores do parâmetro a^* também decresceram conforme incrementou-se o pH do peixe. Não obstante, o detrimento no parâmetro a^* (perda de coloração vermelha) só foi possível de se constatar visualmente no dia 3 de estocagem, para aqueles filmes armazenados a 12 °C (pH_{sf} 2,8_12 °C) e pouca ou nenhuma alteração visual foi percebida nos filmes estocados a 6 °C (Figuras 4.17 e 4.18).

Como sucintamente explicado no item 4.3.1, o ácido cítrico incorporado nos filmes com pH_{sf} 2,8, estabiliza a antocianina e reduz significativamente o potencial indicador dos filmes incorporados com este pigmento.

Todas as observações realizadas anteriormente são nitidamente visíveis na Figura 4.19, que ilustra os recipientes contendo peixe quando comparados com os recipientes controle armazenados em temperaturas de 6 °C e 12 °C, utilizando filmes biodegradáveis contendo 0,10 g de antocianina/100 g de solução com pH_{sf} (2,8 e 4,3).

Figura 4.19 – Recipientes contendo peixe (lado esquerdo) comparados com os recipientes controle (lado direito) armazenados a (6 e 12) °C, utilizando filmes biodegradáveis contendo 0,10 g de antocianina/100 g de solução com pH_{sf} (2,8 e 4,3), ao longo do tempo de estocagem. Na parte inferior, pH do peixe mostrando a sua frescura (verdes) ou deterioração (vermelhos), segundo a legislação brasileira.

	Dia 0	Dia 1	Dia 2	Dia 3
pH _{sf} 2,8_6 °C	pH _{peixe} 6,43	pH _{peixe} 6,63	pH _{peixe} 6,89	pH _{peixe} 7,82
pH _{sf} 4,3_6 °C	pH _{peixe} 6,44	pH _{peixe} 6,66	pH _{peixe} 6,90	pH _{peixe} 7,83
pH _{sf} 2,8_12 °C	pH _{peixe} 6,41	pH _{peixe} 6,73	pH _{peixe} 7,60	pH _{peixe} 8,08
pH _{sf} 4,3_12 °C	pH _{peixe} 6,44	pH _{peixe} 6,74	pH _{peixe} 7,62	pH _{peixe} 8,11

Cabe salientar que os estudos de embalagens inteligentes existentes na atualidade são baseados em polímeros sintéticos e os indicadores de cor empregados têm sido corantes químicos sintéticos de uso limitado na indústria de alimentos.

Pacquit et al. (2006) prepararam por *entrapping* dentro de uma matriz polimérica de PET o corante verde bromocresol (BCG, *Bromocresol green*) que é sensível ao pH, e responde, por meio de mudanças de cor visíveis, aos compostos voláteis de deterioração (TVB-N). Ensaio de laboratório com filés de peixe fresco mostraram que o sensor monitora com precisão o aumento da concentração de aminas no *headspace* da embalagem, encontrando que essa resposta está diretamente correlacionada às mudanças nas populações microbianas (contagem total viável TVC e *Pseudomonas* spp.) ao longo do tempo.

Indicadores de cor foram desenvolvidos por Hong e Park (2000) para avaliar o grau de fermentação de produtos Kimchi (produto vegetal fermentado tradicional da Coreia) durante o seu armazenamento e distribuição. Eles avaliaram a fermentação do Kimchi pela sua mudança total de cor e acidez titulável (AT). Utilizando os indicadores sintéticos bromocresol púrpura (BP, do inglês *Bromocresol purple*) e vermelho de metila (MR, do inglês *Methyl red*), observaram que, embora a mudança de cor de ambos indicadores tenham demonstrado boa correlação com os valores da AT do Kimchi, a mudança de cor do BP foi muito superior à obtida com MR. Eles concluíram que esses indicadores de cor são aplicáveis ao produto Kimchi como um sistema de embalagem inteligente para o monitoramento da sua maturação.

Como pode ser visto no presente estudo, a utilização de antocianina como indicador de mudança de pH em filmes biodegradáveis à base de fécula de mandioca, sem a adição de ácido cítrico na matriz polimérica, foi eficiente quando empregada como embalagem de peixe, apresentando a vantagem de utilizar pigmentos naturais na sua elaboração.

Dessa forma, conclui-se que os filmes com pH_{sf} 4,3 são alternativas viáveis para o desenvolvimento de filmes biodegradáveis indicadores de mudança de pH, atingindo, com sucesso, o objetivo proposto para este trabalho.

4.4 Avaliação da interação antocianina - argila

Como explicado no item 3.4, foi avaliada a influência da argila montmorilonita sódica (MMT-Na) na estabilização da cor da antocianina (ATH), através da análise de cor das soluções de ATH, antes e depois da adição de MMT-Na.

Os valores de pH tanto da ATH_PADRÃO quanto da ATH_MMT-Na foram bastante próximos, apresentando valores médios de pH 3,89 a 26 °C e 3,91 a 26 °C, respectivamente.

Encontraram-se parâmetros de cor da ATH_PADRÃO L^* ($16,24 \pm 0,16$), a^* ($27,32 \pm 0,15$), b^* ($1,26 \pm 0,18$) e C^*_{ab} ($27,34 \pm 0,14$), bem diferentes da ATH_MMT-Na, com valores de L^* ($22,11 \pm 0,61$), a^* ($47,49 \pm 0,11$), b^* ($4,86 \pm 0,71$), dE^* ($6,00 \pm 0,61$) e C^*_{ab} ($47,74 \pm 0,12$), cuja mudança de coloração ao incorporar ATH na suspensão de MMT-Na, foi visualmente perceptível, evidenciando um aumento na luminosidade L^* , nos parâmetros a^* e b^* e na cromaticidade C^*_{ab} , mostrando acentuação na coloração vermelha que quase duplicou os valores de a^* , das soluções ATH_MMT-Na em relação à ATH_PADRÃO, como observado na Figura 4.20.

Figura 4.20 – Béqueres contendo soluções ATH_MMT-Na (A1, A2, A3) e ATH_PADRÃO (B).

O espectro de absorção das amostras ATH_MMT-Na, em triplicata, comparadas com a ATH_PADRÃO é mostrada na Figura 4.21.

Figura 4.21 – Espectros de absorção das soluções ATH_PADRÃO e ATH_MMT-Na.

A Figura 4.21 mostrou um pico de absorção a 520 nm para a ATH_PADRÃO, confirmando a forte coloração vermelha das soluções incorporadas com o pigmento antocianina. Este pico de absorbância na faixa dos 520 nm, acontece porque este comprimento de onda corresponde ao verde, a cor complementar do vermelho, (absorve toda a cor complementar e transmite a apresentada por ela) (MATEUS, 2001).

Estes resultados são comparáveis aos encontrados por Cabrita, Fossen e Andersen (2000), que encontraram picos de absorção de 520 nm para antocianidina 3-glicosídeo (1.0×10^{-4} M) uma hora depois da dissolução em soluções aquosas tamponadas em pH 4 e armazenadas a 23 °C. É possível observar que a ATH_MMT-Na apresentou efeito batocrômico em relação à ATH_PADRÃO, em que o pico de absorção foi deslocado de 520 nm (ATH_PADRÃO) a 530 nm (ATH_MMT-Na) por causa da incorporação da MMT-Na que possivelmente atuou como copigmento da antocianina.

Comportamento similar foi encontrado por Kohno et al. (2009) para antocianina purificada (AN), segundo a metodologia estabelecida por Baublis et al. (1994), cuja antocianina principal foi encontrada ser malvidina 3-glicosídeo, relatando que o pico de absorção em 523 nm de AN foi significativamente deslocado

de 523 nm até 540 nm, quando intercalada em argila Kunipia F Montmorilonita (KF). Este desvio para o vermelho também foi observado para outros corantes catiônicos, tais como tionina (SUNWAR; BOSE, 1990) e cianina (Ogawa et al., 1996) intercalados em montmorilonita, devido à interação eletrostática entre as camadas de argila e o corante.

Além disso, percebeu-se um efeito hipercrômico das soluções ATH_MMT-Na com respeito à solução ATH_PADRÃO, em que os valores médios no pico de absorção passaram de 2,22 (520 nm) para ATH_PADRÃO a 3,48 (530 nm) para ATH_MMT-Na. Como acima explicado, as soluções absorvem de preferência luz verde, então a cor exibida é o vermelho por serem cores complementares (Figura 4.21). Estes resultados são confirmados pelo cromaticidade C^*_{ab} que aumentou seus valores nas soluções ATH_MMT-Na.

A absorção na região visível é a melhor ferramenta para observar o efeito de copigmentação: os espectros visíveis das antocianinas aumentam a intensidade do máximo observado resultando em amostras mais coloridas (efeito hipercrômico) e/ou provocam um desvio da absorção para comprimentos de onda maiores (efeito batocrômico) (MAZZA; BROUILLARD, 1987) como explicado no item 3.4.

Neumann et al. (2000), através do estudo sobre corantes catiônicos e de argilas montmorilonita natural, montmorilonita sintética, hectorita natural e hectorita sintética, monitorando as variações espectrais em função do tempo, observaram que ao adicionar o corante à suspensão de argila, inicialmente as moléculas se adsorvem e se agregam na superfície externa das partículas. Depois desse momento, devido à presença de sítios ácidos, ocorrem rearranjos com as moléculas do corante indo estas a ocupar os espaços interlamelares onde são protonadas.

A agregação de corantes iônicos não pode ser conferida a um tipo específico de interação. Há contribuição de efeitos pelas forças do tipo van der Waals, ligações de hidrogênio intermoleculares e interações de elétrons π , sendo difícil avaliar a contribuição de cada uma dessas interações (NEUMANN et al., 2000).

5 CONCLUSÕES

A resistência máxima à tração, porcentagem de alongação na ruptura, permeabilidade ao vapor de água, espessura e cor dos filmes biodegradáveis à base de fécula de mandioca foram alteradas pela composição da solução filmogênica.

Visualmente, todos os filmes foram translúcidos, flexíveis e apresentaram cor roxa, sendo essa coloração mais intensa nos filmes incorporados com ácido cítrico.

O ácido cítrico aumentou a hidrofiliabilidade dos filmes, além de deixá-los pegajosos e de difícil manuseio. Do mesmo modo, sua influência nos filmes é negativa em relação ao potencial indicador de pH, devido ao acréscimo da estabilidade da antocianina atuando como copigmento da mesma.

A argila presente na solução filmogênica não estabilizou as antocianinas, e por tanto, não impossibilitou a mudança de coloração dos filmes biodegradáveis incorporados com antocianina, apesar da sua incorporação ter ocasionado uma maior intensidade na coloração vermelha.

As propriedades de barreira dos filmes a base de fécula de mandioca produzidos no presente trabalho são equiparáveis ou até melhores do que as propriedades do celofane (polímero sintético) amplamente usado em embalagens de alimentos.

Os filmes incorporados com antocianina sem adição de ácido cítrico na matriz polimérica, representam uma alternativa ecologicamente correta para indicar variações de pH do meio. Quando o filme foi exposto ao pH próximo à neutralidade, ocorreu alteração gradativa da cor roxa para azul/cinza. No caso da avaliação com peixe cru, os filmes mostraram-se muito promissores, uma vez que foi nítida a mudança de cor quando o pH do peixe atingiu o nível máximo de frescor permitido pela legislação brasileira (6,8). Dessa forma, estes filmes indicaram deterioração

pela liberação de TVB-N, sendo que essa mudança foi mais acentuada em filmes com maior conteúdo de antocianina.

As informações disponibilizadas neste estudo mostram que existe grande potencial de utilização destes materiais biodegradáveis à base de amido de mandioca como embalagens de alimentos. Entretanto, essa aplicação depende da produção de materiais mais estáveis às condições de estocagem em elevada umidade relativa e do desenvolvimento de tecnologia de produção em escala industrial.

6 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

O estudo realizado forneceu algumas evidências que poderiam ser abordadas em pesquisas futuras. O uso das técnicas e equipamentos convencionais na indústria de embalagens flexíveis seria a evolução principal dos projetos com filmes biodegradáveis a base de polímeros de origem vegetal, incorporados com pigmentos indicadores de pH naturais. Um ponto importante a ser explorado é a obtenção de filmes nanocompósitos à base de fécula de mandioca reforçados por nanocargas de argila, por meio do processo de extrusão.

É importante que pesquisas estudem a vida útil dos filmes biodegradáveis a base de fécula de mandioca, em relação às suas propriedades mecânicas e de barreira, e aspectos físico-químicos e microbiológicos; além disso, é importante analisar a perda do pigmento indicador de pH com o tempo.

Capacitar os funcionários da indústria vinícola para melhor aproveitamento do resíduo gerado na produção do vinho, com a finalidade de evitar a degradação das antocianinas contidas no mesmo, para o uso como matéria-prima em filmes com potencial indicador de pH.

Realizar análise sensorial dos filmes com potencial indicador de pH, com intuito de avaliar a capacidade do consumidor em perceber a mudança de coloração dos filmes biodegradáveis incorporados com antocianina.

Testar o potencial indicador de pH dos filmes biodegradáveis incorporados com antocianina em outros alimentos, especialmente em produtos de origem animal.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS⁴

- AGÊNCIA NACIONAL DO PETRÓLEO, GÁS NATURAL E BIOCOMBUSTÍVEIS (ANP), Disponível em: <<http://www.anp.gov.br/?pg=46827&m=&t1=&t2=&t3=&t4=&ar=&ps=&cachebust=1303320754755>>. Acesso em Maio 2011.
- AHVENAINEN, R. *Novel Food Packaging Techniques*,. Woodhead Publishing, Cambridge, p. 11-12, 88-89, 108-113, 134-135, 536-541 UK, 2003.
- AHVENAINEN, R., PULLINEN, T, HURME, E., SMOLANDER, M. AND SIIKA-AHO, M. Package for Decayable Foodstuffs. *PCT International Patent Application* WO 98/21120. VTT Biotechnology and Food Research, Espoo, Finland, 1997.
- ALBANEZ, N. E. F. K. Preparação e caracterização de nanocompósitos preparados com argilas esmectitas (bentonita), amido e sacarose. 2008. 91 f. Tese (Doutorado em Engenharia Metalúrgica e de Materiais) - Escola Politécnica, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.
- ALEXANDRE, M.; DUBOIS, P. Polymer-layered silicate nanocomposites: preparation, properties and uses of a new class of materials. *Materials Science and Engineering*, v.28, p. 1-63, 2000.
- ALVES, R. M.; GROSSMANN M. V. E; SILVA, R. S .S. F. Pre-gelatinized starch of *Dioscorea alata* – functional properties. *Food Chemistry, Oxon*, v. 67, n. 2, p. 123-127, 1999.
- ALVES, V.; COSTA, N.; HILLIOU, L.; LAROTONDA, F.; GONÇALVES, M.; SERENO, A.; COELHO, I. Design of biodegradable composite films for food packaging. *Desalination*, v. 199, p. 331–333, 2006.
- ALVES. V.D.; MALI, S.; BELÉIA, A.; GROSSMANN, M.V.E. Effect of glycerol and amylose enrichment on cassava starch film properties. *Journal of Food Engineering*, v.78, p.941-946, 2007.
- AMINABHAVI, T.M.; BALUNDGI, R.H.; CASSIDY, P.E.. Review on biodegradable plastics. *Polymer Plastics Technology and Engineering*. 29(3): 235-262,1990.
- ARVANITOYANNIS, I.; BILIADERIS, C. G. Physical properties of polyol-plasticized edible films made from sodium caseinate and soluble starch blends. *Food Chemistry*, v. 62 (3), p. 333-342, 1998.
- ARVANITOYANNIS, I.; BILIADERIS, C. G. Physical properties of polyol-plasticized edible blends made of methyl cellulose and soluble starch. *Carbohydrate Polymers*, v. 38, p.47-58, 1999.

¹ De acordo com as normas ABNT NBR 6023 (2002), com adaptações EPUSP- Diretrizes para Apresentação de Dissertações e Teses, 1030. 2006. Disponível em www.poli.usp.br.

- ASEN, S.; STEWART, R. N.; NORRIS, K. H. Co-pigmentation of anthocyanins in plant tissues and its effects on color. *Phytochemistry*, v.11, p. 1139–1144, 1972.
- ASHIE, I.N.A; SMITH, J.P.; SIMPSON, B.K. Spoilage and shelf-life extension of fresh fish and shellfish. *Crit. Rev. Food Sci. Nut.*, Boca Raton, v.36, n.182, p.87-121, 1996.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE EMBALAGENS. ABRE, 2009. Disponível em: <<http://www.abre.org.br>>. Acesso em: 10 Jan. 2011.
- ASTM Standard D 2244-11, 2011. "Standard Practice for Calculation of Color Tolerances and Color Differences from Instrumentally Measured Color", ASTM International, West Conshohocken, PA, 2011. www.astm.org/Standards.
- ASTM Standard D 5338, 1998. "Test Method for Determining Aerobic Biodegradation of Plastic Materials Under Controlled Composting Conditions", ASTM International, West Conshohocken, PA, 2003. www.astm.org.
- ASTM Standard D 882 – 02, 2002. "Standard Test Method for Tensile Properties of Thin Plastic Sheet", ASTM International, West Conshohocken, PA, 2009. www.astm.org/Standards.
- ASTM Standard E 96/E 96M – 00, 2000. "Standard Test Methods for Water Vapor Transmission of Materials", ASTM International, West Conshohocken, PA, 2005. www.astm.org/Standards.
- ASTM Standard F 1927 – 04, 2004. "Standard Test Method for Determination of Oxygen Gas Transmission Rate, Permeability and Permeance at Controlled Relative Humidity Through Barrier Materials Using a Coulometric Detector", ASTM International, West Conshohocken, PA. 2007. www.astm.org/Standards.
- AVELLA, M.; DE VLIÉGER, J. J.; ERRICO, M. E.; FISCHER, S.; VACCA, P.; VOLPE, M. G. Biodegradable starch/clay nanocomposite films for food packaging applications. *Food Chemistry*, v. 93, p. 467-474, 2005.
- AVÉROUS, L.; BOQUILLON, N. Biocomposites based on plasticized starch: thermal and mechanical behaviours. *Carbohydrate Polymers*, v. 56, p. 111-122, 2004.
- AVÉROUS, L.; FAUCONNIER, N.; MORO, L.; FRINGANT, C. Blends of thermoplastic starch and polyesteramide: processing and properties. *Journal of Applied Polymer Science*, v. 76, p. 1117-1128, 2000.
- BACCAN, N.; ANDRADE, J. C.; GODINHO, O. E. S.; BARONE, J. S. *Química Analítica Quantitativa Elementar*, 2a ed., Ed. Unicamp: Campinas, p. 46, 1979.
- BADER, H. G.; GÖRITZ, D. Investigations on high amylose corn starch films. Part 1: Wide angle X-ray scattering (WAXS). *Starch/Stärke*, Weinheim, v. 46, n. 6, p. 229-232, 1994a.
- BADER, H. G.; GÖRITZ, D. Investigations on high amylose corn starch films. Part 2: Water vapor sorption. *Starch/Stärke*, Weinheim, v. 46, n. 7, p. 249-252, 1994b.

- BAMORE, C. R., LUTHRA, N. P., MUELLER, W. B., PRESSLEY, W. W., BECKWITH, S. W. "Additive transfer film suitable for cook-in end use", U.S. Patent 6,667,082, December 23, 2003.
- BÁNYAI, E. Em *Indicators*; Bishop, E., ed.; Pergamon Press: Oxford, p. 1, 1972.
- BARBOSA-CÁNOVAS, G.V.; FONTANA Jr., A.J.; SCHMIDT, S.J.; LABUZA, T.P. *Water Activity in foods: Fundamentals and applications*. Ames: Blackwell Publishing, p. 435, 2007.
- BAUBLIS, A., SPOMER, A., BERBER-JIMENEZ, M.D. Anthocyanin pigments: comparison of extract stability. *J. Food Sci.*, v. 59, p. 1219–1221, 1994.
- BELITZ, H.D.; GROSCH, W. *Water. Food Chemistry* (2a ed). p.1 (1999).
- BERTUZZI, M. A.; CASTRO VIDAURRE, E. F.; ARMANDA, M.; GOTTIFREDI, J. C. Water vapor permeability of edible starch based films. *Journal of Food Engineering*, v. 80, p. 972-978, 2007.
- BEYER, G. Nanocomposites: a new class of flame retardants for polymers. *Plastics Additives and Compounding*, p. 22-28, 2002.
- BILIADERIS, C. G. The structure and interactions of starch with food. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, v. 69, p. 60-78, 1991.
- BOBBIO, P.A.; BOBBIO, F.O. Química do processamento de alimentos: pigmentos. 2ª ed., Campinas: Varela, p.105-120, 1995.
- BODENHAMER, W. T. Method and Apparatus for Selective Biological Material detection. US Patent 6,051,388. (Toxin Alert, Inc., Canada), 2000.
- BOULTON, R. The copigmentation of anthocyanins and its role in the color of red wine: A critical review. *American Journal of Enology and Viticulture*, v. 52, p. 67–87, 2001.
- BRASIL. Ministério da Agricultura. Decreto n.º 30.691, de 29 de mar. de 1952. *Regulamento da inspeção industrial e sanitária de produtos de origem animal*. (RIISPOA). 1952.
- BRIDLE, P.; TIMBERLAKE, C.F. Anthocyanins as natural food colours – selected aspects. *Food Chemistry*, v. 58, n.1-2, p.103-109, 1997.
- BROUILLARD, R.; DUBOIS, J. E. Mechanism of the structural transformations of anthocyanins in aqueous media. *Journal of American Chemistry Society*, v. 99, p. 1359-1363, 1977.
- BROUILLARD, R.; MAZZA, G.; SAAD, Z.; GARY, A. M. A.; CHEMINAT, A. *J. Am. Chem. Soc.*, v. 111, p. 2604 – 2610, 1989.
- CABRITA, L., FOSSEN, T., ANDERSEN, O. M. Colour and stability of the six common anthocyanidin 3-glucosides in aqueous solutions. *Food Chemistry*, v. 68(1), p.101-107, 2000.

- CALLISTER, J. D. *Ciência e Engenharia de Materiais: uma Introdução*. 5 ed. Rio de Janeiro. Livros Técnicos e Científicos, p. 589, 2002.
- CALLISTER, W.D. *Materials Science and Engineering: An Introduction*. New York, N.Y.: John Wiley and Sons, 2000.
- CAMERON, A. C.; TALASILA, P. C. Modified atmosphere packaging of fresh fruits and vegetables. In: *IFT Annual Meeting Book of Abstracts*. Institute of Food Technologists, Chicago, IL., p. 254, 1995.
- CARVALHO, O development and characterization of nano-biocomposites based on cassava starch reinforced with organomodified clays. 2012. 147 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) - Escola Politécnica, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012. No prelo.
- CASTAÑEDA-OVANDO A; PACHECO-HERNANDEZ, M. L.; PAEZ-HERNANDEZ, M. E.; RODRIGUEZ, J. A.; GALAN-VIDAL, C. A. Chemical studies of anthocyanins: A review. *Food Chemistry*, v. 113, p. 859–871, 2009.
- CHANDRA, R.; RUSTGI, R. Natural biodegradable polymers-Starch. *Biodegradable Polymers*, v. 23, p. 1276-1279, 1998.
- CHEN, B.; EVANS, J. R. G. Thermoplastic starch-clay nanocomposites and their characteristics. *Carbohydrate Polymers*, v. 61, p. 455-463, 2005.
- CHIOU, B-S.; WOOD; D., YEE, E.; IMAM, S. H.; GLENN, G. M.; ORTS, W. J. Extruded starch-nanoclay nanocomposites: effects of glycerol and nanoclay concentration. *Polymer Engineering Science*, v. 47, p. 1898-1904, 2007.
- CHIVRAC, F.; POLLET, E.; AVÉROUS, L. Progress in nano-biocomposites based on polysaccharides and nanoclays. *Materials Science and Engineering R*, v.67, p.1-17, 2009.
- CHIVRAC, F.; POLLET, E.; DOLE, P.; AVÉROUS, L. Starch-based nano-biocomposites: Plasticizer impact on the montmorillonite exfoliation process. *Carbohydrate Polymers*, v.79, p.941-947, 2010.
- CHOUBERT, G.; BACCAUNAUD, M. Colour changes of fillets of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* W.) fed astaxanthin or canthaxanthin during storage under controlled or modified atmosphere. *Food Science and Technology*, v. 39, p. 1203-1213, 2006.
- CHOUDALAKIS, G.; GOTSIS, A.D. Permeability of polymer/clay nanocomposites: a review. *European Polymer Journal*, v.45, p.967-984, 2009.
- CYRAS, V. P., MANFREDI, L. P., TON-THAT, M. T., VÁSQUEZ, A. Physical and mechanical properties of thermoplastic starch/montmorillonite nanocomposite films. *Carbohydrate. Polymers*, v. 73, p. 55-63, 2008.
- DAINELLI, D.; GONTARD, N.; SPYROPOULOS, D.; ZONDERVAN-VAN DEN BEUKEN AND, E.; TOBBACK, P. Active and intelligent food packaging: legal aspects and safety concerns. *Trends in Food Science & Technology*, v. 19, p. S103-S112, 2008.

- DANGLES O.; SAITO N.; BROUILLARD, R. Kinetic and thermodynamic control of flavylum hydration in the pelargonidin-cinnamic acid complexation. Origin of the extraordinary flower color diversity of *Pharbitis nil*, *Journal American Chemical Society*, v.115, p.3125- 3132, 1993.
- DAVIS, G.; SONG, J.H. Biodegradable packaging based on raw materials from crops and their impact in waste management. *Industrial Crops and Products*, v 23, p. 147-161, 2006.
- DE KRUIJF, N., VAN BEEST, M., RIJK, R., SIPIILAEINEN-MALM, T., PASEIRO-LOSADA, P., DE MEULENAER, B. Active and intelligent packaging: applications and regulatory aspects. *Food Additives & Contaminants*, 19, 144–162, 2002.
- DECICCO, B. T.; KEEVEN, J. K. Detection System for Microbial Contamination in Health-care Products. US Patent 5,443, 987, 1995.
- DELGADO-VARGAS, F.; JIMÉNEZ, A. R.; PAREDES-LÓPEZ, O. Natural Pigments: Carotenoids, Anthocyanins, and Betalains: Characteristics, Biosynthesis, Processing and Stability. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, v. 40, p. 173–289, 2000.
- DITCHFIELD, C.; TADINI, C. C. Filme biodegradável com base de amido e/ou fécula e uso do mesmo. INPI n. C10704589-1E2, 14 abril 2009.
- DONHOWE, I. G.; FENNEMA, O. R. Edible films and coatings: characteristics, formation, definitions and testing methods. In: KROCHTA, J. M.; BALDWIN, E. A.; NISPEROS-CARRIEDO, M.O. (Ed.). *Edible coatings and films to improve food quality*. Lancaster, PA (USA): Technomic Publishing Co., p.1-25, 1994.
- FAMÁ, L.; FLORES, S. K.; GERSCHENSON, L.; GOYANES, S. Physical characterization of cassava starch biofilms with special reference to dynamic mechanical properties at low temperatures. *Carbohydrate Polymers*. v. 66(1), p. 8-15, 2006.
- FAMÁ, L.; GOYANES, S.; GERSCHENSON, L. Influence of storage time at room temperature on the physicochemical properties of cassava starch films. *Carbohydrate Polymers*, v. 70, p. 265-273, 2007.
- FAOSTAT Food and Agriculture Organization of the United Nations. Statistical Databases. Agricultural data. 2008. Disponível em: <http://faostat.fao.org/faostat/>. Acesso em: 15 fev. 2011.
- FLESCHHUT, J.; KRATZER, F.; RECHKEMMER, G., KULLING, S. E. Stability and biotransformation of various dietary anthocyanins in vitro. *European Journal of Nutrition*, v. 45(1), p. 7–18, 2006.
- FORINI, S. H. *Estudo da dispersão e incorporação de argilas esmectitas em plastisol*. 2008. 114 f. Tese (Doutorado em Engenharia Metalúrgica e de Materiais) - Escola Politécnica, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

- FRANCIA-ARICHA, F.M.; GUERRA, M.T.; RIVAS-GONZALO, I.C.; SANTOS-BUELGA, C. New anthocyanin pigments formed after condensation with flavonols. *J. Agric. Food Chem.*, v. 45, p. 2262-2266, 1997.
- FRANCO, B. D. G. M. Importância dos micro-organismos nos alimentos. In: FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. Microbiologia dos Alimentos. São Paulo: Editora Atheneu, p. 1-12, 1996.
- FRANCO, C. M. L.; DAIUTO, E. R.; DEMIATE, I. M.; CARVALHO, L. J. C. B.; LEONEL, M.; VILPOUX, O. F.; SARMENTO, S. B. S. Propriedades do Amido, In: *Propriedades Gerais do Amido, Série Culturas de Tuberosas Amiláceas Latino Americanas*. Campinas: Fundação Cargill, v. 1, p. 141-184, 2002.
- FRASER, O.P.; SUMAR, S. Compositional changes and spoilage in fish (Parte II) microbiological induced deterioration. *Nutrition e Food Service*, v 6, p. 325-329, 1998.
- FREADMAN, M., AND BEACH, H. C. "Method and apparatus for detecting bacteria", U.S. Patent 6,589,761, July 8, 2003.
- FREITAS, A. Reatividade Química e Fotoquímica de Antocianinas em Sistemas Organizados 2005. 210 f. Tese (Doutorado em Química) – Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.
- 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 Comission, EUR 16102, 1994.
- GARBUTT, J. *Essentials of Food Microbiology*. Londres: Editora Arnold, p. 251, 1997.
- GARCIA, M. A. Desarrollo de recubrimientos de matriz amilósica para vegetales. 1999. Tese (Doutorado) – Departamento de Química, Facultad de Ciência Exactas, Universidad Nacional de La Plata, Argentina, 1999.
- GARCÍA, M. A., PINOTTI, A., MARTINO, M. N., ZARITZKY, N. Characterization of composite hydrocolloid films. *Carbohydrate Polymers*, v. 56, p. 339-345, 2004.
- GIANNELIS, E.P. Polymer layered silicate nanocomposites. *Advanced Materials*, v.8, n.1, p.29-35, 1996.
- GILMAN, J. W.; JACKSON, C. L.; MORGAN, A. B.; HARRIS, R. J.; MANIAS, E.; GIANNELIS, E. P.; WUTHENOW, M.; HILTON, D.; PHILIPS, S. H. Flammability properties of polymer-layered-silicate nanocomposites. Polypropylene and polystyrene nanocomposites. *Chemistry of Materials*, v. 12, p. 1866-1873, 2000.
- GIUSTI, M.M.; WROLSTAD, R.E. Acylated anthocyanins from edible sources and their applications in food systems. *Biochemical Engineering Journal*, v. 14, p. 217–225, 2003.
- GOMES, C.F. *Argilas: o que são e para que servem*. Lisboa, Fundação Calouste Gulbenkian, p. 457, 1988.

- GORRASI, G.; TORTORA, M.; VITTORIA, V.; KAEMPFER, D.; MÜLHAUPT, R. Transport properties of organic vapors in nanocomposites of organophilic layered silicate and syndiotactic polypropylene. *Polymer*, v. 44, p. 3679-3685, 2003.
- GRAAF, R.A.; KARMAN, A.P.; JANSSEN, L.P.B.M. Material properties and glass transition temperatures of different thermoplastic starches after extrusion processing. *Starch/Stärke*, v.55, p.80-86, 2003.
- GRASSMAN, O.; MÜLLER, G.; LÖBMAN, P. Organic-inorganic hybrid structure of calcite crystalline assemblies grown in a gelatin hydrogel matrix: Relevance to biomineralization. *Chemistry of Materials*, v. 14, p. 4530-4535, 2002.
- GRIFFIN, G. J. L. Synthetic resin sheet material. [S.l.:s.n]. (US Patent n. 4.021.388), 1977.
- GUERRA, D.L.; LEMOS, V.P.; ANGÉLICA, R.S.; AIROLDI, C.; VIANA, R.R. Aplicação de Zr/Ti-PILC no processo de adsorção Cu (II), Ni (II) e Co (II) utilizando modelos físico-químicos de adsorção. *Química Nova*, v.31, n.2, p. 353-359, 2008.
- HAN, J.; HO, C.; RODRIGUES, E. Innovations in Food Packaging. *Elsevier Science & Technology Books*, Cap. 9, p. 138-153, 2005.
- HARADA, J. Embalagens para alimentos. Anais do Seminário da Sociedade Brasileira de Polímeros sobre "Processamento embalagens poliméricas". São Paulo, Junho, 2005.
- HAZNECI, C., ERTEKIN, K., YENIGUL, B., AND CETINKAYA, E. Optical pH sensor based on spectral response of newly synthesized Schiff bases. *Dyes Pigments*, v. 62, p.35-41, 2004.
- HENRIQUE, C. M.; CEREDA, M. P.; SARMENTO, S. B. S. Características físicas de filmes biodegradáveis produzidos a partir de amidos modificados de mandioca. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 28, p. 231-240, 2008.
- HONEYBOURNE, C. L. Food Spoilage Detection Method. *PCT International Patent Application* WO 93/15403, 1993.
- HONG, S.; PARK, W-S. Use of color indicators as an active packaging system for evaluating kimchi fermentation. *Journal of Food Engineering*, v. 46, p. 67-72, 2000.
- HONG, S.I. Gravure-printed color indicators for monitoring kimchi fermentation as a novel intelligent packaging. *Packag. Technol. Sci.* v. 15, p. 155-160, 2002.
- HOSENEY, R. Principles of Cereal: Science and Technology, 2ª edição, USA: *American Association of Cereal Chemists*, 1999.
- HUI, H. K.; FELDMAN, L. A.; GORHAM, R. A. "Biological indicator for sterilization processes with double buffer system", U.S. Patent 6,458,554, October 1, 2002.
- HUSS, H. H.; DALGAARD, P., GRAM, L. Microbiology of fish and fish products. In J. B. Luten; T. Borresen, J. Oehlenschläger (Eds.). Proceedings of seafood from producer to consumer, integrated approach to quality: 25th WEFTA international seafood

- conference. Amsterdam, The Netherlands: Elsevier Science B.V., v. 38, p. 413–430, 1997.
- HUTTON, T. Food packaging: An introduction. Key topics in food science and technology – Number 7. Chipping Campden, Gloucestershire, UK: Campden and Chorleywood Food Research Association Group 108, 2003.
- IACOBUCCI, G. A.; SWEENEY, J. G. The chemistry of anthocyanins, anthocyanidins, and related flavilium salts. *Tetrahedron Letters*, v. 39, p. 3005-3012, 1983.
- IGUCHI, S., SHINOMIYA, S., HAMAMOTO, R., ABE, A., INAI, M., AND KAWAKAMI, K. "Package for container of liquid medicine containing bicarbonate and pH indicator", U.S. Patent 6,232,128, May 15, 2003.
- INSTITUTO ADOLFO LUTZ. Normas analíticas: Métodos químicos e físicos para análise de alimentos. 4.ed. Brasília: ANVISA, p.98-99, 2005.
- ISO Standard 14855-1, 2005. "Determination of the ultimate aerobic biodegradability of plastic materials under controlled composting conditions – Method by analysis of evolved carbon dioxide – Part 1: General method", ISO International, <http://www.iso.org>.
- ISO Standard 14855-2, 2007. "Determination of the ultimate aerobic biodegradability of plastic materials under controlled composting conditions – Method by analysis of evolved carbon dioxide – Part 2: Gravimetric measurement of carbon dioxide evolved in a laboratory-scale test", ISO International, <http://www.iso.org>.
- JACKMAN, R. L.; YADA, R. Y.; TUNG, M. A.; SPEERS, R. A. Anthocyanins as food colorants. *Journal of Food Biochemistry*, v. 11, p. 201–247, 1987.
- JURMANOVIĆ, S.; KORDIĆ, S.; STEINBERG, M.D.; MURKOVIĆ STEINBERG, I. Organically modified silicate thin films doped with colourimetric pH indicators methyl red and bromocresol green as pH responsive sol–gel hybrid materials. *Thin Solid Films*, v. 518, p. 2234–2240, 2010.
- KANIOU, I.; SAMOURIS, G.; MOURATIDOU, T.; ELEFThERIADOU, A.; ZANTOPOLOUS, N. Determination of biogenic amines in fresh and unpacked and vacuum-packed beef during storage at 4 °C. *Food Chemistry*, v. 74, p. 515–519, 2001.
- KECHICHIAN, V. Adição de ingredientes antimicrobianos em filmes biodegradáveis à base de fécula de mandioca. 2007. 98 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Escola Politécnica, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.
- KECHICHIAN, V.; DITCHFIELD, C.; VEIGA-SANTOS, P.; TADINI, C. C. Natural antimicrobial ingredients incorporated in biodegradable films based on cassava starch. *LWT Food Sci Technol*, v. 43, p.1088-1094, 2010.
- KERRY, J. P.; O'GRADY, M. N.; HOGAN, S. A. Past, current and potential utilisation of active and intelligent packaging systems for meat and muscle-based products: A review. *Meat Science*, v. 74, p. 113-130, 2006.

- KOHNO, Y.; KINOSHITA, R.; IKOMA, S.; YODA, K.; SHIBATA, M.; MATSUSHIMA, R.; TOMITA, Y.; MAEDA, Y.; KOBAYASHI, K. Stabilization of natural anthocyanin by intercalation into montmorillonite. *Applied Clay Science*, v.42, p.519-523, 2009.
- KOLYBABA, M.; TABIL, L.G.; PANIGRAHI, S.; CRERAR, W.J.; POWELL, T.; WANG, B. Biodegradable Polymers: Past, Present, and Future. CSAE/ASAE Annual Intersectional Meeting Sponsored by the Red River Section of ASAE Quality Inn & Suites 301 3rd Avenue North Fargo, North Dakota, USA October 3-4, 2008.
- KRISHNAMOORTI, R.; YUREKLI, K. Rheology of polymer layered silicate nanocomposites. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, v. 6, p. 464-470, 2000.
- KROCHTA, J. M.; MULDER-JOHNSTON, C. Edible and biodegradable polymer films: Challenges and opportunities. *Food Technology*, v. 51(2), p. 61-73, 1997.
- LABUZA, T. P.; BREENE, W. M. Application of "Active packaging" for improvement of shelf-life and nutritional quality of fresh and extended foods. *Journal of Food Processing & Preservation*, v. 13, p. 1-69, 1989.
- LAHIRY, N.L.; MOORJANI, M.N.; BALIGA, B.R. Factores influencing the keeping quality of fresh o water fish in ice. *Food Technology*, v.9, n.17, p.123-125, 1963.
- LEE, S.W.; MAO, C.; FLYNN, C.E.; BELCHER, A. M. Ordering of quantum dots using genetically engineered viruses. *Science*, p. 296: 892–895, 2002.
- LEE, S.Y.; CHEN, H.; HANNA, M.A. Preparation and characterization of tapioca starch-poly(lactic acid) nanocomposite foams by melt intercalation based on clay type. *Industrial Crops and Products*, v.28, p.95-106, 2008.
- LEITÃO, M. F. F. Deterioração microbiológica do pescado e sua importância em Saúde Pública. *Higiene Alimentar*, v. 3, p. 143-152, 1984.
- LEITÃO, M.F.F. Microbiologia e deterioração do pescado fresco e refrigerado de origem fluvial ou marinha. In: KAI, M.; RUIVO, U.E. *Controle de Qualidade do Pescado*. Santos: Leopoldianum, p. 40-58, 1988.
- LIMA, S. L. T. Reciclagem e biodegradação de plásticos. *Revista Científica do IMAPES*, Sorocaba, v. 2, n. 2, p. 28-34, 2004.
- LIU, Z. Edible films and coatings from starches. In: HAN, J. H. (Ed.). *Innovations in food packagings*, Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, p. 318-336, 2005.
- LOPES, T. J. Adsorção de antocianinas do repolho roxo em argilas. 2002. 121 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Departamento de Engenharia Química. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2002.
- LÓPEZ, O. P.; JIMÉNEZ A.R.; VARGAS F.D. Natural pigments: carotenoids, anthocyanins, and betalains – characteristics, biosynthesis, processing, and stability. *Critical Reviews Food Science Nutrition*, v.40, n.3, p.173-289, 2000.

- LÓPEZ-RUBIO, A.; ALMENAR, E.; HERNADEZ-MUÑOZ, P.; LAGARÓN, J. M.; CATALÁ, R.; GAVARA, R. Overview of active polymer-based packaging Technologies for food applications. *Food Review International*, v. 20(4), p. 357-387, 2004.
- LOURDIN, D.; BIZOT, H.; COLONNA, P. "Antiplasticization" in starch – glycerol films? *Journal of Applied Science*, v.63, n.8, p.1047-1053, 1996.
- LOURDIN, D.; DELLA VALLE, G.D.; COLONNA P. Influence of amylose content on starch films and foams. *Carbohydrate Polymers*, v.27, p.261-270, 1995.
- LOURDIN, D.; COIGNARD, L.; BIZOT, H.; COLONNA, P. *Polymers*. 38, p. 5401, 1997.
- LUNA, F.J.; SCHUCHARDT, U. *Argilas pilarizadas - Uma Introdução*. Química Nova, v.22, n.1, p.104-109, 1999.
- MAGALHÃES, M.A. Tempo de degradação dos materiais descartados no meio Ambiente. Disponível em: <<http://www.redeambiente.org.br/Opinioao.asp?artigo=147>>. Acesso em nov. 2011.
- MALACRIDA, C.; MOTTA, S. Compostos fenólicos totais e antocianinas em suco de uva. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 25, p. 659-664, 2005.
- MALI, S.; GROSSMANN, M. V. E.; GARCIA, M. A.; MARTINO, M. N.; ZARITSKY, N. E. Barrier, mechanical and optical properties of plasticized yam starch films. *Carbohydrate Polymers*, v. 56, p. 129-135, 2004a.
- MALI, S.; KARAM, L.B.; RAMOS, L.P.; GROSSMANN, M.V. Relationship among the composition and physicochemical properties of starches with the characteristics of their films. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.52, p.7720-7725, 2004b.
- MALI, S., SAKANAKA, L.S., YAMASHITA, F., GROSSMANN, M.V.E. Water sorption and mechanical properties of cassava starch films and their relation to plasticizing effect. *Carbohydrate Polymers*, 60, 283-289, 2005.
- MALI, S.; GROSSMANN, M. V. E.; GARCIA, M. A.; MARTINO, M. N.; ZARITSKY, N. E. Effects of controlled storage on thermal, mechanical and barrier properties of plasticized films from different starch sources. *Journal of Food Engineering*, v. 75, p. 453-460, 2006.
- MALI, S; GROSSMANN, M.V. E.; YAMASHITA, F. Starch films: production, properties and potential of utilization. *Semina: Ciências Agrárias, Londrina*, v. 31, n. 1, p. 137-156, 2010.
- MARKAKIS, P. Stability of anthocyanins in foods. In: MARKAKIS, P. (Ed.). *Anthocyanins as food colors*. New York: Academic Press, p. 163-180, 1982.
- MARTIN, O. SCHWACH, E.; AVÉROUS, L.; COUTURIER, Y. Properties of biodegradable multilayer films based on plasticized wheat starch. *Starch/Stärke*, v. 53, p. 372-380, 2001.
- MATEUS, A. L. *Química na cabeça*. Editora UFMG, Belo Horizonte, p.51-75, 2001.

- MAZZA, G.; BROUILLARD, R. Recent developments in the stabilization of anthocyanins in food products. *Food Chem.*, v.25, p. 207-225, 1987.
- MDIC Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior. *O Futuro da Indústria de Transformados Plásticos: embalagens plásticas para alimentos*. Brasília: Instituto Evaldo Lodi – Núcleo Central, p. 25-34, 2005.
- MENESES, J.; CORRALES, C.; VALENCIA, M. Síntesis y caracterización de un polímero biodegradable a partir del almidón de yuca. *Revista EIA*, ISSN 1794-1237, Número 8, p. 57-67, 2007.
- MILLER, K. S.; KROCHTA, J.M. Oxygen and aroma barrier properties of edible films: A review. *Trends in Food Science & Technology*, v. 8, p. 228-237, jul. 1997.
- MILLERS, D. W.; WILKES, J. G.; CONTE, E. D. Food Quality Indicator Device. *PCT International Patent Application WO 99/0456*, 1999.
- MILLS, A.; HAZAFY, D. Nanocrystalline SnO₂-based, UVB-activated, colourimetric oxygen indicator. *Sensor Actuat B*; v. 136: 344–349, 2009.
- MISHRA, S.; RAI, T. Morphology and functional properties of corn, potato and tapioca starches. *Food hydrocolloids*, v 20, p. 557-566, 2006.
- MONTAGNER, L.T.; MILANI, L. G.; LOBATO, L.P.; KRIESE, P.R.; SCHERER, R.; KUBOTA, E. H.; FRIES, L.M.; COSTABEBER, I.; EMANUELLI, T. Centesimal composition and chemical and microbiological evaluation of white croaker fish (*Micropogonias furnieri*) stored refrigerated. *Alimentaria*. V. 40, n. 348, p. 73-77, 2003.
- MOORTHY, S.N. Tropical sources of starch. In: ELIASSON, A.-C. *Starch in Food: Structure, function and applications*. Boca Raton: CRC Press., p. 321-359, 2004.
- MORILHAS, L. J.; WECHSLER, A. M. G.; KRUGLIANSKAS, I. O meio ambiente e o desenvolvimento de produtos: um estudo no setor de reciclagem de plásticos. *Revista Gerenciais*, São Paulo, v. 6, n. 2, p. 109-117, 2007.
- MOTA, C.; SILVA, C.; GONÇALVES, V. Instituto de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Brasil. *Química Nova*, v. 32 (3), p. 639-648, 2009.
- NEUMANN, M. G.; GESSNER, F.; CIONE, A. P. P.; SARTORI, R.A; CAVALHEIRO, C.C.S. Interações entre corantes e argilas em suspensão aquosa. *Química Nova*, v. 23, n.6, p. 818-824, 2000.
- NING, W.; XINGXIANG, Z.; NA, H., SHIHE B. Effect of citric acid and processing on the performance of thermoplastic starch/montmorillonite nanocomposites. *Carbohydrate Polymers*, v. 76, p. 68–73, 2009.
- OEHLENSCHLAGER, J. Volatile amines as freshness/spoilage indicators: a literature review. In J. B. Luten, T. Borresen, & J. Oehlenschlager (Eds.). *Seafood from producer to consumer, integrated approach to quality: 25th WEFTA international seafood conference*. Amsterdam, The Netherlands: Elsevier Science B.V., v. 38, p. 571–586, 1997.

- OGAWA, M., KAWAI, R., KURODA, K. Adsorption and aggregation of a cationic cyanine dye on smectites. *J. Phys. Chem.*, v. 100, p. 16218–16221, 1996.
- OGAWA, M.; MAIA, E., L. Manual de Pesca – Ciência e Tecnologia de Pescado, vol. 1, São Paulo: Livraria Varela, p. 430, 1999.
- OHLSSON, T.; BENGTSSON, N. *Minimal Processing Technologies in the Food Industry*, Woodhead Publishing, Cambridge, UK. p. 88-89, 110-111, 2002.
- PACQUIT A., FRISBY J., DIAMOND D., LAU K., FARRELL A., QUILTY B., DIAMOND D. Development of a smart packaging for the monitoring of fish spoilage. *Food Chemistry* 2006.
- PARK, H.; LI, X.; JIN, C.; PARK, C.; CHO, W.; HA, C. Preparation and properties of biodegradable thermoplastic starch/clay hybrids. *Macromolecular Materials and Engineering*, v. 287, p. 553-558, 2002.
- PARK, H.-M.; LEE, W.-K.; PARK, C.-Y.; CHO, W.-J.; HA, C.-S. Environmentally friendly polymer hybrids. *Journal of Materials Science*, v.38, p.900-915, 2003.
- PARRA, D. F.; TADINI, C. C.; PONCE, P.; LUGÃO, A. B. Mechanical properties and water vapor transmission in some blends of cassava starch edible films. *Carbohydrate Polymers*, v. 58, p. 475-481, 2004.
- PAULT, H. Brain boxes or simply packed? *Food Processing UK* 64(7), p. 23 – 26, 1995.
- PIVA, A.M.; WIEBECK, H. Reciclagem do plástico, São Paulo: Editora Artliber, p. 171, 2005.
- POTTER, L.; CAMPBELL, A; CAVA, D. Active and intelligent packaging - a review, 62,; Campden & Chorleywood Food Research Association, 2008.
- QUAN, C.; STEVENS, R. Protein Coupled Colorimetric Analyte Detectors. PCT *International Patent Application* WO 95/33991, 1998.
- REIN, M. Copigmentation reactions and color stability of berry anthocyanins, University of Helsinki, Helsinki, p. 10–14, 2005.
- RIBEIRO, E. P.; SERAVALLI, A. G. Química de Alimentos. Instituto Mauá de Tecnologia, Ed. Edgard Blücher Ltda. 1a Edição, p. 58-63, 2004.
- RINDLAV-WESTLING, A.; STANDING, M.; HERMANSSON, A.M.; GATENHOLM, P. Structure, mechanical and barrier properties of amylose and amylopectin films. *Carbohydrate Polymers*, v.36, p.217-224, 1998.
- ROONEY, M. L. Overview of active food packaging. *Active Food Packaging*. London: Blackie Academic & Professional. London, UK, p. 1-37. 1995.
- ROSA, D. S.; FRANCO, B. L. M.; CALIL, M. R. Biodegradabilidade e propriedades mecânicas de novas misturas poliméricas. *Polímeros: Ciência e Tecnologia*, v. 61, n. 2, p. 82-88, 2001.

- ROSS, E. Em *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*; Elvers, B.; Hawkins, S.; Ravenscroft, M.; Schulz, G., eds.; VCR: New York, p. 127, 1989.
- SALAME, M. *Barrier polymers*. In: BAKER, M. The Wiley encyclopedia of packaging technology. New York, USA: Wiley, p. 48-54, 1986.
- SALES, R. de O.; OLIVEIRA, J.A.P. de; COSTA, F.J.do L.; et al. Avaliação do estado de frescor do pescado capturado em água doce e mantido sob refrigeração, no açude de Orós, Ceará. *Ciências Agrônômicas*, v.19, n.2, p.109-115, 1988.
- SANTOS, P. S. *Tecnologia de argilas*. Fundamentos. São Paulo: Edgard Blucher, v. 1, p. 340. 1975.
- SANTOS, P.S.; SANTOS, H.S. *Ciência e tecnologia de argilas*. 2. ed. rev. e ampl. São Paulo: Edgar. Blucher, v. 3, p.1089, 1992.
- SARANTÓPOULOS, C. I. G. L.; OLIVEIRA, L. M.; PADULA, M.; COLTRO, L; ALVES, R. M. V. O.; GARCIA, E. E. C. Embalagens plásticas flexíveis: principais polímeros e avaliação de propriedades. Campinas: CETEA/ ITAL, p. 2002.
- SCHMIDT, D.; SHAH, D.; GIANNELIS, E. P. New advances in polymer/layered silicate nanocomposites. *Current Opinion in Solid State and Materials Science*, v. 6, p. 205-212, 2002.
- SEAVEY, K. C.; GHOSH, I.; DAVIS, R. M.; GLASSER, W. G. Continuous cellulose fibre-reinforced cellulose ester composites I: manufacturing options. *Cellulose*, v. 8, p. 149-159, 2001.
- SHIMAZU, A. A.; MALI, S.; GROSSMANN, M. V. E. Efeito plastificante e antiplastificante do glicerol e do sorbitol em filmes biodegradáveis de amido de mandioca. *Ciências Agrárias*, v. 28(1), p. 79-88, 2007.
- SHU, H. C.; HAKANSON, E. H.; MATTIASON, B. D-Lactic acid in pork as a freshness indicator monitored by immobilized D-lactate dehydrogenase using sequential injection analysis. *Analytica Chimica Acta*, v. 283, p. 727-737, 1993.
- SIDE, C. Food Product Development Based on Experience, *Iowa State Press*, Ames, IA., p. 151-152, 2002.
- SILVESTRE, C.; DURACCIO, D.; CIMMINO, S. Food packaging based on polymer nanomaterials. *Progress in Polymer Science*, v. 36, p. 1766-1782, 2011.
- SIRACUSA, V.; ROCCULI, P.; ROMANI, S.; DALLA ROSA, M. Biodegradable polymers for food packaging: a review. *Trends in Food Science & Technology*, v. 19, p. 634-643, 2008.
- SMOLANDER, M. Freshness indicators for direct quality evaluation of packaged foods. In: *International Conference on Active and Intelligent Packaging, Conference Proceedings, 7-8 September*, p. 1-16. Campden & Chorleywood Food Research Association Group, Chipping Campden, UK., 2000.

- SMOLANDER, M. Freshness indicators for packaging. *Food Science Technology*, v.18, p. 26–27, 2004.
- SOUZA, A. C. *Desenvolvimento de embalagem biodegradável ativa a base de fécula de mandioca e agentes antimicrobianos naturais*. 2011. 137 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) - Escola Politécnica, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.
- SOUZA, A. C.; DITCHFIELD, C.; TADINI, C. C. Biodegradable films based on biopolymers for food industries. In M. L. Passos, & C. P. Ribeiro (Eds), *Innovation in Food Engineering: New techniques and products*, Boca Raton, FL: CRC Press, p. 511-537, 2010.
- SOUZA, A.C.; BENZE, R.; FERRÃO, E.S.; DITCHFIELD, C.; COELHO, A.C.V.; TADINI, C.C. Cassava starch biodegradable films: Influence of glycerol and clay nanoparticles content on tensile and barrier properties and glass transition temperature. *LWT - Food Science and Technology*, v.46, p. 110 – 117, 2012.
- SOUZA, R. C. R; ANDRADE, C. T. Investigação dos processos de gelatinização e extrusão de amido de milho. *Polímeros: Ciência e Tecnologia*, São Paulo, v. 10, n. 1, p. 24-30, 2000.
- STEVENS, E. S.. Green plastics: an introduction to the new science of biodegradable plastics. New Jersey: Princeton University Press, p. 238, 2002.
- STRATHMANN, S.; PASTORELLI, S.; SIMONEAU, C. Investigation of the interaction of active packaging material with food aroma compounds. *Sensors and Actuators B. Chemical*, v. 106, p. 83-87, 2005.
- STRINGHETA, P.C.; *Identificação da estrutura e estudo da estabilidade das antocianinas extraídas da inflorescência de capim gordura (Melinis minutiflora, Pal de Beauv.)*. 1991, 138 f. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1991.
- SUMMERS, L. *Intelligent Packaging*, Centre for Exploitation of Science and Technology, London, UK, 1992.
- SUNWAR, C.B., BOSE, H. Effect of clay minerals on the visible spectra of thiazine dyes. *J. Colloid Interface Sci.* 136, 54–60, 1990.
- TALJA, R. A.; HELÉN, H.; ROOS, Y. H.; JOUPPILA, K. Effect of various polyols and polyol contents on physical and mechanical properties of potato starch-based films. *Carbohydrate Polymers*, v. 67, p. 288-295, 2007.
- TALJA, R. A.; HELÉN, H.; ROOS, Y. H.; JOUPPILA, K. Effect of type and content of binary polyol mixtures on physical and mechanical properties of starch-based edible films. *Carbohydrate Polymers*, v. 71, p. 269-276, 2008.
- TANG, S., ZOU, P., XIONG, H., TANG, H. Effect of nano-SiO₂ on the performance of starch/polyvinyl alcohol blend films. *Carbohydrate Polymers*, v. 72, p. 521- 526, 2008.

- TANG, X., ALAVI, S., HERALD, T. J. Effects of plasticizers on the structure and properties of starch–clay nanocomposite films. *Carbohydrate Polymers*, v. 74, p. 552- 558, 2008.
- TAOUKIS, P.S.; LABUZA, T.P. Applicability of time–temperature indicators as shelf life monitors of food products. *Journal Food Science*, v. 54, p. 783–789, 1989.
- TERCI D.; ROSSI A. Indicadores naturais de pH : Usar papel ou solução? *Química Nova*, 4, 684 – 688. 2002.
- TESTER, R. F; KARKALAS, J.; QI, X. Starch – composition, fine structure and architecture. *Journal of Cereal Science*, v. 39, p. 153-165, 2004.
- THARANATHAN, R. N.; SRINIVASA, P. C.; RAMESH, M. N. A process for production of biodegradable films from polysaccharides. *Indian patent* 0085/DEL/02, 2002.
- THARANATHAN, R.N. Biodegradable films and composite coatings: past, present and future. *Trends in Food Science & Technology*, v.14, p.71-78, 2003.
- THURSTON, D.; LLOYD, S.; WALLACE, J. Considering consumer preferences for environmental protection in material selection. *Materials & Design*, v.15(4), p. 203-209, 1994.
- TIMBERLAKE, C.F., BRIDLE, P. *The anthocyanins*. In: HARBONE, J.B., (Ed). *The Flavonoids*. London: Chapman & HaLL Ltd., p. 215-66, 1975.
- TSIEN, R. Y., MIYAWAKI, A., LLOPIS, J. “Fluorescent protein sensors for measuring the pH of a biological sample”, U.S. Patent 6,627,449, September 30, 2003.
- VAN SOEST, J. J. G.; HULLEMAN, S. H. D.; WIT, D.; VLIEGENTHART, J. F. G. Crystallinity in starch bioplastics. *Industrial Crops and Products*, Amsterdam, v. 5, n. 1, p. 11-22, 1996.
- VEIGA-SANTOS, P. *Elaboração, aditivação e caracterização de biofilmes à base de fécula de mandioca*. 2004. 262 f. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) - Faculdade de engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2004.
- VEIGA-SANTOS, P., OLIVEIRA, L. M.; CEREDA, M. P., ALVES, A. J.; SCAMPARINI, A. R. P. Mechanical properties, hydrophilicity and water activity of starch-gum films: Effect of additives and deacetylated xanthan gum. *Food Hydrocolloids*, v. 19, p. 341-349, 2005.
- VEIGA-SANTOS P.; DITCHFIELD C.; TADINI C. Development and Evaluation of a Novel pH Indicator Biodegradable Film Based on Cassava Starch. *Journal of Applied Polymer Science*, v. 120, p. 1069–1079, 2011.
- WANG, L. Z.; WHITE, P. J. Structure and properties of amylose, amylopectin and intermediary materials of oat starches. *Cereal Chemistry*, London, v. 71, n.3, p. 263-268, 1994.

- WANG, N.; YU, J. G.; HAN, C. M. Influence of citric acid on the properties of glycerol-plasticised Cornstarch extrusion blends. *Polymers & Polymer Composites*, v.15, p. 545–552, 2007.
- WILHELM, H. M.; SIERAKOWSKI, M. R.; SOUZA, G. P.; WYPYCH, F. Starch films reinforced with mineral clay. *Carbohydrate Polymers*, v. 52, p. 101-110, 2003.
- WILLIAMS, G., POOL, R.. Composites from natural fibers and soy oil resins. *Applied Composite Materials*. 7(5-6): 421-432, 2000.
- WURZBURG, O. B. Cross – linking starches. In: Wurzburg, O. B. *Modified starches: properties and uses*. Boca Raton: CRC Press, p. 41-53, 1986.
- WYSZECKI, G.; STILES, W. S. *Color science: concepts and methods quantitative data and formulae*. 2 ed. Nova Iorque: J. Wiley & Sons, Inc., p.951, 2000.
- YOUNG, H. Fractionation of starch. In: WHISTLER, R. L.; BEMILLER, J. N.; PASCHALL, E. F. (Ed.). *Starch chemistry and technology*. 2.ed. Orlando,USA: Academic Press, p. 249-283, 1984.
- ZHOU, G. H.; XU, X. L.; LIU, Y. Preservation technologies for fresh meat – A review. Biodegradable polymers for food packaging: a review. *Meat Science*, v. 86, p. 119-128, 2010.
- ZOBEL, W. Potato starch. In: Whistler R. L. *Methods in carbohydrate chemistry*. New York, USA: Academic Press, v. 4, 1964.