

Michelle Heck Machado

Desenvolvimento e caracterização de filme indicador de pH com extrato de repolho roxo para monitoramento da qualidade de alimentos

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação de Ciência dos Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do grau de Mestre em Ciência dos Alimentos.
Prof. ° Dr. ° Pedro Luiz Manique Barreto

Florianópolis, Santa Catarina
2017

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Machado, Michelle Heck

Desenvolvimento e caracterização de filme indicador de pH com extrato de repolho roxo para monitoramento da qualidade de alimentos / Michelle Heck Machado ; orientador, Prof.º Dr.º Pedro Luiz Manique Barreto - Florianópolis, SC, 2017.

196 p.

- Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, Florianópolis, 2017.

Inclui referências.

1. Ciência dos Alimentos. 2. Antocianinas. 3. Quitosana. 4. Embalagem Inteligente. 5. Filmes Biodegradáveis. I. Barreto, Prof.º Dr.º Pedro Luiz Manique. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos. III. Título.

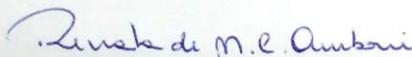
DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE FILME
INDICADOR DE pH COM EXTRATO DE REPOLHO ROXO
PARA MONITORAMENTO DA QUALIDADE DE ALIMENTOS

Por

Michelle Heck Machado

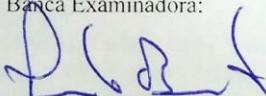
Esta Dissertação foi julgada adequada para obtenção do Título de "Mestrado em Ciência dos Alimentos", e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos.

Florianópolis, 20 de fevereiro de 2017.

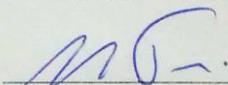


Prof.^a Dr.^a Renata Dias de Mello Castanho Amboni
Coordenador

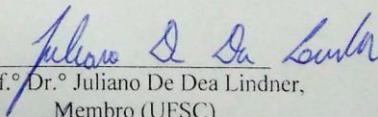
Banca Examinadora:



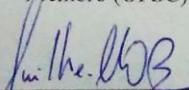
Prof.^o Dr.^o Pedro Luiz Manique Barreto,
Orientador (UFSC)



Prof.^o Dr.^o Giustino Tribuzi,
Membro (UFSC)



Prof.^o Dr.^o Juliano De Dea Lindner,
Membro (UFSC)



Prof.^o Dr.^o Guilherme Mariz de Oliveira Barra,
Membro (UFSC)

RESUMO

O conteúdo de antocianinas foi extraído e concentrado. Os extratos foram encapsulados por *spray drying* e suas propriedades físico-químicas determinadas. A estabilidade térmica dos extratos foi avaliada a partir das análises de TG e DSC. A cor dos extratos secos foi avaliada pela variação da cor com relação a cor dos extratos de origem. Os extratos foram caracterizados quanto ao teor de antocinainas e efetividade na expressão da cor, para utilização como corante grau alimentício. Além disso, filmes de quitosana, PVA e sorbitol com adição de extrato antocianinas comercial foram produzidos e as propriedades mecânicas, físico-químicas, morfológicas e de estabilidade térmica foram determinadas. A presença das antocianinas nos filmes foi verificada pela medição da cor em diferentes condições de pH. Uma formulação de filme com propriedades elegíveis para aplicação em embalagem de alimentos foi acondicionada em caldos de crescimento microbiano e a variação da cor foi estudada. Filmes foram desenvolvidos a partir da formulação polimérica ideal (70/30/10) e adicionados das micropartículas dos extratos hidroalcolóico e concentrado. Os filmes foram submetidos a teste em degradação de matriz alimentar para avaliação da variação da cor em decorrência da deterioração do alimento.

Palavras chave: Antocianinas, maltodextrina, goma Arábica, quitosana, PVA, filmes biodegradáveis, embalagem inteligente.

ABSTRACT

The anthocyanin content was extracted and concentrated. The extracts were encapsulated by spray drying and their physicochemical properties determined. Extracts thermal stability of was evaluated from the TG and DSC analyzes. The dried extracts color was evaluated by the variation of the color regarding the origin extracts color. The extracts were characterized in terms of anthocyanin content and effectiveness in color expression, for use as food grade dye. In addition, films of chitosan, PVA and sorbitol with addition of commercial anthocyanins extract were produced and the mechanical, physicochemical, morphological and thermal stability properties determined. The presence of anthocyanins in the films was verified by measuring the color at different pH conditions. A film formulation with properties eligible for food packaging application was packed in microbial growth broths and its color variation was studied. Films were developed from the ideal polymer formulation (70/30/10) and added from the microparticles of the hydroalcoholic and concentrated extracts. The films were submitted to food matrix degradation test to evaluate color variation due to food deterioration.

Keywords: Anthocyanins, maltodextrin, gum Arabic, chitosan, PVA, biodegradable films, intelligent packaging.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1: REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	22
Figura 1 - Matérias-primas utilizadas na obtenção de biopolímeros	23
Figura 2 - Estruturas químicas monoméricas da quitina e quitosana	30
Figura 3 - Estrutura química da quitina e quitosana	31
Figura 4 - Aplicações da quitosana na indústria de alimentos	33
Figura 5 - Estrutura química da unidade de repetição do PVA	37
Figura 6 - Estruturas básica do cátion <i>flavylium</i>	46
Figura 7 - Estrutura molecular da cianidina, principal aglicona encontrada nos extratos de repolho roxo	47
Figura 8 - Transformações estruturais de antocianinas em relação ao pH do meio	49
CAPÍTULO 2: EXTRAÇÃO, DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE MICROPARTÍCULAS DE ANTOCIANINAS DO REPOLHO ROXO	84
Figura 1 – Micrografias por MEV dos extratos EC25/25; EC35/15 e EC50/0 nos aumentos 100, 500 e 1,500x	109
Figura 2 – Micrografias por MEV dos extratos EH25/25; EH35/15 e EH50/0 nos aumentos 100, 500 e 1,500x	110
Figura 3 – Curvas de TG dos polissacarídeos maltodextrina e goma Arábica <i>in bulk</i>	111
Figura 4 – Curvas de TG dos extratos EC25/25, EC35/15 e EC50/0	113
Figura 5 – Curvas de TG dos extratos EH25/25, EH35/15 e EH50/0	114
Figura 6 – Curvas de DSC dos polissacarídeos MD e GA, e do ácido cítrico utilizados nos extratos	115
Figura 7 – Curvas de DSC dos extratos secos obtidos a partir do EC	116
Figura 8 – Curvas de DSC dos extratos secos obtidos a partir do EH	116
Figura 9 – Espectroscopia no Infravermelho dos polissacarídeos maltodextrina (B); goma Arábica (A)	118
Figura 10 - Espectroscopia no Infravermelho do extrato EH (A), e das micropartículas EH25/25 (B); EH35/15 (C); e EH50/0 (D)	120
Figura 11 - Espectroscopia no Infravermelho do extrato EC (A), e das micropartículas EC25/25 (B); EC35/15 (C); e EC50/0 (D)	120
CAPÍTULO 3: DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE FILMES DE QUITOSANA E poli(ÁLCOOL VINÍLICO) CONTENDO ANTOCIANINAS COMO INDICADOR NATURAL DO pH	131
Figura 1 – Incubação dos filmes controle e 70/30/10 nos meios de cultura CN, CA e VM/ VP	145
Figura 2 – Ângulo de contato dos filmes indicadores de pH e água	160
Figura 3 – Ângulo de contato dos filmes indicadores de pH e formamida	161
Figura 4 – Ângulo de contato dos filmes indicadores de pH e diiodometano	161
Figura 5 – Micrografias da superfície e seção transversal dos filmes controle (100/0/0) e 100/0/10, nos aumentos 1000 e 2300x	163
Figura 6 – Micrografias da superfície e seção transversal dos filmes, nos aumentos 1000 e 2300x	164
Figura 7 – Espectroscopia no UV-visível dos filmes indicadores de pH	165
Figura 8 – Opacidade dos filmes indicadores de pH	166
Figura 9 – Espectroscopia no Infravermelho dos polímeros QTS, PVA e Sorbitol	168
Figura 10 – Espectroscopia no Infravermelho para os filmes indicadores de pH	168

Figura 11 – Curvas termogravimétricas dos polímeros quitosana, PVA e sorbitol utilizados na obtenção dos biofilmes	170
Figura 12 – Curvas termogravimétricas dos biofilmes indicadores de pH	171
Figura 13 – Curvas de DSC dos polímeros quitosana (QTS), poli(álcool vinílico) (PVA) e sorbitol (sorb) utilizados na obtenção dos filmes indicadores de pH	172
Figura 14 – Curvas de DSC dos biofilmes indicadores de pH	173
Figura 15 – Filmes submersos em solução tampão de diferentes pH	181
Figura 16 – Filmes após imersão durante 24 horas em solução tampão de diferentes pH	182
Figura 17 – Expressão da cor dos filmes com extratos de antocianinas	186
Figura 18 – Ativação dos filmes em matriz alimentar após 5 dias	188

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 2: EXTRAÇÃO, DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE MICROPARTÍCULAS DE ANTOCIANINAS DO REPOLHO ROXO	87
Tabela 1 – Teor de antocianinas monoméricas expressas em mg.100g ⁻¹ e rendimento (%) do processo de secagem	101
Tabela 2 – Propriedades da cor dos extratos de antocianinas do repolho roxo.	103
Tabela 3 – Teor de umidade dos extratos de antocianinas	104
Tabela 4 – Atividade de água dos extratos de antocianinas após secagem	105
Tabela 5 – Higroscopicidade dos extratos de antocianinas após secagem	106
07 do tamanho médio das micropartículas obtidos por MEV	107
Tabela 7 – Parâmetros das transições térmicas das micropartículas contendo antocianinas do repolho roxo	112
CAPÍTULO 3: DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE FILMES DE QUITOSANA E poli(ÁLCOOL VINÍLICO) CONTENDO ANTOCIANINAS COMO INDICADOR NATURAL DO pH	131
Tabela 1 – Espessura dos filmes de quitosana e PVA contendo antocianinas como indicador de pH	148
Tabela 2 – Propriedades mecânicas dos filmes de QTS e PVA contendo antocianina como indicador de pH	150
Tabela 3 – Estudo comparativo das propriedades mecânicas dos filmes indicadores de pH e dados encontrados na literatura	151
Tabela 4 – Propriedades da cor dos filmes de QTS e PVA contendo antocianinas.	156
Tabela 5 – Comportamento reológico das soluções formadoras de filmes	157
Tabela 6 – Teor de umidade dos filmes indicadores de pH	158
Tabela 7 – Ângulo de contato, energia livre superficial total, componente dispersivo e componente polar dos filmes em contato com a água, formamida e diiodometano	159
Tabela 8 - Parâmetros das transições térmicas dos biofilmes indicadores de pH	170
Tabela 9 – Parâmetros L^* , a^* e b^* do filme controle em diferentes condições de pH	176
Tabela 10 – Parâmetros L^* , a^* e b^* dos filmes indicadores de pH 100/0/10 e 70/30/10 em diferentes condições de pH	177
Tabela 11 – Parâmetros L^* , a^* e b^* dos filmes indicadores de pH 50/50/10 e 30/70/10 em diferentes condições de pH	178
Tabela 12 – Coordenadas polares (C^* e H°) e variação total da cor (ΔE) dos filmes submetidos a faixa de pH entre 1,0 e 12,0	180
Tabela 13 - Crescimento microbiano, variação do pH e cor no filme controle e indicador de pH	184
Tabela 14 – Parâmetros L^* , a^* e b^* para os filmes obtidos a partir do extrato de antocianina	186
Tabela 15 – Coordenadas C^* e H° e variação total da cor dos filmes obtidos a partir dos extratos de antocianina EC e EH	186
Tabela 16 – Coordenadas C^* e H° e variação total da cor dos filmes em ativação em matriz alimentar	187

LISTA DE ABREVIATURAS E SIMBOLOS

ΔE	Variação total da cor
Aa	Atividade de água
ANOVA	Análise de variância
ANT	Antocianinas
DSC	Differential scanning calorimetry/calorimetria exploratória diferencial
EH	Extrato hidroalcolico do repolho roxo
EC	Extrato concentrado do repolho roxo
EH25/25	Micropartícula EH (MD 25g, GA 25g)
EH35/15	Micropartícula EH (MD 35g, GA 15g)
EH50/0	Micropartícula EH (MD 50g, GA 0g)
EC25/25	Micropartícula EC (MD 25g, GA 25g)
EC35/15	Micropartícula EC (MD 35g, GA 15g)
EC50/0	Micropartícula EC (MD 50g, GA 0g)
FTIR	<i>Fourier transform infrared spectroscopy</i> /Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier/
GA	Goma Arábica
ME	Módulo de elasticidade ou módulo de Young
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
MD	Maltodextrina
PVA	Poli (álcool vinílico)
QTS	Quitosana
TG	Análise de termogravimetria
TS	Tensão na ruptura
UR	Umidade Relativa
UV	Ultravioleta
γ	Taxa de deformação
γ^d	Energia livre superficial dispersiva
γ^p	Energia livre superficial polar
γ^T	Energia livre superficial total
τ	Tensão de cisalhamento
k	Índice de consistência
n	Índice de comportamento de fluxo

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	19
1.1 OBJETIVOS.....	21
1.1.1 Objetivo Geral.....	21
1.1.2 Objetivos Específicos.....	21
CAPÍTULO 1: REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	23
1 PANORAMA GERAL	25
2 QUITOSANA	29
2.1 Propriedades biológicas da quitosana	34
2.2 Polímeros biodegradáveis	36
3 CARACTERIZAÇÃO DOS FILMES	38
4 ANTOCIANINAS	42
4.1 Propriedades de cor.....	47
5 DETERIORAÇÃO DE ALIMENTOS	53
REFERÊNCIAS	57
CAPÍTULO 2: EXTRAÇÃO, DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE MICROPARTÍCULAS DE ANTOCIANINAS DO REPOLHO ROXO	87
1 INTRODUÇÃO	91
2 MATERIAL E MÉTODOS	95
2.1 Material.....	95
2.2 Extração de antocianinas do repolho roxo	95
2.3 Secagem dos extratos.....	96
2.4 Caracterização das micropartículas de antocianinas	97
2.5 Análise estatística.....	100
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	101
3.1 Teor de antocianinas	101
3.2 Determinação da cor dos extratos	102
3.3 Teor de umidade	104
3.4 Atividade de água	105
3.5 Higroscopicidade	105
3.6 Morfologia das partículas.....	107
3.7 Análises térmicas	111
3.8 Espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier (IV)	117
CONCLUSÃO	122
REFERÊNCIAS	123

CAPÍTULO 3: DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE FILMES DE QUITOSANA E poli(ÁLCOOL VINÍLICO) CONTENDO ANTOCIANINAS COMO INDICADOR NATURAL DO pH	131
1 INTRODUÇÃO	135
2 MATERIAL E MÉTODOS	138
2.1 Material.....	138
2.2 Obtenção dos filmes	138
2.3 Propriedades físico-químicas dos filmes	138
2.4 Determinação da cor dos filmes	139
2.5 Comportamento reológico das soluções filmogênicas.....	140
2.6 Teor de umidade	140
2.7 Ângulo de contato e energia livre superficial	141
2.8 Morfologia dos filmes.....	141
2.9 Absorbância e opacidade	142
2.10 Espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier (IV).....	142
2.11 Análises térmicas	143
2.13 Eficiência da Cor e pH.....	143
2.14 Eficiência da cor e crescimento microbiano	144
2.16 Análise estatística	146
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	148
3.1 Propriedades físico-químicas dos filmes	148
3.2 Determinação da cor dos filmes	154
3.3 Comportamento reológico das soluções filmogênicas.....	157
3.4 Teor de umidade	158
3.5 Ângulo de contato e energia livre superficial	158
3.6 Morfologia dos filmes.....	162
3.7 Absorbância e opacidade	165
3.8 Espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier (IV).....	166
3.9 Análises térmicas	169
3.10 Eficiência da cor e pH.....	173
3.11 Eficiência da cor e crescimento microbiano	183
3.12 Ativação do filme indicador de pH.....	185
CONCLUSÃO	189
REFERÊNCIAS.....	190

1 INTRODUÇÃO

Atualmente, há um interesse crescente no desenvolvimento de embalagens obtidas a partir de polímeros naturais. Além de biodegradáveis, os polímeros naturais promovem proteção aos alimentos nos quais compõem um sistema de embalagem (DUTTA et al., 2009; YOSHIDA; BASTOS; FRANCO, 2010; YOSHIDA; OLIVEIRA-JUNIOR; FRANCO, 2009). Dentre a utilização das embalagens biodegradáveis estão presentes as embalagens ativas, que podem promover o aumento na vida de prateleira (KROCHTA, 1997) e, além disso, são capazes de monitorar a condição de produtos embalados, assim denominadas embalagens inteligentes. Por meio da promoção da segurança dos alimentos, o desenvolvimento de embalagens ativas que proporcionam ao consumidor informações referentes à qualidade sanitária do alimento, são de grande importância na tecnologia de alimentos.

É neste contexto em que se encontram os filmes de quitosana e álcool polivinílico. O emprego das antocianinas nos filmes se dá referente a sua capacidade de mudança de cor em decorrência da variação do pH (DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2010; MORETTO; FETT, 1988). Pigmentos naturais hidrossolúveis de estrutura polifenólica, as antocianinas são responsáveis pelas cores vermelho, azul e roxo de diversas frutas, legumes e grãos, assim, um dos grupos de pigmentos de maior distribuição no reino vegetal. É um corante orgânico natural, obtido, principalmente, a partir de cascas de uva (JANIK et al., 2007; MORETTO; FETT, 1988; DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2010). O repolho roxo (*Brassica oleracea L. var. Capitata f. rubra*) é uma promissora fonte para obtenção de antocianinas na forma concentrada que podem ser empregadas como alternativa à utilização de corantes comerciais e sintéticos em alimentos. Devido à presença das antocianinas, o extrato do repolho roxo apresenta coloração vermelha em pH ácido que tende ao azul a medida que o pH aumenta (DYRBY et al., 2001).

Para promoção da estabilidade e concentração, extratos aquosos de antocianinas são secos, favorecendo a estabilidade físico-química e microbiológica, o que facilita a manipulação do pigmento (TEIXEIRA; BASSANI, 1997; OLIVEIRA; PETROVICK, 2009). Uma das tecnologias empregadas na secagem de extratos é o *spray drying*. O *spray drying* tem ampla utilização na indústria de alimentos por ser uma técnica de baixo custo e fácil operação, podendo ser conduzido em grande escala.

É definido como um processo de secagem pela remoção de umidade através do rápido contato com o calor (HASHIB et al., 2015).

A quitosana tem utilização ampla na produção de filmes para o revestimento de alimentos, graças as suas excelentes propriedades de formação de filmes. É um amino polissacarídeo catiônico que permite o acoplamento de ligantes (BRINE et al., 1992; MUZZARELLI, 2003). Para promoção das propriedades de alongação e diminuição do módulo de Young, o PVA é comumente utilizado para formação de filmes de blendas com a quitosana (MILOSAVLJEVIC et al., 2010; PARPARITA; CHIABURU; VASILE, 2012). O PVA é um polímero biodegradável solúvel em água, utilizado na elaboração de blendas poliméricas por apresentar elevada resistência mecânica e flexibilidade (KAYAL; RAMANUJAN, 2010; CHEN et al., 2014).

Assim, a elaboração dos filmes de quitosana, PVA e antocianinas pode ser uma matriz inovadora com benefícios ao consumidor sem gerar impactos ambientais. A qualidade higiênico-sanitária de alimentos perecíveis é extremamente requisitada, uma vez que esses produtos são importantes fontes de nutrientes e por isso têm deterioração microbiana facilitada. Para tanto, serão elaborados filmes de quitosana e blendas de PVA, contendo antocianinas, como indicador colorimétrico natural de pH. As antocianinas testadas serão obtidas comercialmente e a partir do extrato de repolho roxo seco por *spray drying*. Os filmes obtidos serão caracterizados quanto às propriedades físico-químicas e a efetividade da mudança de cor com o pH.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo Geral

O presente estudo tem como objetivo desenvolver filme indicador do pH, para composição de um sistema de embalagem inteligente capaz de identificar indiretamente alterações referentes a deterioração de alimentos perecíveis por meio da mudança de cor.

1.1.2 Objetivos Específicos

- a) Elaborar extratos de antocianinas provenientes do repolho roxo;
- b) Avaliar o impacto da concentração e secagem no teor de antocianinas;
- c) Determinar as propriedades térmicas e eficiência da cor dos extratos de antocianinas;
- d) Desenvolver filmes poliméricos a partir da blenda de quitosana, PVA e sorbitol, em presença de extrato de antocianinas comercial;
- e) Caracterizar os filmes quanto às propriedades mecânicas aplicáveis;
- f) Verificar a eficiência da variação da cor dos filmes frente a diferentes condições de pH;
- g) Aplicar o extrato de antocianinas do repolho roxo em matriz filmogênica;
- h) Determinar condição de pH necessária para variação da cor nos filmes em detrimento do crescimento microbiano;
- i) Avaliar a efetividade na determinação da deterioração indireta de matriz alimentar pela mudança de cor nos filmes contendo os extratos de repolho roxo e de antocianinas comercial, em comparação com filme contendo indicador de pH sintético.

CAPÍTULO 1: REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1 PANORAMA GERAL

É crescente o interesse na substituição de embalagens obtidas a partir de polímeros sintéticos por aquelas desenvolvidas com a utilização de polímeros naturais e biodegradáveis. Tal interesse deve-se à demanda dos consumidores por alimentos de alta qualidade além das considerações ambientais em relação ao acúmulo de embalagens não biodegradáveis, o que é observado devido ao aumento das preocupações política e social com a preservação ambiental, e assim, das relações de atividade industrial que podem afetar esta (BOTREL et al., 2007; FAI; STAMFORD; STAMFORD, 2008).

Atualmente, as embalagens sintéticas contribuem cerca de 20 % do total de lixo produzido no mundo. Capazes de garantir a proteção desejada para diversos tipos de alimentos, porém, são considerados materiais inertes ao ataque de micro-organismos deteriorantes, ou seja, não biodegradáveis. Essa propriedade faz com que essas embalagens favoreçam a proteção e o manuseio de alimentos por apresentem longo período de vida, em contrapartida, favorece o acúmulo de embalagens no meio ambiente, acarretando em sérios problemas ecológicos, quando levado em consideração um período de decomposição relativo a centenas de anos (HALLEY et al., 2001; LAROTONDA, 2002; LEITE et al., 1999).

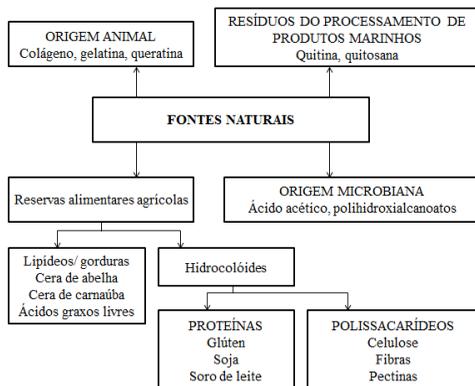
Neste contexto, a utilização de matérias-primas (polímeros naturais) de origem animal e vegetal para a produção de biofilmes representa uma alternativa para o desenvolvimento tecnológico ambientalmente sustentável. Assim, o uso de polissacarídeos, lipídeos e proteínas na fabricação de filmes biodegradáveis cresce consideravelmente nas últimas décadas, motivado pelas suas vantagens ecológicas, quando comparado a embalagens poliméricas convencionais, tornando-se uma oportunidade de criação de mercado para a produção de filmes de fontes renováveis (BOTREL et al., 2007; FAI; STAMFORD; STAMFORD, 2008).

Uma série de problemas dificulta a ampliação das pesquisas em escala laboratorial para atingir a aplicação na indústria, dentre eles a falta de legislação, a aparência similar entre embalagens poliméricas convencionais com aquelas biodegradáveis, dificultando uma possível separação para a coleta seletiva dos mesmos. Ainda, o custo relacionado à obtenção dos biopolímeros também pode ser um fator confrontante à ampla utilização dos polímeros convencionais. Porém, a demanda anual

de polímeros biodegradáveis pode alcançar a marca de 20 mil toneladas até 2022. O apelo de *marketing* e o modismo ecológico também influenciam o avanço desse mercado, mas os principais responsáveis são os preços competitivos e a qualidade da matéria-prima (CUQ et al., 1995; NAYAK, 1999; ARVANITTOYANNIS et al., 1997; LAROTONDA, 2002; MATSUI, 2002).

Os biopolímeros têm sido um foco de interesse para o desenvolvimento de novas tecnologias que visam, entre outros aspectos, a preservação ambiental e a busca de potenciais alternativas na substituição de embalagens convencionais oriundas de fontes não-renováveis. Dentre os compostos mais utilizados na elaboração de filmes biodegradáveis estão as proteínas (gelatina, caseína, ovoalbumina, glúten de trigo, zeína e proteínas miofibrilares), os polissacarídeos (amido e seus derivados, pectina, celulose e seus derivados, alginato e carragena) e os lipídios (monoglicerídeos acetilados, ácido esteárico, ceras e ésteres de ácido graxo) ou a combinação dos mesmos (CUQ et al., 1995; NAYAK, 1999; ARVANITTOYANNIS et al., 1997; LAROTONDA, 2002; MATSUI, 2002). Sendo que as principais fontes de biopolímeros (Figura 1) são os polissacarídeos e as proteínas provenientes do leite, da soja, do algodão, do amendoim e de tecidos musculares (GENNADIOS et al., 1994; ARVANITTOYANNIS et al., 1998; SOBRAL, 2000; ANKER et al., 2002; BIGI et al., 2002; BARRETO et al., 2003).

Figura 1 - Matérias-primas utilizadas na obtenção de biopolímeros



Fonte: Tharanathan, 2003.

Polímeros biodegradáveis podem ser classificados em três categorias: polímeros naturais biodegradáveis; polímeros sintéticos biodegradáveis e polímeros naturais modificados biodegradáveis. Os biopolímeros são geralmente produzidos na natureza por todos os organismos vivos, sem interferência humana. São derivados de recursos naturais como plantas e fermentação bacteriana (LAROTONDA, 2002; NAYAK, 1999).

Vários compostos sintéticos de baixa massa molar são biodegradáveis, entretanto poucos polímeros sintéticos são biodegradáveis. Dentro dos polímeros sintéticos, os poliésteres alifáticos são geralmente conhecidos por serem susceptíveis ao ataque biológico. O poli (adipato de etileno) (PEA) e a poli (ϵ -caprolactona) (PCL) são degradados por fungos do gênero *Penicillium* sp., e os poliésteres alifáticos e alicíclicos como os poliuretanos e copoliésteres podem ser hidrolisados por lipases e esterases (NAYAK, 1999).

Os biopolímeros são capazes de formar filmes. Os filmes biodegradáveis podem ser classificados quando a natureza do material utilizado para sua produção, sendo a base de proteínas, polissacarídeos, lipídeos e compósitos (produzidos pela mistura de alguns componentes antes mencionados) (KESTER; FENNEMA, 1986).

Dentre os polímeros biodegradáveis encontra-se a quitosana, um polímero atóxico, biocompatível e produzido por fontes naturais renováveis, cujas propriedades vêm sendo exploradas em aplicações industriais e tecnológicas (DUTTA et al., 2009; YOSHIDA; BASTOS; FRANCO, 2010; YOSHIDA; OLIVEIRA-JUNIOR; FRANCO, 2009; GOOSEN, 1996). Além de possuírem a função de inibir ou reduzir a migração de umidade, oxigênio, dióxido de carbono, lipídios, aromas, dentre outros, pois promovem barreiras semipermeáveis, os filmes biodegradáveis de quitosana podem atuar no transporte de ingredientes alimentícios como: antioxidantes, antimicrobianos e flavorizantes, e ainda, melhorar a integridade mecânica, assim, conceituadas embalagens ativas (KROCHTA, 1997). Inúmeras pesquisas têm mostrado a utilização potencial de revestimentos incorporados de agentes ativos que contribuem na manutenção e prolongamento da vida de prateleira de alimentos de origem vegetal ou animal (KUBOTA et al., 2000; KUMAR, 2000; PEN; JIANG, 2003; CAMILLI, 2007). Como na conservação de salmão, Sathivel (2005), verificou diminuição na perda de massa e da ocorrência de oxidação lipídica em filés revestidos de biofilme a base de quitosana (1 e 2%).

A propriedade de formação de filmes semipermeáveis desperta o interesse em pesquisas, e contribui para o aumento do emprego de quitosana e a busca por novas aplicações em diversas áreas. Sabe-se que a aplicação de filmes de quitosana sobre frutos contribui na diminuição de perdas por transpiração e desidratação, além de retardar o amadurecimento e escurecimento de alguns destes, tal fato se deve a modificação da atmosfera ao redor do alimento pela permeabilidade do filme (PEN; JIANG, 2003), que também está relacionada à diminuição das perdas de antocianinas, flavonóides, e compostos fenólicos totais por atuar na inibição de enzimas como a polifenoloxidase e a peroxidase (ZHANG, 1997).

Filmes biodegradáveis de quitosana são conhecidos, também, por possuírem ação antifúngica e antibacteriana, propriedades, estas que vêm sendo estudadas no incremento da vida útil pós-colheita de frutas e hortaliças (DA COSTA, 2009; CAMILI, 2007). Neste âmbito, quitosana pode exercer dupla função, interferindo diretamente no desenvolvimento do patógeno e ativando várias respostas de defesa no tecido vegetal, sendo uma delas a criação de uma barreira à saída de nutrientes, reduzindo sua disponibilidade e restringindo o crescimento de patógenos (BAUTISTA-BAÑOS et al., 2006; EL GHAOUTH et al., 1994).

Neste contexto, as embalagens inteligentes podem ser definidas como embalagens capazes de detectar traços ou sinais monitorando a condição de produtos embalados para fornecer informações de perecibilidade, além de atuar como ajudante na promoção da qualidade, estendendo a vida de prateleira e reforçando a segurança, para assim, melhorar a qualidade (AHVENAINEN, 2003; YAM et al., 2005; YAM; TAKHISTOV; MILTZ, 2005).

Veiga-Santos, Ditchfield e Tadini (2011) desenvolveram filme biodegradável indicador de pH à base de amido de mandioca contendo extratos de uva e espinafre como um indicador de pH. Maciel, Yoshida, e Franco (2012) desenvolveram um protótipo de um indicador de temperatura colorimétrico para monitorar a qualidade dos alimentos. Yoshida, Bastos e Franco (2010) estudaram um indicador colorimétrico de sulfeto de hidrogênio baseado em matriz de quitosana.

Em geral, sistemas de indicadores fornecem informações qualitativas por mudanças colorimétricas visuais. Estas podem estar associadas à vida útil de alimentos. Indicadores de pH à base de cor oferecem uma potencial utilização como indicadores de metabólitos microbianos (KERRY; O'GRADY; HOGAN, 2006), ou seja, como o

crescimento de micro-organismos pode induzir uma alteração de pH e consequente deterioração do alimento (SMOLANDER, 2003). Indicadores visuais são substâncias capazes de mudar de cor dependendo das características físico-químicas da solução na qual estão contidos, 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 (BACAN et al., 1979; BÁNYAI, 1972).

2 QUITOSANA

Inicialmente, a quitina foi isolada de cogumelos pelo professor francês Henri Braconnot no ano de 1811. Já em 1823, Odier isolou uma substância insolúvel contida na carapaça dos insetos e passou a chamá-la de quitina (do grego – *Chiton*), que significa carapaça ou caixa protetora. Este, afirmou que se tratava da mesma substância encontrada nas plantas, a celulose, no entanto, somente em 1843, Payen detectou que a quitina continha nitrogênio em sua estrutura e a diferenciou da celulose (ALMEIDA, 2009).

Apesar de a quitina ser amplamente distribuída na natureza, sendo comumente extraída do exoesqueleto de crustáceos como caranguejo e camarão, a ocorrência natural da quitina é relatada nas mais diversas espécies, como em animais marinhos e anelídeos, moluscos, camarão, lagosta e crustáceos; além dos insetos – escorpião, aranha, formiga e besouro; e dos micro-organismos, como algas verdes, parede celular de alguns fungos e leveduras. A quantidade de quitina varia não somente no tipo de animal, bem como nas partes do mesmo (PETER et al., 2002). No caso do camarão, o resíduo obtido apresenta cerca de 5% de quitina (SOARES et al., 2003), enquanto que os exoesqueletos de crustáceos, como o siri, podem apresentar entre 15-20% (NACZK et al., 2004; MATHUR; NARANG, 1990).

Depois da celulose, a quitina é o biopolímero mais abundante encontrado na natureza (MOURA, 2008). Apresenta estrutura cristalina ou amorfa, insolúvel em água, solvente orgânico e em alguns ácidos e bases diluídas, sendo que em presença de ácidos minerais concentrados pode ocorrer degradação da cadeia polimérica (MATHUR; NARANG, 1990).

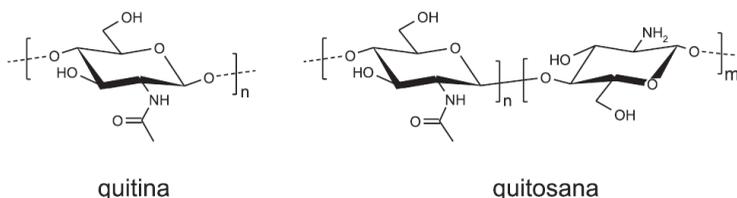
Em geral, a quitina não é comumente encontrada na natureza como substância pura, uma vez que está associada a outros compostos

como proteínas, sais minerais, pigmentos e lipídeos (MACHOVÁ et al., 1999). Em sua forma pura, somente foi encontrada em algas diatomáceas como *Thalassiosira fluviatis* e *Cyclotella cryptia*. Portanto, para sua obtenção, são necessários processos de purificação, os quais removem os componentes indesejados e que também podem provocar modificações na sua estrutura nativa (KHOR, 2002).

O principal produto da quitina é a quitosana, que possui maior valor comercial e propriedades de interesse para âmbito industrial e para fins de pesquisa. Semelhante a quitina, a quitosana é um dos principais componentes do exoesqueleto de crustáceos e insetos, está presente, também, nas paredes celulares e esporos de alguns fungos (*Mucor* e *Zygomycetes*) e leveduras em pequenas quantidades (KEFETZOULOS; MARTINOV; BOURIOTIS, 1993).

A quitosana é um amino polissacarídeo catiônico de elevada massa molecular, solúvel em ácidos orgânicos, sendo considerada segura para consumo humano (*GRAS – Generally Recognized as Safe*) (BORIWANWATTANARAK et al., 2008; JIANG et al., 2005). Pode ser obtida a partir da hidrólise alcalina da quitina, a quitosana (Figura 2) é um copolímero constituído predominantemente por unidades do monômero *D*-glicosamina, com poucas unidades de *N*-acetil-*D*-glicosamina em sua formação. Já a quitina, tem como componente principal o *N*-acetil-*D*-glicosamina predominante em sua estrutura (KIMURA et al., 1999; KUBOTA et al., 2000; MATHUR; NARANG, 1990).

Figura 2 - Estruturas químicas monoméricas da quitina e quitosana



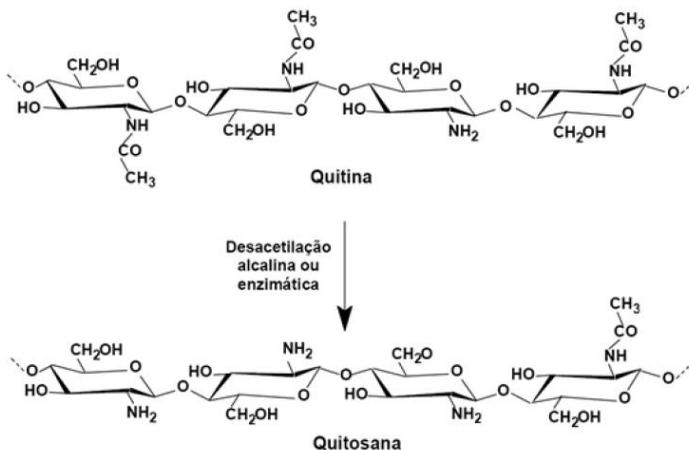
Fonte: Silva, Santos e Ferreira (2006).

Assim, quitina e quitosana diferem quanto à proporção relativa dessas unidades monoméricas, sendo que a quitosana apresenta solubilidade em solução aquosa de ácido acético 1% (v/v). A quitina, contendo um número $\geq 40\%$ de *N*-acetil-*D*-glicosamina ($FA \geq 0.4$) é

insolúvel, visto que os polímeros solúveis são chamados de quitosana (PETER, 2002). A massa molecular da quitina natural é frequentemente maior que 1000 kDa, enquanto que a da quitosana comercial fica em torno de 100 kDa, dependendo das condições de produção (GOMES, 2007).

Na Figura 3 são apresentadas as estruturas químicas da quitina e quitosana, onde a quitina possui uma fração molar dos grupos *N*-acetil-*D*-glicosamina (FA) de 0,75 e a quitosana possui FA de 0,25. De acordo com o grau médio de acetilação (GA), parâmetro empregado para caracterizar o conteúdo médio de unidades *N*-acetil-*D*-glicosamina de quitina e quitosana, podem-se obter diversas quitosanas variando-se, assim, suas propriedades físico-químicas, como solubilidade, pKa e viscosidade (SINGLA; CHAWLA, 2001). Estas características podem influenciar na biodegradabilidade do mesmo, principalmente na acessibilidade enzimática, influenciando a hidrólise do polissacarídeo (KHOR, 2002). Geralmente, é difícil de obter quitosana com elevado grau de desacetilação, pois, à medida que este aumenta a possibilidade de degradação do polímero também aumenta (LE DUNG et al., 1994).

Figura 3 - Estrutura química da quitina e quitosana



Fonte: Neves, 2013.

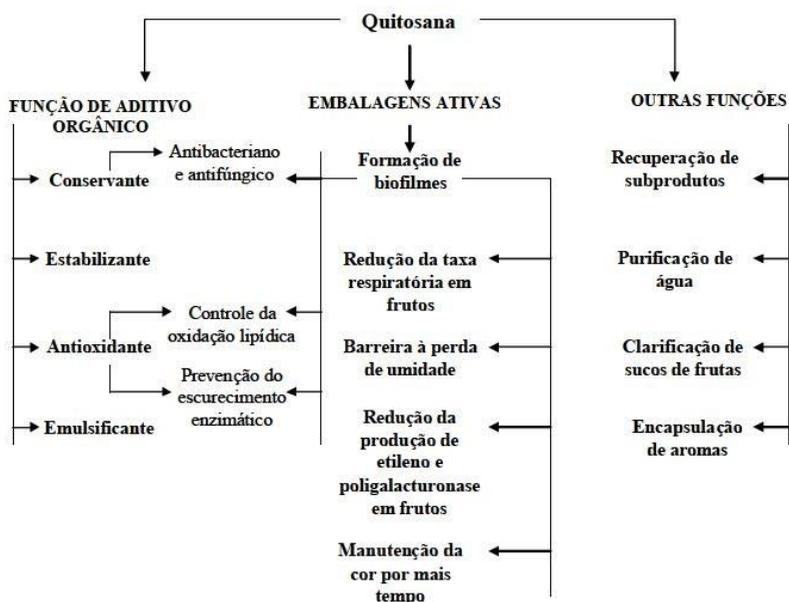
Para obtenção da quitosana, a hidrólise dos grupos acetamida da quitina pode ser alcançada em meio ácido ou alcalino. Cabe ressaltar que as ligações glicosídicas são suscetíveis à hidrólise ácida, e ainda, a

desacetilação da quitina dificilmente se dá completamente, mesmo em meio alcalino. Como mencionado, o prolongamento da reação gera produtos mais desacetilados, porém, pode provocar degradação das cadeias poliméricas (CAMPANA; SIGNINI, 2001; MATHUR; NARANG, 1990; SOLOMONS, 1996). Portanto, os fatores que podem influenciar na eficiência do processo de desacetilação da quitina e, conseqüentemente, nas características da quitosana obtida são o tempo e a temperatura no qual ocorrem a reação, a alcalinidade do meio, o tamanho das partículas de quitina e a presença ou ausência de agentes que evitem a despolimerização (AZEVEDO et al., 2007). Neste processo, é comum a obtenção de quitosana com diferenças no grau de polimerização, na viscosidade e na reatividade química, devido a desacetilação aleatória, bem como a variabilidade de matéria-prima e dos processos utilizados. Tal fato dificulta a obtenção de padrões de quitosana (ARRUDA; SANTANA, 1999) e faz necessária a caracterização adequada do polímero obtido quanto à massa molar, grau de acetilação e distribuição deste grupo ao longo da cadeia polimérica (COSTA SILVA et al., 2006).

A quitosana apresenta um grande número de grupos hidroxila e amino reativos em sua estrutura, permitindo o acoplamento de ligantes, alta biodegradabilidade e grande afinidade por metais pesados, que justificam seu uso (Figura 4) para fins farmacológicos, biomédicos, alimentícios, na agricultura e no tratamento de água e esgoto (KURITA, 1998). Além disso, possui excelente habilidade de formação de filmes, alta reatividade, alta capacidade de adsorção protéica e também baixo custo (YANG et al., 2002). Sua utilização tem sido relatada, especialmente, na indústria farmacêutica, no desenvolvimento de cosméticos (SKJAK-BRAEK; ANTHONSEN; SANDFORD, 1989; BRINE et al., 1992; MUZZARELLI, 2003) e biomateriais, tais como géis, filmes e membranas poliméricas (NAKATSUTA; ANDRADY, 1992; KUBOTA et al., 1993; PHAECHAMUD; KOIZUMI; RITTHIDEJ, 2000), bem como na conservação de alimentos pós-colheita, ou até mesmo, pós-processamento (KUMAR, 2000). Ainda, tem utilização positiva devido ao aumento da preocupação com a segurança ambiental junto a procura por alimentos mais seguros (KUBOTA et al., 2000). Tem mostrado ser um excelente adsorvente para corantes aniônicos. Yoshida et al. (1993) observaram aumentos na capacidade de saturação de fibra de quitosana por corante ácido em pH inferior a 4,0, ou seja, adsorção próxima da concentração de grupos amino do polímero.

Ainda, Kim et al. (1997) relataram o efeito do grau de desacetilação da quitina na adsorção de corantes. No entanto, o uso deste biopolímero num efluente ácido limita a remoção de corantes devido a tendência de solubilização (KIMURA et al., 1999). A capacidade de complexação com diversos íons metálicos possibilita a utilização em processos de remoção de metais, como zinco, prata, cádmio, mercúrio, chumbo, níquel e cromo, que se encontra em níveis acima dos limites de tolerância e/ou permitidos em efluentes (RESENDE, 2007).

Figura 4 - Aplicações da quitosana na indústria de alimentos



Fonte: Fai, Stamford e Stamford, 2008.

Apesar das inúmeras possibilidades de utilização da quitosana, um dos principais fatores limitantes para seu uso é sua baixa solubilidade em água, uma vez que em pH acima de 6,5 sua natureza catiônica começa a ser prejudicada (LIM; HUDSON, 2004), assim, algumas aplicações da quitosana são limitadas por problemas de hidrossolubilidade, condição em que enzimas fisiológicas exercem sua atividade (KUBOTA et al., 2000). Para uso da quitosana na indústria alimentar é indicada sua

solubilização em ácidos orgânicos, tais como ácido acético, ácido cítrico, ácido málico, ácido fórmico, ou ácido ascórbico nas proporções apropriadas, devido à protonação dos grupos amina (OKUYAMA et al., 2000; KUBOTA et al., 2000). Partindo do princípio que derivados de quitosana podem ser preparados a fim de se melhorar sua solubilidade em água, as aplicações deste polímero podem aumentar significativamente (COSTA-SILVA; DOS SANTOS; FERREIRA, 2006). Em pH alcalino (pH=10), Muzzarelli et al. (2003) desenvolveram sistema de quitosana solúvel. Alguns autores relataram a produção de sais de amônio quartenário solúveis em água dotados de atividade antibacteriana, bem como, de sais quartenários de quitosana e *N*-arboximetilquitosana, solúveis em toda a faixa de pH (JIA; SHEN, 2001; LE DUNG et al., 1994). Ainda, estudos anteriores relatam a obtenção de derivados hidrossolúveis da quitosana dotados de propriedades antioxidantes (XIE; XU; LIU, 2001). A forma solúvel de carbamato de amônio tem sido utilizada satisfatoriamente na obtenção de microesferas de quitosana por *spray drying*, visando sua utilização como transportadores de fármacos (MUZZARELLI et al., 2003). No geral, as modificações na estrutura da quitosana são possibilitadas e muitas vezes facilitadas quando em comparação com as modificações químicas realizadas na quitina. Estas são dificultadas em razão de que esse polissacarídeo possui estrutura altamente cristalina, com fortes interações entre hidrogênios intra e intermoleculares (SHIGEMASA et al., 1999).

2.1 Propriedades biológicas da quitosana

A quitosana é relatada como de grande importância biológica uma vez que é considerada um polímero de baixa toxicidade, não alergênico, possui propriedades antibacterianas e antifúngica, podendo ser empregada como anticoagulante (CRINI; BADOT, 2008; BERGER et al., 2004). Muitos pesquisadores reportam a utilização de produtos a base de quitosana para a regeneração de tecidos como de peles artificiais (MA et al., 2003), hidrogéis (YANG et al., 2010), fibras (UENO et al., 1999), filmes (ANTONOV et al., 2008), esponjas (WANG et al., 2008) e curativos, pois auxilia no combate a infecções (ISHIHARA et al., 2002).

Porém, quando utilizada como suplemento alimentar, a quitosana está relacionada à diminuição da absorção de vitaminas lipossolúveis e minerais, como o cálcio, e à desidratação gástrica, em administração de altas doses por longos períodos, tais problemas são causados pelo impacto

ocasionado pelo aumento do volume da mesma uma vez que esta consiste em uma fibra natural que em meio ácido se expande para formar um gel no estômago (SILVA et al., 2006).

Além da baixa toxicidade, é de extrema valia as propriedades antibacterianas e antifúngicas relacionadas à utilização da quitosana na tecnologia de alimentos. O efeito fungicida do biopolímero foi inicialmente descoberto por Allas e Hadwiger (1979) contra diferentes classes de fungos. Desde então, o efeito antimicrobiano contra micro-organismos como bactérias, fungos e leveduras vêm sendo estudado (FAI; STAMFORD; STAMFORD, 2008).

A atividade antimicrobiana é atribuída ao fato de que a quitosana é capaz de mudar sua carga superficial em função do pH da solução em que é acondicionada, ou seja, pela propriedade catiônica. Acredita-se que quando os grupamentos amino da quitosana entram em contato com os fluidos fisiológicos, estes são protonados e se ligam seletivamente à superfície celular dos micro-organismos carregada por grupos aniônicos, ocasionando a aglutinação das células microbianas, e também, a modificação da atividade celular e a alteração na permeabilidade da membrana, resultando na perda de componentes intracelulares e, conseqüente, inibição do crescimento microbiano (YADAV; BHISE, 2004; AVADI et al., 2004; HWANG, 2004; BAUTISTA- BAÑOS; HERNÁNDEZ-LÓPEZ; BOSQUEZ-MOLINA, 2004; RAVI KUMAR, 2000). Ou ainda, considera-se que a atividade antimicrobiana se dá por interação dos grupos amino livres da cadeia polimérica da quitosana, através da penetração da parede celular que impede a transcrição do DNA em RNA (JUNG et al., 1999).

Como a quitosana exibe atividade antifúngica contra a maioria dos fungos filamentosos causadores de doenças alimentares, é indicada como coadjuvante no processamento em indústrias de alimentos, sendo muito utilizada como revestimento de origem natural para alimentos (RHOADES; ROLLER, 2000).

Com relação às bactérias, a quitosana tem sido relatada como inibitória para o crescimento de algumas bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, como *Bacillus cereus*, *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* (ZHENG et al., 2003).

2.2 Polímeros biodegradáveis

Os polímeros biodegradáveis são recursos que, muitas vezes, apresentam algumas desvantagens na aplicação com relação aos polímeros sintéticos. Polímeros biodegradáveis tais como a metilcelulose (MC), (hidroxipropil) metilcelulose (HPMC), acetato de celulose, amido, pectina e lignina, geralmente, têm propriedades mecânicas; resistência à água, propriedades de barreira e propriedades térmicas; inferiores às de polímeros sintéticos (ARVANITTOYANNIS et al., 1998; BHATTACHARYA, 1998).

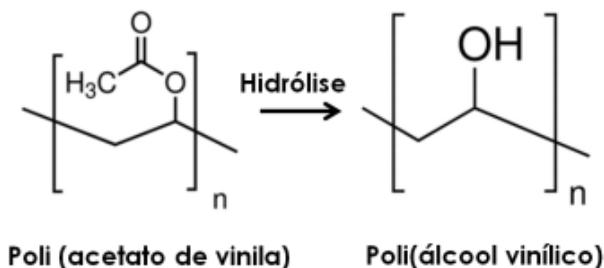
Assim, num contexto de sustentabilidade, sabe-se que uma melhoria das propriedades dos polímeros biodegradáveis se faz necessária para a substituição dos polímeros sintéticos. Algumas possibilidades de promoção das propriedades referentes aos polímeros biodegradáveis são as misturas entre polímeros sintéticos e naturais, (ARVANITTOYANNIS et al., 1998; BHATTACHARYA, 1998) e as misturas entre polímeros naturais (COFFIN; FISHMAN; COOKE, 1995; XU et al., 2005) por incorporação de nanopartículas (TANG; ALAVI, 2012), dentre outros (ALVES; COSTA; COELHO, 2010; SIMKOVIC; LASZLO; THOMPSON, 1996).

Misturas ou blendas de polímeros são, em geral, de grande interesse econômico e também pelas propriedades da mistura que, por sua vez, são melhores no que diz respeito aos polímeros que são empregados na mistura. A estrutura química dos polímeros e as interações entre estes são o fator determinante na promoção das propriedades mecânicas e de estabilidade das misturas (RHIM, 2012). Assim, estudos recentes testaram a mistura de polímeros para desenvolver propriedades desejadas em aplicações específicas (ABUGOCH et al., 2011; BERCEA et al., 2015; COFFIN; FISHMAN, 1994; ESMAEILI; BENJI, 2014; KRISTO; BILIADERIS; ZAMPRAKA, 2007; MIYAMOTO et al., 2011; WU et al., 2009; YOO; KROCHTA, 2011; ZHAI et al., 2004).

O Poli (álcool vinílico) (PVA) é um polímero sintético solúvel em água capaz de formar hidrogéis (NEAMTU et al., 2007), que tem aplicações biomédicas e farmacêuticas devido à sua biocompatibilidade, biodegradabilidade, baixo custo, não tóxico e por apresentar excelentes propriedades mecânicas, que surgem a partir da presença de grupos OH e a formação de ligações de hidrogênio (DE QUEIROZ et al., 2001; HASSAN; PEPPAS, 2000; BERCEA; MORARIU; RUSU, 2013; KAYAL; RAMANUJAN, 2010; DON; KING; CHIU, 2006). O PVA

comercial é frequentemente um copolímero de poli(álcool vinílico) e poli acetato de vinila, do qual o álcool está na forma hidrolisada (Figura 6).

Figura 5 - Estrutura química da unidade de repetição do PVA



Fonte: Bercea et al., 2015.

A formação do hidrogel se dá pela dissolução do polímero semi-cristalino, na qual os cristais do polímero desdobram camada por camada e se juntam à região amorfa adjacente. Esse processo é seguido pela distensão da cadeia na região amorfa (BERCEA et al., 2015). O hidrogel de PVA possui excelente transparência, consistência macia principalmente na forma de membrana, além de apresentar excelente resistência química e também ser biocompatível e biodegradável (BERCEA et al., 2015).

As duas características importantes do PVA que determinam uma série de propriedades do material obtido são o grau de hidrólise e a massa molar. A combinação dessas características influencia a solubilidade, a viscosidade, a resistência mecânica, o poder de dispersão, adesão em superfícies, flexibilidade e assim por diante. A relação entre o percentual de hidroxilas no copolímero final, após a reação de hidrólise, e o número total inicial de grupos acetila representa o grau de hidrólise do PVA. Quando o grau de hidrólise está na faixa de 87-89% o PVA é então chamado parcialmente hidrolisado. A outra forma, totalmente hidrolisada, tem um grau de hidrólise de 98-99% (KAYAL; RAMANUJAN, 2010; DON; KING; CHIU, 2006; CHEN et al., 2014).

O PVA não é mutagênico, nem genotóxico nem apresenta atividade carcinogênica (KAYAL; RAMANUJAN, 2010; DON; KING; CHIU, 2006; CHEN et al., 2014).

O PVA é um dos polímeros mais comuns usados para a incorporação em matriz de quitosana, por apresentar baixa adesão celular e a adsorção de proteínas (KAYAL; RAMANUJAN, 2010; DON; KING; CHIU, 2006; CHEN et al., 2014). Biofilmes compósitos de QTS/ PVA apresentam melhores propriedades térmicas, mecânicas e viscoelásticas quando comparados com os polímeros puros (JIN; BAI, 2002; PARPARITA; CHIABURU; VASILE, 2012) podendo, assim, cumprir com os requisitos para aplicações como biomateriais e na incorporação em embalagens ativas, bem como na indústria cosmética ou alimentar, e no tratamento de águas residuais (JIN; BAI, 2002; PARPARITA; CHIABURU; VASILE, 2012; ABDELAAL et al., 2007; WANG; SUN; WANG, 2014). As misturas de QTS/ PVA são consideradas efetivas no fornecimento e disponibilização de fármacos (SUGIMOTO et al., 1998) ou *in situ*, como na formação física de hidrogéis para aplicações biomédicas ou farmacêuticas (TANG et al., 2007).

Geralmente utilizados em conjunto das blendas poliméricas, o plastificante é uma substância não volátil, com um ponto de ebulição alto, miscível e que quando adicionado a outro material altera as propriedades físicas e/ ou mecânicas dos filmes aos quais é adicionado (BANKER; GORE; SWARBRICK, 1966). Os polióis, como sorbitol, glicerol, polietilenoglicol são plastificantes efetivos devido a sua habilidade em reduzir as ligações de hidrogênio internas ao mesmo tempo em que aumentam os espaços intermoleculares (MCHUGH; KROCHTA, 1994). Assim, o plastificante atua na melhora da flexibilidade e diminuição da fragilidade. A adição de plastificante diminui as forças intermoleculares ao longo da cadeia polimérica, aumentando a flexibilidade e tornando o filme mais fácil de se destacar de seu suporte após o espalhamento da solução formadora do filme (YANG; PAULSON, 2000).

3 CARACTERIZAÇÃO DOS FILMES

O processo de fabricação do filme determina as propriedades associadas à orientação das moléculas, ao grau de cristalinidade, à homogeneidade da distribuição de espessura do filme, bem como a ocorrência ou não de defeitos superficiais. Resistência à tração, rigidez, propagação do rasgo, resistência ao impacto e à perfuração são características muito influenciadas por tais fatores. A capacidade de alongamento de um filme é uma característica do material, que, também, é dependente do estiramento a que o filme foi submetido durante a

fabricação. De modo geral, as propriedades que são influenciadas pela orientação das moléculas na fabricação diferem em relação à direção do filme como, por exemplo, as propriedades de tração e a resistência ao rasgamento (SARANTÓPOULOS et al., 2002).

Assim, biofilmes aplicados em alimentos devem cumprir alguns requisitos como, apresentar boas qualidades sensoriais (transparente, inodoro e insípido), propriedades de barreira, propriedades mecânicas eficientes, estabilidade microbiológica, físico-química e bioquímica, ausência de componentes tóxicos ou prejudiciais à saúde, tecnologia simples, baixo custo e não poluentes (DEBEAUFOR et al., 1998). Os biofilmes são, geralmente, caracterizados quanto à sua espessura, solubilidade, propriedades mecânicas e térmicas, e permeabilidade ao vapor d'água e gases, entre outras características (PEN; JIANG, 2003).

As propriedades mecânicas de um filme são as características mais estudadas, pois elas implicam diretamente em sua utilização. São definidas como: tensão máxima de ruptura, a deformação na ruptura e o módulo de elasticidade. O módulo de elasticidade é uma característica de cada material, que representa a constante de proporcionalidade entre a tensão e a deformação de um corpo (VELDE; KIEKENS, 2002; WARD; HARDLEY, 1998). As propriedades mecânicas de filmes dependem da formulação (macromolécula, solvente, plastificante), do processo de obtenção e do modo de aplicação (pulverização, suspensão, etc.) dos filmes (GONTARD, 1991). Assim, as propriedades mecânicas dos filmes biopolímeros são dependentes das forças intermoleculares, rigidez da cadeia e simetria molecular da matriz tridimensional (JOSEPH; THOMAS, 2002).

A espessura é definida como a distância entre as duas superfícies principais do material, sendo considerado um parâmetro importante para filmes plásticos mono ou multicamadas. Conhecendo-se a espessura, é possível obter informações sobre a resistência mecânica e as propriedades de barreira a gases e ao vapor de água do material, bem como fazer estimativas sobre a vida útil de alimentos acondicionados nestes materiais. Ainda, por meio da determinação da espessura, é possível avaliar a homogeneidade de um filme quanto a este parâmetro. Variações na espessura de um filme acarretam em problemas no seu desempenho mecânico e flutuações nas medições das propriedades de barreira a gases (SARANTÓPOULOS; MORAES, 2009). Nos processos de produção do tipo *casting*, onde ocorre a secagem por evaporação do solvente, o controle da espessura dos filmes se torna mais difícil quando se trabalha

com soluções filmogênica viscosa, devido a dificuldade de espalhar esse material (SOBRAL, 1999).

As propriedades de barreira para filmes flexíveis a serem aplicados em alimentos são variáveis, por exemplo, alta permeabilidade ao oxigênio é desejada para filmes utilizados no acondicionamento de carnes vermelhas frescas, uma vez que o oxigênio permite a formação de oximioglobina, pigmento responsável pela cor característica do produto. Já em alimentos ricos em lipídeos, deseja-se baixa permeabilidade ao oxigênio, a fim de evitar a formação de radicais livres e desenvolvimento de ranço. Além do oxigênio, pode-se citar o vapor de água como outro parâmetro importante, visto que em alimentos com baixa umidade, desejam-se embalagens com baixa permeabilidade ao vapor de água. Essa característica é almejada a fim de evitar o ganho de umidade que favorece a formação de aglomerados e o crescimento microbiano, além interferir nas características de textura. Muitos alimentos são suscetíveis à deterioração devido à absorção de umidade, como os alimentos desidratados e as misturas de pós que podem formar aglomerados em presença de alta umidade, ou como biscoitos, nozes e *snacks* que perdem a textura quando absorvem a umidade do ambiente. Em outros alimentos como carne fresca, queijos, produtos congelados, a perda de umidade deve ser evitada, pois provoca perda de massa, ressecamento, alterações de cor e de textura. O aumento do teor de umidade de alguns alimentos pode acarretar outros efeitos indesejáveis como o crescimento de micro-organismos, alteração de cor e sabor, perdas nutricionais, entre outros (SARANTÓPOULOS; MORAES, 2009; SARANDÓPOULOS; OLIVEIRA; CANAVESI, 2001).

A resistência à água é uma propriedade importante dos filmes biodegradáveis em contato com alimentos que contenham alta atividade de água ou para evitar que o alimento revestido entre em contato direto com a água durante as etapas de processamento, quando desejado (GONTARD; GUILBERT, 1992). Dependendo da aplicação, o filme pode requerer insolubilidade, para proteger a integridade do produto e resistência à água, ou solubilidade no caso de encapsulação de alimento ou de aditivo (BERTUZZI; VIDAURRE; GOTTIFREDI, 2007). A solubilidade em água direciona a aplicação do biofilme como embalagem de produtos alimentícios. Em alguns casos, a sua total solubilização em água pode ser benéfica, como nos produtos semi-prontos destinados ao preparo através do cozimento. Entretanto, quando o alimento é líquido ou

aquoso, filmes biodegradáveis de elevada solubilidade não são indicados (FAKHOURI et al., 2007).

A determinação do ângulo de contato entre a superfície do filme e da água é uma das formas para caracterizar a molhabilidade do material. Uma superfície hidrofílica ou hidrofóbica é definida pelos valores de ângulo de contato. O ângulo de contato com a água quantifica a hidrofobicidade medindo o quanto uma gota de água espalha sobre uma superfície (ESPITIA et al., 2012). Na ciência de superfície, o goniômetro é utilizado para medir o ângulo de contato em que uma interface líquido-vapor encontra uma superfície sólida (HAMBLETON et al., 2009) que é o ângulo entre um plano tangente à gota e a superfície onde o líquido se encontra depositado. Assim, para valores superiores a 90° a superfície é considerada hidrofóbica, quando o ângulo entre filme/ gota é menor do que 90° , o filme tem caráter hidrofílico (SHARMA, 2001). As medições de ângulo de contato com líquidos diferentes (um polar e dois apolares) e com tensões superficiais conhecidas constituem a base para o cálculo do valor de energia de interação de superfície, mas os resultados podem ser diferentes dependendo do método adotado (SHARMA, 2001).

A cor é um atributo fundamental para compra e aceitação um produto no mercado. Em geral, os estudos de eficiência da cor em filmes biodegradáveis são determinados a partir do sistema CIELab, onde L^* varia do preto ao branco (0 a 100), a^* varia do verde ao vermelho (de -60 a +60) e b^* (a partir de -60 a + 60) de azul para amarelo. Geralmente, a transparência dos filmes é um critério para avaliar a miscibilidade dos polímeros e demais componentes de um filme (LI et al., 2006).

As análises termogravimétricas são úteis no fornecimento de informações da estabilidade térmica de biofilmes (GONTARD; RING, 1996; CHERIAN et al., 1995; OGALE et al., 2000; SOBRAL, 2000). Ainda, as propriedades térmicas permitem determinar a mobilidade de um filme, a qual está relacionada com as características do material, como fragilidade e resistência do material, bem como a presença de possíveis interações entre polímeros (LUCAS et al., 2001).

A termogravimetria (TG) mede o ganho ou perda de massa que ocorre na amostra pela variação da temperatura (ou do tempo a temperatura constante) (LUCAS et al., 2001). A calorimetria exploratória diferencial (DSC) permite a determinação das temperaturas de transição de fase de um polímero, como a transição vítrea (T_g) e a temperatura de fusão (T_f) e temperatura de cristalização (T_c). Pode ser utilizada na caracterização de polímeros presentes em determinada amostra. A T_g se

manifesta com uma mudança descontínua na capacidade calorífica (transição de segunda ordem), que é representada por uma mudança endotérmica na curva de aquecimento do DSC. A temperatura de fusão cristalina (T_f) define o ponto onde o polímero sofre uma mudança de estado (sólido – líquido). Assim, um polímero rígido, ramificado, com muitas unidades cíclicas deve possuir uma T_g mais alta, enquanto que uma cadeia polimérica flexível deve possuir uma T_g mais baixa (WUNDERLICH, 1981). Uma característica de um material amorfo é sua temperatura de transição vítrea, T_g , a temperatura na qual suas propriedades mudam de um material elástico para um sólido. O comportamento da transição vítrea de muitos polímeros sintéticos é bem conhecido (WARD; HADLEY, 1993).

As soluções formadoras de filmes que contém QTS apresentam propriedades reológicas dependentes da concentração do polímero (HAWANG; SHIN, 2000), do grau de desacetilação (CHEN et al., 2003), da interação da QTS e outros polímeros (LEWANDOUSKA, 2009), bem como da temperatura e do tempo de armazenamento (EL-HEFIAN et al., 2010).

4 ANTOCIANINAS

Os pigmentos naturais de animais e plantas sempre constituíram uma parte normal da dieta humana e, por isso, têm sido consumidos com segurança por inúmeras gerações. Suas estruturas tendem a ser complexas, podendo ser usadas para fins de classificação. Os corantes naturais podem ser divididos convencionalmente em grupos: antocianinas, betalaínas, carotenóides, clorofilas entre outros como a cochonilha, curcumina e açafrão. Dentre estes, na Europa são permitidos, atualmente, 13 pigmentos oriundos de fontes naturais para adição em alimentos. Estes são a curcumina (curcuminóides), luteína (xantofila), β -caroteno, bixina, capsantina (carotenóides), betanina (betalaina), ácido carmínico e antraquinonas (carmim), clorofila cúprica e clorofilina (porfirinas), caramelo de açúcar, extrato de malte (melanoidinas) e antocianinas (flavonóides) (DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2010).

Representante da classe dos flavonóides, caracterizados por uma estrutura básica de 15 carbonos, as antocianinas (ANT) - do grego *anthos* (flor) e *kyanos* (azul) - são pigmentos naturais hidrossolúveis, de estrutura polifenólica, responsáveis pelas cores vermelho, azul e roxo de diversos

vegetais, como frutas, legumes, hortaliças e grãos, compondo assim, um grupo de pigmentos de maior distribuição no reino vegetal, depois da clorofila. É um corante orgânico natural, obtido a partir de vegetais, podendo ser usado sem limitações com relação a quantidade, portanto, são pigmentos não tóxicos e não mutagênicos (BROUILLARD, 1983; CAVALCANTI; SANTOS; MEIRELES, 2011; DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2010; HARBORNE; GRAYER, 1988; JANIK et al., 2007; DELGADO-VARGAS; JIMÉNEZ; PAREDES-LÓPEZ, 2000; MARTIN BUENO et al., 2012; MAZZA; MINATI, 1993; MORETTO; FETT, 1988; SANTOS; MEIRELES, 2009; WALTON et al., 2006; WROLSTAD, 2004). As antocianinas compreendem o maior grupo de pigmentos solúveis em água do reino vegetal e são especialmente característica das angiospermas ou plantas com flores, principal fonte de produção de alimentos, sendo, também, solúveis em etanol (BREIDLE; TIMBERLAKE, 1997; CURTRIGHT et al., 1996; PETERSON; DWYER, 2000).

As antocianinas apresentam muitas vantagens para a saúde humana, pois possuem atividade antioxidante relatada, tais como o efeito protetor cardiovascular, e a redução do risco de doenças cardíacas e coronárias (CAVALCANTI; SANTOS; MEIRELES, 2011), entre outras relacionadas à capacidade de inibição da peroxidação de lípidos e por reduzir os processos relacionados às espécies reativas de oxigênio (BRIDLE; TIMBERLAKE, 1997; COOK; SAMMAN, 1996; COLANTUONI et al., 1991; DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2010; HEIM et al., 2002; RENAUD; DE LORGERIL, 1992; KINSELLA et al., 1993; NODA et al., 2000; VINCIERI et al., 1992), além de ação anti-inflamatória (LEE; LEE; CHOUNG, 2011) e atividade antimicrobiana (MAZZA et al., 2002). Alguns estudos recentes creditam às antocianinas a redução de células cancerígenas em humanos (GIAMPIERI; ALVAREZ-SUAREZ; BATTINO, 2014; BAGCHI et al., 2004).

A ingestão média diária de antocianinas presentes em alimentos consumidos nos EUA durante o ano de 1971, foi de 180 a 215 mg ao dia, durante as estações de inverno e verão, respectivamente (KUHNAU, 1976). Em um estudo mais recente com 529 italianos, o consumo de antocianinas variou de 25-215 mg/ (pessoa*dia), sendo que a maior fonte de antocianinas foi o vinho tinto (ALBERT-IFIDANZA et al., 1996). Estes dados são um indicativo das quantidades de antocianinas consumidas, porém, vale ressaltar que podem ocorrer variações em

decorrência de hábitos alimentares e preferências pessoais, como o consumo de vinho tinto em alguns países, e a disponibilidade abundante de frutas que fazem parte da dieta no caso de países subdesenvolvidos. Porém, alguns estudos indicam a dependência de alimentos processados na dieta como um fator limitante do consumo de antocianinas. A adição de extratos naturais de antocianinas, com o objetivo de estabelecer cor aos alimentos processados, pode ser considerada importante para a manutenção dos níveis de consumo ideais, levando em consideração os efeitos benéficos ofertados pela ingestão de compostos antioxidantes. Além de estabelecer cor aos alimentos processados, as antocianinas são descritas por possuir potente atividade antioxidante, comparado com antioxidantes de uso clássico na indústria de alimentos, como o butilato hidroxilanisol (BHA), butilato hidroxiltolueno (BHT) e α -tocoferol (vitamina E) (MEYERS et al., 2003; NARAYAN et al., 1999; SUN et al., 2002). Essa atividade se deve a sua estrutura química formada por três anéis, que possuem ligações duplas conjugadas e também hidroxilas distribuídas ao longo da estrutura que possibilitam o sequestro de radicais livres (KONG et al., 2003; SILVA et al., 2007).

Em tecidos vegetais, as antocianinas desempenham funções variadas: ação antioxidante, proteção à ação da luz, mecanismo de defesa e função biológica. Além de que as cores vivas e intensas que produzem têm importante papel em vários mecanismos reprodutores das plantas, tais como a polinização e a dispersão de sementes (DELGADO-VARGAS; JIMÉNEZ; PAREDES-LÓPEZ, 2000). Assim, as antocianinas encontram-se difundidas em 27 famílias, 73 gêneros e numa grande variedade de espécies de plantas utilizadas para alimentação (BRIDLE; TIMBERLAKE, 1997).

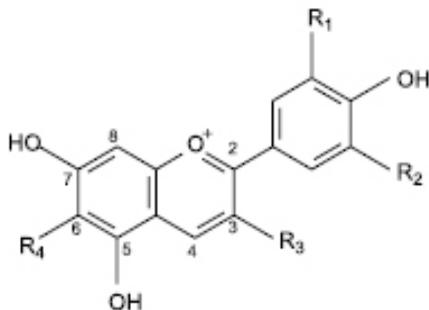
O teor de antocianinas em frutos pode variar com o tipo de cultivo e com a maturidade, além da possibilidade da existência de misturas de antocianinas. Em geral, o conteúdo total de antocianinas varia entre 20 mg a 2 g por cada 100 g de frutos (DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2010).

Na natureza, as antocianinas são encontradas na forma de ligação com açúcares (DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2010), sendo, então, compostas de três partes: a estrutura básica, aglicona, que é esterificada com um ou mais açúcares e estes, por sua vez, podem ser acilados com uma ou mais moléculas de ácidos orgânicos que promovem maior estabilidade e solubilidade ao pigmento, através de interações intramoleculares (MORETTO; FETT, 1988). Quando o grupamento

açúcar da antocianina é hidrolisado, a aglicona (produto da hidrólise sem o açúcar) é chamado de antocianidina. Existem 19 antocianidinas de ocorrência natural, mas apenas seis costumam ocorrer nos alimentos, sendo a malvidina, cianidina, peonidina, delphinidina, pelargonidina e petunidina, que se quanto as substituições nos radicais R_1 e R_2 (Figura 7) (PASSAMONTI et al., 2003; DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2010; WULF; NAGEL, 1978). Derivadas das antocianidinas e com estruturas moleculares mais complexas, atualmente, são conhecidas mais de 600 antocianinas diferentes (ANDERSEN, 2002; MORETTO; FETT, 1988).

A estrutura básica das antocianinas (aglicona) é o 2-fenilbenzopirona ou cátion *flavylium* (Figura 6) a partir do qual as estruturas secundárias são derivadas (BROUILLARD; DANGLES, 1994; JACKMAN; SMITH, 1992). Ocorrem como glicosídeos de poli-hidroxi ou polimetoxi derivados do sal e diferem no número de grupos hidroxila (OH) ou nos grupos metoxi presentes (OCH₃). Ainda, as antocianinas diferenciam-se entre si estruturalmente quanto aos sítios de ligação dos açúcares, bem como quanto ao tipo e número de ácidos alifáticos ou aromáticos ligados aos açúcares da molécula. Os açúcares mais comuns são a glicose, ramnose, galactose, arabinose, xilose, di e trissacarídeos (homogêneos ou heterogêneos) formados como glicosídeos desses açúcares. Os ácidos mais envolvidos na acilação dos açúcares são os ácidos aromáticos, como o p -cumárico, caféico, ferúlico, sináptico, gálico ou p -hidroxibenzóico ou os alifáticos, como o ácido malônico, acético, málico, succínico ou oxálico (DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2010; SHI; LIN; FRANCIS, 1992; TERAHARA et al., 1996).

Figura 6 - Estruturas básica do cátion *flavylium*



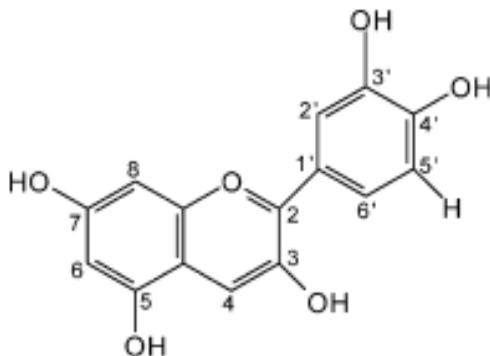
Onde: R₁ e R₂ = -H, -OH ou -OCH₃, R₃ = -glicosil, R₄ = -H ou -glicosil.

Fonte: Damodaran, Parkin, Fennema (2010).

As cascas de uvas são consideradas a maior fonte comercial para a produção de antocianinas (enocianina) para fins alimentícios (BOBBIO; BOBBIO, 2001; MORETTO; FETT, 1988). Em uvas (*V. vinifera*), as principais antocianinas encontradas são a malvidina e seus derivados (PASSAMONTI et al., 2003; WULF; NAGEL, 1978).

Além das uvas, o repolho roxo (*Brassica oleracea* L.) também é uma importante fonte de pigmentos antociânicos na forma concentrada. Em geral, são encontradas nos extratos de repolho roxo as antocianidinas cianidina (Figura 7) (CURTRIGHT et al., 1996), podendo apresentar algumas de suas formas aciladas. Por ser um pigmento de fonte natural é amplamente utilizado como corante alimentar (DYRBY et al, 2001; JACKMAN; SMITH, 1992; HRAZDINA et al., 1977). Aplicações comerciais de antocianinas incluem: doces, produtos de confeitaria, refrigerantes, refrescos, pós para refrescos, coberturas de bolos, gelatinas e geleias (MORETTO; FETT, 1988), devido a estabilidade sob temperaturas de refrigeração (MARKAKIS, 1982). Entretanto, sua utilização ainda é restrita pela baixa estabilidade em meios aquosos e pH acima de 2, condições bastante comuns durante o processamento e estocagem dos alimentos (FALCÃO et al., 2003).

Figura 7 - Estrutura molecular da cianidina, principal aglicona encontrada nos extratos de repolho roxo



Fonte: Curtright et al., 1996.

Nos extratos antociânicos de repolho roxo, tem sido relatada a estabilidade do pigmento durante a extração a partir de processos naturais (MAZZA, 1990; BAUBLIS et al., 1994; MALIEN-AUBERT et al., 2001). Apresenta-se, comercialmente, sob a forma de pó vermelho-púrpura em tom escuro, com um odor característico fraco e é hidrossolúvel (SAPERS et al., 1981).

O corante obtido a partir de repolho roxo está sendo usado em bebidas, doces, goma de mascar, uma variedade de molhos, e iogurte (Product Information Bulletin, 2000). Além disso, os extratos contendo pigmentos têm demonstrada aplicação como indicadores naturais de pH em diversas aplicações, inclusive farmacêuticas (CHIGURUPATI et al., 2002). Assim, em baixos valores de pH (meio ácido) apresenta coloração vermelha e em pH básico apresenta coloração azul escura. Esta mudança de coloração se demonstrou reversível ao pH e temperatura (DYRBY et al., 2001; CARLSEN; STAPELFELDT, 1997).

4.1 Propriedades de cor

A abundante presença de duplas ligações, que são facilmente excitadas, e expressam as cores características das antocianinas como resultado da excitação de uma molécula pela luz visível (DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2010). Em soluções ácidas, as antocianinas apresentam coloração vermelha, com o aumento do pH a intensidade da

cor diminui. Em solução alcalina, a cor azul é obtida, porém é instável (MAZZA; BROUILLARD, 1987).

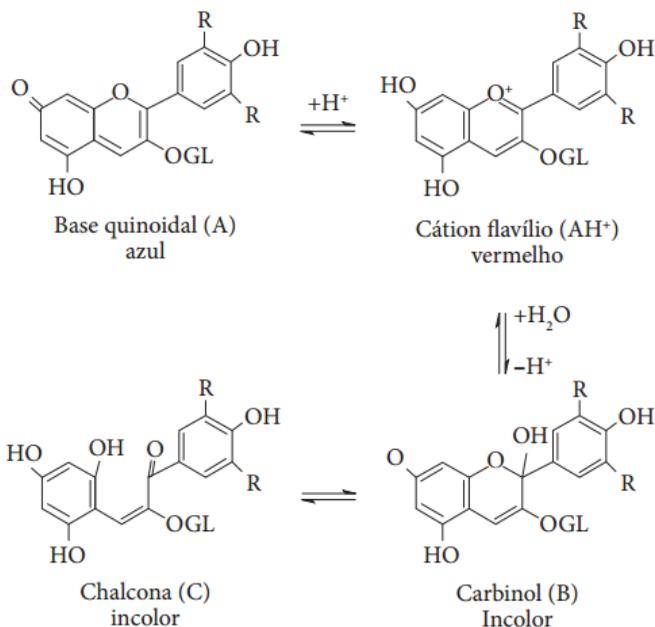
Quanto maior o número de substituições na porção aglicona da molécula, maior a tonalidade expressa pela cor. Assim, o aumento da tonalidade é o resultado de uma mudança batocrômica (maior comprimento de onda), o que significa que a banda de absorção da luz na faixa de espectro visível muda de um comprimento de onda pequeno para um grande, com alteração consequente da cor, como nos tons de roxo-azul para laranja-vermelho. A mudança oposta é chamada de mudança hipsocrômica. O que explica as diversas colorações representadas pelas antocianinas. Em geral, os efeitos batocrômicos são causados por grupos auxocromos, doadores de elétrons que, no caso das antocianidinas, são os grupos metoxi e hidroxila. Os grupos metoxi, devido a sua grande capacidade de doar elétrons, causam mais mudanças batocrômicas que os grupos hidroxilas (DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2010). O tipo e o número da substituição de açúcares e da acilação também desempenham um papel importante sobre as características da cor, assim como diversos outros fatores, formação de complexos metálicos e copigmentação também o fazem (DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2010; LOPES et al., 2007; MAZZA; BROUILLARD, 1987).

Por isso, as antocianinas possuem a capacidade de atuar como indicador de pH natural. Quando em solução ácida, ocorre a estabilização dos íons oxônio (H_3O^+) através das duplas ligações conjugadas dos três anéis presentes na molécula da antocianidina, o que favorece a absorção de fótons no espectro visível. No momento em que ocorre a adição de uma base, a conjugação das ligações duplas entre os segundo e terceiro anéis é interrompida, o que resulta na absorção de fótons no intervalo de luz UV, em vez do visível. O efeito da variação de pH no aumento do número de ligações duplas conjugadas na molécula reduz o nível de energia da transição eletrônica entre o estado fundamental e os estados excitados, e por sua vez resulta na absorção de fótons em maior comprimento de onda (SAPERS et al., 1981).

Como mencionado anteriormente, a coloração das antocianinas varia de acordo com o pH do meio onde estão presentes e, por isso, podem se apresentar em 4 formas estruturais diferentes em equilíbrio químico, dependendo do pH em meio aquoso (Figura 9): base quinonoidal azul (A); cátion *flavylium* (vermelho) (AH^+); pseudobase carbinol (incolor) (B); e chalcona (incolor – pouco amarela) (C) (DAMODARAN; PARKIN;

FENNEMA, 2010; HEREDIA et al., 1998; IACOBUCCI; SWEENEY, 1983; MORETTO; FETT, 1988).

Figura 8 - Transformações estruturais de antocianinas em relação ao pH do meio



Fonte: Levi et al., 2004.

Além do pH, a cor da antocianina será expressa dependendo de fatores como a co-existência de compostos incolores (co-pigmentos, tipicamente flavonas e flavonóides), da temperatura de armazenamento, da estrutura química, da concentração de oxigênio, da presença de luz, solventes, enzimas, proteínas e íons metálicos (CASTAÑEDA-OVANDO et al., 2009; TANAKA; SASAKI; OHMIYA, 2008). Ainda, a fonte da qual é extraída, confere a cada tipo de antocianina uma propriedade de matiz e estabilidade. Naturalmente a coloração das antocianinas é diretamente influenciada pela substituição dos grupos hidroxila e metoxila na molécula. Incrementos no número de grupos hidroxila tendem a tornar a coloração azulada. Na direção contrária,

incrementos no número de grupos metoxila aumentam a intensidade do vermelho (DELGADO-VARGAS; JIMÉNEZ; PAREDES-LÓPEZ, 2000). Por exemplo, na uva, onde encontramos grupos metoxilas, a molécula exibe uma tonalidade violeta e tem baixa reatividade, já o cassis, que tem presença de 1 ou 2 grupos hidroxilas, exibe uma tonalidade vermelha intensa e possui uma estrutura altamente reativa. Uma das antocianinas mais alaranjadas é encontrada no morango, devido à pelargonidina. Além disso, quando os ácidos fenólicos se ligam ao açúcar (acilação) temos a presença de antocianinas aciladas. Este fato é de crucial importância na indústria alimentícia, pois garante a estabilidade das antocianinas. Ainda, quanto maior o número de acilação, mais azul será a antocianina, para uma mesma estrutura principal (BROUILLARD, 1982).

Vários compostos atuam como copigmento de antocianinas, tais como os aminoácidos, ácidos orgânicos, flavonóides, alcalóides (MAZZA; BROUILLARD, 1987). A presença de flavonóides não antocianínicos pode proteger as antocianinas contra a degradação (LOPES et al., 2007). Embora esses compostos, muitas vezes, não apresentem cor, eles aumentam a cor das antocianinas, causando um efeito batocrômico e proporcionando o aumento da absorção da luz para um comprimento de onda máximo (DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2010).

As taxas de degradação variam muito entre as antocianinas, o que se deve à diversidade de suas estruturas, e podem ocorrer por vários mecanismos, iniciando com a perda da cor, seguida do surgimento de coloração amarelada e formação de produtos insolúveis (LOPES et al., 2007). A degradação de antocianinas envolve a hidrólise da ligação dupla do anel do cátion *flavylium* pela transferência de carga intramolecular, que é mais significativa acima de pH 4,5 (BROUILLARD; DELAPORTE, 1977).

Em geral, o aumento da hidroxilação diminui a estabilidade, enquanto o aumento da metilação aumenta a estabilidade. A cor dos alimentos que contêm antocianinas ricas em pelargonidina, cianidina ou delfinidina agliconas é menos estável que a de malvidina. O aumento da estabilidade do último grupo ocorre porque os grupos hidroxilas estão bloqueados. Decorre disso o aumento da glicosilação, como no caso dos monoglicosídeos e dos diglicosídeos, aumenta a estabilidade (DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2010). Os pigmentos acilados são mais estáveis do que seus análogos não acilados, sobretudo quando submetidos à temperatura (LÓPEZ et al., 2000; SAPERS et al., 1981). A presença de um ou mais grupos acila na molécula de antocianina inibe a

hidrólise do cátion *flavylium* (vermelho) para formar a base carbinol (incolor), permitindo a formação preferencial da base quinoidal (azul), resultando em pigmentos menos sensíveis às mudanças de pH (ou seja, eles mantêm a coloração em meio levemente ácido a neutro) (BRIDLE; TIMBERLAKE, 1997).

As antocianinas são pigmentos relativamente instáveis. Como mencionado, tanto as características de cor (tonalidade e saturação) dos pigmentos como sua estabilidade são muito influenciadas pelos substituintes na aglicona. A degradação das antocianinas ocorre não apenas durante a extração a partir de tecidos vegetais, mas também durante o processamento e o armazenamento dos alimentos. O conhecimento da química das antocianinas pode ser usado para que se minimize a degradação por meio da seleção adequada de processos e pigmentos antociânicos específicos para as aplicações pretendidas. Portanto, é primordial definir as condições de obtenção do pigmento, de forma que o mesmo apresente o mínimo de alterações em suas características (DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2010; LOPES et al., 2007).

A estabilidade da cor de antocianinas é afetada por fatores como a presença ou ausência de luz, oxigênio, solventes, metais e agentes redutores e oxidantes, presença de enzimas e proteínas, temperatura, atividade de água e pH. Assim, é comum a adição de corantes naturais em alimentos processados, devido à instabilidade dos pigmentos aos tratamentos utilizados (CABRITA; FOSSEN; ANDERSEN, 2000; CASTAÑEDA-OVANDO et al., 2009; DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2010; DOWNHAN; COLLINS, 2000; FRANCIS, 1989; KEARSLEY; RODRIGUEZ, 1981; TANAKA; SASAKI; OHMIYA, 2008). Em geral, as características estruturais que conduzem ao aumento de estabilidade do pH também levam ao aumento da estabilidade térmica. Assim, as antocianidinas altamente hidroxiladas são menos estáveis térmicamente do que as antocianidinas metiladas, glicosiladas ou aciladas (DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2010). Sabe-se que a natureza insaturada das antocianinas a faz mais suscetível ao oxigênio molecular. E que a estabilidade desta é favorecida em valores de atividade de água na ordem de 0,63-0,79, e da mesma forma, a diminuição da atividade de água e concentrações elevadas de açúcares (DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2010). Além de que, o ácido ascórbico e as antocianinas desaparecem ao mesmo tempo nos sucos de frutas, o que indica a exigência de interação direta entre as duas moléculas, pois as reações que

não favorecem a formação de H_2O_2 durante a oxidação do ácido ascórbico, são consideradas responsáveis pela estabilidade da antocianina em alguns sucos de frutas (DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2010; JACKMAN; SMITH, 1996; SHRIKHANDE; FRACIS, 1974).

A maior estabilidade da cor das antocianinas ocorre sob condições ácidas devido à presença de glicosídeos em sua estrutura, o que não ocorre com as antocianidinas que, também, são menos hidrossolúveis (LOPES et al, 2007; BROUILLARD, 1982). As antocianinas são moléculas polares, em função dos grupos substituintes polares (hidroxilas, carboxilas e metoxilas) e glicosilas residuais ligados aos seus anéis aromáticos. Consequentemente, elas são mais solúveis em água do que em solventes não-polares (HARBORNE, 1988).

Portanto, as antocianinas possuem maior força corante, em pH igual a 1,0, principalmente quando as moléculas dos pigmentos estão na forma ionizada. Em pH 4,5, as antocianinas de extratos de frutas são praticamente incolores, pouco azuladas, e quando em presença de pigmentos amarelos (flavonóides), o extrato apresenta coloração verde (DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2010). As soluções com pH acima de 7,0 contendo pigmentos de antocianinas, gradualmente mudam a coloração de tonalidade azul para amarela, como um resultado indireto da formação de chalcona, via fissão do anel da anidrobases (HRAZDINA, 1977).

Devido sua maior estabilidade, as antocianinas são comumente usadas em soluções ácidas, tais como, refrigerantes (pH entre 2,5 e 3,8), onde, geralmente, se apresentam na cor vermelha. Em pH acima de 6,0 são azuis (base quinoidal) (DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2010; MORETTO; FETT, 1988).

A necessidade de conservação dos pigmentos tem incentivado o desenvolvimento de novas pesquisas neste setor, sendo que as formas mais importantes de conservação do pigmento são o encapsulamento e adição de antioxidantes. Entre os diferentes métodos, a secagem por atomização (*Spray drying*), é o método de secagem mais comum usado na indústria alimentícia por ser econômico, flexível e contínuo (DEL-VALLE, 2004).

Com relação à encapsulação de corantes antocianinos, alguns estudos referem-se à concentração e melhora da estabilidade deste pigmento (COUTINO, 2002; HUMEAUT et al., 2000; MALACRIDA; MOTTA, 2006; WAGNER; WARTHESEN, 1995). Por exemplo, Valguga et al., (2008), encapsularam o extrato de uvas (*Vitis labrusca*) e

o processo resultou na concentração do tor antociânico em 160 mg.100 g⁻¹, em presença de maltodextrina.

5 DETERIORAÇÃO DE ALIMENTOS

As carnes e seus derivados são considerados produtos altamente perecíveis. Embora, os tecidos animais sejam livres de micro-organismos, as superfícies externas (peles e tegumentos) e trato digestivo podem ser importante fonte de contaminação. A contaminação externa pode estar presente desde o abate (contaminação presente no ar, água, couro, conteúdo gastrointestinal do animal, instrumentos utilizados na evisceração, entre outros) e segue nas etapas que envolvem a manipulação do alimento (superfícies não-higienizadas, manipuladores). Assim, um alimento contaminado nestas etapas, irá permanecer colonizado nas etapas seguintes do processamento, que envolve o resfriamento, congelamento, embalagem, transporte, entre outras (LAWRIE, 2005).

A carne bovina é uma excelente fonte de nutrientes. É rica em proteínas, o que favorece o crescimento de micro-organismos proteolíticos como as leveduras. Tem pouca presença de carboidratos e apresenta em sua composição diversas vitaminas, dentre elas a tiamina, riboflavina e biotina. A carne tem atividade de água próximo a 0,99, fator que favorece o crescimento de micro-organismos. Após transformação do músculo em carne, o pH encontrado é em torno de 5,5, favorecendo o crescimento dos fungos, leveduras e das bactérias lácticas. Assim, muitos micro-organismos poderiam ser encontrados na carne, porém poucos encontram condições ideais para multiplicação e promoção de danos ao produto (FRANCO et al., 2015; LAWRIE, 2005).

A deterioração é estabelecida como o ponto em que a carne torna-se imprópria para o consumo humano. Ocasiona alterações químicas e físicas irreversíveis, provocando alteração de sabor, odor e aparência nos produtos cárneos. Pode ser causada pelo crescimento microbiano, pela presença de insetos, reações enzimáticas e oxidativas oriundas da carne. Sendo que, um alimento cárneo deteriorado não necessariamente é um alimento em decomposição ou putrefação (FRANCO et al., 2015).

A temperatura desenvolve papel importante na deterioração da carne. De modo geral, quanto maior a temperatura, maior é a velocidade de crescimento microbiano. Embora não seja absoluta, há uma classificação referente aos micro-organismos deteriorantes da carne. Os micro-organismos psicrotróficos são aqueles que possuem temperatura

ótima de crescimento entre -2 e 7 °C; os mesófilos crescem entre 10 e 40 °C; e os termófilos de 43 a 66 °C (FRANCO; LANDGRAF, 2008). Sob temperaturas de resfriamento, em condições aeróbias, a microbiota deteriorante da carne é dominada pelas pseudomonas e, sob condições anaeróbicas, pelos lactobacilos. Em ambos os casos, os micro-organismos atacam inicialmente a glicose e, subseqüentemente, os aminoácidos (LAWRIE, 2005).

Tendo em vista esses fatores, para a comercialização da carne fresca se faz necessário o emprego de alguma tecnologia de preservação para controle da microbiota deteriorante. Os meios utilizados para preservação são refrigeração ou congelamento, cozimento, cura, secagem e embalagem. Sendo que algumas delas são geralmente utilizadas em conjunto, como por exemplo, o sistema embalagem-armazenamento, que em temperaturas de refrigeração proporcionam a extensão da vida de prateleira e permitem a comercialização da carne fresca (FRANCO et al., 2015).

Juntamente com as carnes, os pescados frescos compõem as principais fontes de proteínas consumidas no mundo, e são considerados alimentos altamente perecíveis (FRANCO et al., 2015). A carne do pescado é constituída basicamente de proteínas e gorduras, e em menor proporção, carboidratos, aminoácidos vitaminas e minerais. Em decorrência do seu metabolismo, os peixes não acumulam glicogênio, portanto o pH não diminui durante o *post mortem*, fazendo com que o pH seja mantido próximo a neutralidade (entre 6,0 e 6,8). Ainda, o pescado tem como característica a elevada atividade de água ($A_w = 0,99$) em decorrência da presença de água no músculo. Quando comercializado sob a forma in natura ou congelado, o pescado enfrenta dificuldades quanto a deterioração (GONÇALVES, 2011).

A deterioração é comum no pescado em decorrência da sua composição química favorável. Por meio da ação dos micro-organismos há o surgimento de substâncias nitrogenadas voláteis (BVT), particularmente, trimetilamina (TMA) e amônia (NH_3), a partir da decomposição de aminoácidos e degradação anaeróbica, seguido da ação enzimática que leva ao aparecimento dos peróxidos, do ranço, característicos do processo de deterioração (FRANCO et al., 2015; GONÇALVES, 2011). Em condições ambientais de temperatura, o pescado sofre deterioração pelo crescimento de bactérias Gram-negativas mesófilas, que tornam o alimento não apto para o consumo humano em até dois dias. Já em temperaturas de refrigeração, a deterioração é causada

principalmente por bactérias Gram-negativas psicrotróficas (GONÇALVES, 2011).

A contaminação do pescado se dá através das superfícies em contato com a água e meios passíveis de contaminação natural. Inicialmente, o pescado sofre contaminação pela microbiota presente em seu habitat natural e, após a captura, pela biota presente na embarcação. Por ser um animal de sangue frio, a microbiota natural é adaptada a temperaturas baixas. Algumas etapas de manuseio e refrigeração incluem possíveis fontes de contaminação, por exemplo, o gelo utilizado na conservação, bem como os equipamentos, utensílios e superfícies sem adequada assepsia, além do manipulador (GONÇALVES, 2011).

Um dos parâmetros para controle da deterioração no pescado é a temperatura. O pescado fresco deve, preferencialmente, ser armazenado em gelo (0 a 2 °C) com o intuito de retardar a deterioração. Processos como a embalagem, salga e acidificação ou tratamento térmico são comuns para aumentar a vida de prateleira do pescado (FRANCO et al., 2015), bem como a aplicação de atmosfera modificada, apesar de esta se mostrar mais eficiente na carne do que no pescado (GONÇALVES, 2011). Cabe ressaltar que, o congelamento de pescado fresco não muda o perfil de risco, somente elimina os parasitas que apresentam risco em produtos crus minimamente tratados. Sendo assim, mesmo o pescado congelado quando submetido a temperatura elevada ou flutuantes por período prolongado pode iniciar, ou reativar, processo de deterioração (FRANCO et al., 2015).

Assim, um controle de temperatura durante as etapas que compreendem o armazenamento e comercialização de alimentos perecíveis, se faz necessário para impedir que alterações indesejáveis possam acarretar na deterioração dos alimentos.

Como forma de garantir as condições ideais para armazenamento desses alimentos, as embalagens ativas podem atuar como indicadores de exposição à temperatura inadequada. Esta, por sua vez gera uma proliferação de micro-organismos intrínsecos à matriz alimentar que pode ser detectada pela alteração das características organolépticas do alimento, como o pH, medida, indiretamente, por uma mudança visual na cor da embalagem.

REFERÊNCIAS

ABDELAAL, M.Y.; ABDEL-RAZIK, E.A.; ABDEL-BARY, E.M.; EL-SHERBINY, F.I.M. Chitosan-based interpolymeric pH-responsive hydrogels for in vitro drug release. **Journal of applied polymer science**, v. 103, n. 5, p. 2864-2874, 2007.

ABUGOCH, L. E.; TAPIA, C.; VILLAMÁN, M. C.; YAZDANI-PEDRAM, M.; DÍAZ-DOSQUE, M. Characterization of quinoa protein–chitosan blend edible films. **Food Hydrocolloids**, v. 25, n. 5, p. 879-886, 2011.

AGNIHOTRI, S. A.; MALLIKARJUNA, N. N.; AMINABHAVI, T. M. Recent advances on chitosan-based micro-and nanoparticles in drug delivery. **Journal of controlled release**, v. 100, n. 1, p. 5-28, 2004.

AHVENAINEN, R. Active and intelligent packaging: an introduction. In R. Ahvenainen (Ed.), **Novel food packaging techniques**. Cambridge: Woodhead Publishing Ltd., 2003.

ALAMPRESE, C.; CASIRAGHI, E.; PAGANI, M. Ambrogina. Development of gluten-free fresh egg pasta analogues containing buckwheat. **European Food Research and Technology**, v. 225, n. 2, p. 205-213, 2007.

ALBERT, S.; MITTAL, G.S. Comparative evaluation of edible coatings to reduce fat uptake in a deep-fried cereal product. **Food Research International**, v. 35, n. 5, p. 445-458, 2002.

ALBERTI-FIDANZA, A.; COLI, R.; FRUTTINI, D.; MINIATI, E.; FIDANZA, F., Intake of different phenolic compounds by groups of subjects living in Perugia area (Italy), **Journal Total Environment**, v.8, n.2, p.225-251, 1996.

ALLAN, C.R.; HADWIGER, L.A. The fungicidal effect of chitosan on fungi of varying cell wall composition. **Experimental mycology**, v. 3, n. 3, p. 285-287, 1979.

DE ALMEIDA, É. V. R. Valorização da celulose de sisal: uso na preparação de acetatos e de filmes de acetatos de celulose/celulose e quitosana/celulose. 2009. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

ALVES, V.D.; COSTA, N.; COELHO, I.M. Barrier properties of biodegradable composite films based on kappa-carrageenan/pectin blends and mica flakes. **Carbohydrate Polymers**, v. 79, n. 2, p. 269-276, 2010.

ANDERSEN, O. M. Anthocyanin occurrences and analyses. In: Oral presentation at **International Workshop on Anthocyanins**; Adelaide, Australia. 2002.

ANKER, M.; BERNTSEN, J.; HERMANSSON, A. M.; STADING, M. Improved water vapor barrier of whey protein films by addition of an acetylated monoglyceride. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 3, n. 1, p. 81-92, 2002.

ANTONINO, N. A. Otimização do processo de obtenção de quitina e quitosana de exoesqueletos de camarões oriundos da indústria pesqueira paraibana. João Pessoa, Programa de Pós-graduação em Química, UFPB, 2007. Mestrado (Dissertação), Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa-PB, 2007.

ANTONOV, S. F.; KRYZHANOVSKAYA, E.V.; FILIPPOV, Y. I.; SHINKAREV, S. M.; FROLOVA, M. A. Study of wound-healing properties of chitosan. **Russian Agricultural Sciences**, v. 34, n. 6, p. 426-427, 2008.

ARRUDA, E. J.; SANTANA, C. C. Concentração e purificação de b-amilase de extrato de soja por adsorção em gel de afinidade quitosana-fenilboronato. 1999. Tese de Doutorado. Tese de Doutorado, FEQ-Unicamp, Brasil.

ARVANITOYANNIS, I.; PSOMIADOU, E.; NAKAYAMA, A.; AIBA, S.; YAMAMOTO, N. Edible films made from gelatin, soluble starch and polyols, Part 3. **Food Chemistry**, v. 60, n. 4, p. 593-604, 1997.

ARVANITOYANNIS, I.; BILIADERIS, C.G.; OGAWA, H.; KAWASAKI, N. Biodegradable films made from low-density

polyethylene (LDPE), rice starch and potato starch for food packaging applications: Part 1. **Carbohydrate Polymers**, v. 36, n. 2, p. 89-104, 1998.

LOTT, J. R.; MCALLISTER, J. W.; ARVIDSON, S. A.; BATES, F. S.; LODGE, T. P. Fibrillar structure of methylcellulose hydrogels. **Biomacromolecules**, v. 14, n. 8, p. 2484-2488, 2013.

ASTM D882-95a, 1995. Standard test method for tensile properties of thin plastic sheeting. Philadelphia, United States: ASTM International.

AVADI, M. R.; SADEGHI, A. M. M.; TAHZIBI, A.; BAYATI, K. H.; POULADZADEH, M.; ZOHURIAAN-MEHR, M. J.; RAFIEE-TEHRANI, M. Diethylmethyl chitosan as an antimicrobial agent: Synthesis, characterization and antibacterial effects. **European Polymer Journal**, v. 40, n. 7, p. 1355-1361, 2004.

AZEVEDO, V. V. C.; CHAVES, S. A.; BEZERRA, D. C.; LIA FOOK, M. V.; COSTA, A. C. F. M. Quitina e quitosana: aplicações como biomateriais. **Revista eletrônica de Materiais e processos**, v. 2, n. 3, p. 27-34, 2007.

BACCAN, N.; ANDRADE, J. C.; GODINHO, O. E. S.; BARONE, J. S. Química Analítica Quantitativa Elementar, 2a ed., Ed. Unicamp: Campinas, 1979, p. 46.

BAGCHI, D.; SEN, C. K.; BAGCHI, M.; ATALAY, M. Anti-angiogenic, antioxidant, and anti-carcinogenic properties of a novel anthocyanin-rich berry extract formula. **Biochemistry**, v. 69, n. 1, p. 75-80, 2004.

BALASUBRAMANIAM, V. M.; CHINNAN, M. S.; MALLIKARJUNAN, P.; PHILLIPS, R. D. The effect of edible film on oil uptake and moisture retention of a deep-fat fried poultry product. **Journal of Food Process Engineering**, v. 20, n. 1, p. 17-29, 1997.

BANKER, GILBERT S.; GORE, ASHOK Y.; SWARBRICK, JAMES. Water vapour transmission properties of free polymer films. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 18, n. 7, p. 457-466, 1966.

BÁNYAI, E. Em. Indicators; Bishop, E., ed. 1972.

BARRETO, M. D. C. S.; FIGUEIREDO, M. D. V. B.; BURTY, H. A.; DA SILVA, M. L. R. B.; DE LIMA-FILHO, J. L. Produção e Comportamento Reológico de Biopolímeros produzidos por rizóbios e caracterização genética. **Current Agricultural Science and Technology**, v. 17, n. 2, 2011.

BAUBLIS, A.; SPOMER, A.; BERBER-JIMENEZ, M.D. Anthocyanin pigments: comparison of extract stability. **Journal of Food Science**. 59, 1219–1221, 1994.

BAUTISTA-BAÑOS, S.; HERNÁNDEZ-LÓPEZ, M.; BOSQUEZ-MOLINA, E. Growth inhibition of selected fungi by chitosan and plant extracts. **Mexican Journal of Phytopathology**, v. 22, p. 178-186, 2004.

BAUTISTA-BAÑOS, S.; HERNÁNDEZ-LAUZARDO, A.N.; VELÁZQUEZDELVALLE, M.G.; HERNÁNDEZ-LÓPEZ, M.; BARKA, E.A.; BOSQUEZ-MOLINA, E.; WILSON, C.L. Chitosan as a potencial natural compound to control pre and postharvest diseases of horticultural commodities. **Crop Protection**, v. 25, p. 108- 118, 2006.

BERCEA, M.; BIBIRE, E. L.; MORARIU, S.; TEODORESCU, M.; CARJA, G. pH influence on rheological and structural properties of chitosan/poly (vinyl alcohol)/layered double hydroxide composites. **European Polymer Journal**, v. 70, p. 147-156, 2015.

BERCEA, M.; MORARIU, S.; RUSU, D. In situ gelation of aqueous solutions of entangled poly (vinyl alcohol). **Soft Matter**, v. 9, n. 4, p. 1244-1253, 2013.

BERGER, J.; REIST, M.; MAYER, J. M.; FELT, O.; PEPPAS, N. A.; GURNY, R. Structure and interactions in covalently and ionically crosslinked chitosan hydrogels for biomedical applications. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 57, n. 1, p. 19-34, 2004.

BERTUZZI, M. A.; VIDAURRE; GOTTIFREDI. Water vapor permeability of edible starch based films. **Journal of Food Engineering**, v. 80, p. 972-978, 2007.

BHATTACHARYA, M. Stress relaxation of starch/synthetic polymer blends. **Journal of materials science**, v. 33, n. 16, p. 4131-4139, 1998.

BIAŁOPIOTROWICZ, TOMASZ. Wettability of starch gel films. **Food Hydrocolloids**, v. 17, n. 2, p. 141-147, 2003.

BIGI, A.; COJAZZI, G.; PANZAVOLTA, S.; ROVERI, N.; RUBINI, K. . Stabilization of gelatin films by crosslinking with genipin. **Biomaterials**, v. 23, n. 24, p. 4827-4832, 2002.

BOBBIO, F. O.; BOBBIO, P. A. Química do processamento de alimentos: pigmentos. São Paulo: Varela, 2001.

BORIWANWATTANARAK, P.; INGKANINAN, K.; KHORANA, N.; VIYOCH, J. Development of curcuminoids hydrogel patch using chitosan from various sources as controlled-release matrix. **International journal of cosmetic science**, v. 30, n. 3, p. 205-218, 2008.

BOTREL, D. A.; SOARES, N. D. F. F.; GERALDINE, R. M.; PEREIRA, R. M.; FONTES, E. A. F. Qualidade de alho (*Allium sativum*) minimamente processado envolvido com revestimento comestível antimicrobiano. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 27, n. 1, p. 32-38, 2007.

BRIDLE, P.H; TIMBERLAKE, C. F. Anthocyanins as natural food colours—selected aspects. **Food Chemistry**, v. 58, n. 1, p. 103-109, 1997.

BRINE, Charles J. et al. Advances in chitin and chitosan. **Elsevier Applied Science**, 1992.

BROUILLARD, R. Chemical structure of anthocyanins. **Academic Press: New York**, 1982.

BROUILLARD, R. The in vivo expression of anthocyanin colour in plants. **Phytochemistry**, v. 22, n. 6, p. 311-23, 1983.

BROUILLARD, R.; DANGLES, O. Anthocyanin molecular interactions: the first step in the formation of new pigments during wine aging. **Food Chemistry**, v. 51, n. 4, p. 365-371, 1994.

BROUILLARD, R.; DELAPORTE, B. Chemistry of anthocyanin pigments. 2. Kinetic and thermodynamic study of proton transfer, hydration, and tautomeric reactions of malvidin 3-glucoside. **Journal of the American Chemical Society**, v. 99, n. 26, p. 8461-8468, 1977.

CABRITA, L.; FOSSEN, T.; ANDERSEN, O. M. Color and stability of the six common anthocyanins 3-glucosides in aqueous solutions. **Food Chemistry**, v. 68, p. 101-107, 2000.

CAMILLI, E. C.; BENATO, E. A.; PASCHOLATI, S. F.; CIA, P. Avaliação de quitosana, aplicada em pós-colheita, na proteção de uva 'Itália' contra Botrytis cinerea. **Summa Phytopathologica**, v.33, p.3, p.215-221, 2007.

CAMPANA, S. P.; SIGNINI, R. Efeito de Aditivos na Desacetilação de Quitina, **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 11, nº 4, p. 169-173, 2001.

CAMPOS, M.G.N. Evaluation of in vitro cytotoxicity of chitosan membranes for wound dressing. In: congresso latino americano de órgãos artificiais e biomateriais, 4., 2006, Caxambú. Anais... Caxambú: IV COLAOB, 2006.

CANELLA, K. M.; GARCIA, R. B. Characterization of chitosan by Gel Permeation Chromatography-Influence of preparation method and solvent. **Química Nova**, v. 24, n. 1, p. 13-17, 2001.

CARLSEN, C.; STAPELFELDT, H. Light sensitivity of elderberry extract. Quantum yields for photodegradation in aqueous solution. **Food chemistry**, v. 60, n. 3, p. 383-387, 1997.

CASTAÑEDA -OVANDO A.; PACHECO-HERNÁNDEZ M.L.; PÁEZ - HERNÁNDEZ M.E.; RODRÍGUEZ J.A.; GALÁN -VIDAL C.A.

Chemical studies of anthocyanins: A review. **Food Chemistry**, v. 113, p. 859–871, 2009.

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

CHEN, Q.; CABANAS-POLO, S.; GOUDOURI, O. M.; BOCCACCINI, A. R. Electrophoretic co-deposition of polyvinyl alcohol (PVA) reinforced alginate–Bioglass® composite coating on stainless steel: Mechanical properties and in-vitro bioactivity assessment. **Materials Science and Engineering**, v. 40, p. 55-64, 2014.

CHEN, T.; EMBREE, H. D.; BROWN, E. M.; TAYLOR, M. M.; PAYNE, G. F. Enzyme-catalyzed gel formation of gelatin and chitosan: potential for in situ applications. **Biomaterials**, v. 24, n. 17, p. 2831-2841, 2003.

CHERIAN, G.; GENNADIOS, A.; WELLER, C.; CHINACHOTI, P. Thermomchanical behavior of wheat gluten films: effects of sucrose, glycerin, and sorbitol: **Cereal Chemistry**, v.72, n.1, p.1-6, 1995.

CHIGURUPATI, A.; LANI SAIKI, A.; CHARLES GAYSER, JR. B.; ALEKHA, K. Evaluation of red cabbage dye as a potential natural color for pharmaceutical use Neela. **Dash International Journal of Pharmaceutics**, v. 241, p. 293–299, 2002.

COFFEY, D.G.; BELL, D.A.; HENDERSON, A. Cellulose and cellulose derivatives. **Food Science and Technology**, p. 123-123, 1995.

COFFIN, D. R.; FISHMAN, M.L. Physical and mechanical properties of highly plasticized pectin/starch films. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 54, n. 9, p. 1311-1320, 1994.

COFFIN, D.R.; FISHMAN, M.L.; COOKE, P.H. Mechanical and microstructural properties of pectin/starch films. **Journal of applied polymer science**, v. 57, n. 6, p. 663-670, 1995.

COLANTUONI, A.; BERTUGLIA, S.; MAGISTRETTI, M. J.; DONATO, L. Effects of Vaccinium Myrtillus anthocyanosides on arterial vasomotion. **Arzneimittel-forschung**, v. 41, n. 9, p. 905-909, 1991.

COOK, N. C; SAMMAN, S Flavonoids - chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources Nutritional. **Biochemistry**. 7, 66-76, 1996.

COSTA-SILVA, H.S.R; DOS SANTOS, K.S.C.R; FERREIRA, E.I. Chitosan: hydrossoluble derivatives, pharmaceutical applications and recent advances. **Química Nova**, v. 29, n. 4, p. 776-785, 2006.

CRUZ, S. F.; RODRIGUES FILHO, G.; VIEIRA, J. G.; ASSUNÇÃO, R. M. N.; PASQUINI, D. Síntese e caracterização de metilcelulose a partir da celulose extraída do caroço de manga. In: Anais do 10º Congresso Brasileiro de Polímeros-Foz do Iguaçu. 2009.

COUTINHO, M. R. Obtenção de antocianinas presentes no repolho roxo. 2002. 80 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2002.

CRINI, G.; BADOT, P. Application of chitosan, a natural aminopolysaccharide, for dye removal from aqueous solutions by adsorption processes using batch studies: A review of recent literature. **Progress in polymer science**, v. 33, n. 4, p. 399-447, 2008.

CUQ, B.; GONTARD, N.; GUILBERT, S. Edible film and coating as active layers. In: ROONEY, M. L. (Ed.) **Active food packaging**. London: Blackie Academic & Professional. p. 11-1142, 1995.

CURTRIGHT, R.; RYNEARSON, J.A.; MARKWELL, J. Anthocyanins: model compounds for learning about more than pH. **J. Chem. Edu.** 73, 306-309, 1996.

DA COSTA, C. S. Coberturas à base de quitosana na qualidade pós-colheita de morangos cv. Aromas (Tese de doutorado) Programa de pós-graduação em ciência e tecnologia agroindustrial - Universidade Federal de Pelotas – Faculdade de Agronomia "Eliseu Maciel", 2009.

DAMIAN, C. B.; FRANCISCO, L. H. D.; TEIXEIRA, E.; ESPIRITO SANTO, M. L. P. Avaliação Físico-química e da Textura (Instrumental e Sensorial) de Salsichas Elaboradas com Diferentes Níveis de Quitosana-Poli-(α -1'14) N-Acetil-D-Glucosamina. 2005.

DAMODARAN, Srinivasan; PARKIN, Kirk L.; FENNEMA, Owen R. Química de alimentos de Fennema. Artmed, 2010.

DE QUEIROZ, A.A.; SOARES, D.A.; TRZESNIAK, P.; ABRAHAM, G.A. Resistive-type humidity sensors based on PVP-Co and PVP-I2 complexes. **Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics**, v. 39, n. 4, p. 459-469, 2001.

DEBEAUFORT, F.; QUEZADA-GALLO, J.A.; VOILLEY, A. Edible films and coatings: Tomorrow's packaging: a review. **Critical Reviews in Food Science**, v.39, p.299-313, 1998.

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, n. 3, p. 173-289, 2000.

DEL-VALLE, E.M.M. Cyclodextrins and their uses: a review. **Process Biochemistry**, Amsterdam, v. 39, p. 1033- 1046, 2004.

DESBRIERES, J.; HIRRIEN, M.; RINAUDO, M. A calorimetric study of methylcellulose gelation. **Carbohydrate polymers**, v. 37, n. 2, p. 145-152, 1998.

DYRBY, M.; WESTERGARD, N.; STAPELFELDT, H. Light and heat sensitivity of red cabbage extract in soft drink models systems. **Food Chemistry**, v. 72, p. 431-437, 2001.

DON, T.M.; KING, C.F.; CHIU, W.Y.; PENG, C.A. Preparation and characterization of chitosan-g-poly (vinyl alcohol)/poly (vinyl alcohol) blends used for the evaluation of blood-contacting compatibility. **Carbohydrate Polymers**, v. 63, n. 3, p. 331-339, 2006.

DOWNHAM, A.; COLLINS, P. Colouring our foods in the last and next millennium. **International journal of food science & technology**, v. 35, n. 1, p. 5-22, 2000.

DUTTA, P.K.; TRIPATHI, S.; MEHROTRA, G.K.; DUTTA, J. Perspectives for chitosan based antimicrobial films in food applications. **Food chemistry**, 114, 1173-1182, 2009

EL GHAOUTH, A.; WILSON C.; BENHAMOU N. Ultrastructural and cytochemical aspects of the effect of chitosan on decay of bell pepper fruit. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 44, n. 6, p. 417-432, 1994.

EL-HEFIAN, ESAM A.; NASEF, MOHAMED MAHMOUD; YAHAYA, ABDUL HAMID. The preparation and characterization of chitosan/poly (vinyl alcohol) blended films. **Journal of Chemistry**, v. 7, n. 4, p. 1212-1219, 2010.

ESMAEILI, A.; BENI, A.A. A novel fixed-bed reactor design incorporating an electrospun PVA/chitosan nanofiber membrane. **Journal of hazardous materials**, v. 280, p. 788-796, 2014.

FAI, A.E.C.; STAMFORD, T.C.M.; STAMFORD, T.L.M. Potencial biotecnológico de quitosana em sistemas de conservação de alimentos. **Revista Iberoamericana de Polímeros**, v. 9, n. 5, p. 435-451, 2008.

FAKHOURI, F.M.; FONTES, L.C.B.; GONÇALVES, P.V. de M.; MILANEZ, C.R.; STEEL, C.J.; COLLARES-QUEIROZ, F.P. Filmes e coberturas comestíveis compostas à base de amidos nativos e gelatina na conservação e aceitação sensorial de uvas Crimson. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 27(2): 369-375, 2007.

FALCÃO, L. D.; BARROS, D. M.; GAUCHE, C. LUIZ, M.T.B. Copigmentação intra e intermolecular de antocianinas: uma revisão. *B. CEPPA, Curitiba*, v. 21, p. 351-366, 2003.

FORD, JAMES L. Thermal analysis of hydroxypropylmethylcellulose and methylcellulose: powders, gels and matrix tablets. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 179, n. 2, p. 209-228, 1999.

FRANCIS, F. J. Anthocyanins and betalains: Composition and applications. **Cereal Foods World**. v. 45, p. 208–213, 2000.

GAN, Q.; WANG, T.; COCHRANE, C.; MCCARRON, P. Modulation of surface charge, particle size and morphological properties of chitosan–TPP nanoparticles intended for gene delivery. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 44, n. 2, p. 65-73, 2005.

GARCIA, M. A.; FERRERO, C.; BERTOLA, N.; MARTINO, M.; ZARITZKY, N. Edible coatings from cellulose derivatives to reduce oil uptake in fried products. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 3, n. 4, p. 391-397, 2002.

GARCÍA CRUZ, D. M.; ESCOBAR IVIRICO, J. L.; GOMES, M. M.; GÓMEZ RIBELLES, J. L.; SÁNCHEZ, M. S.; REIS, R. L.; MANO, J. F. Chitosan microparticles as injectable scaffolds for tissue engineering. **Journal of tissue engineering and regenerative medicine**, v. 2, n. 6, p. 378-380, 2008.

GENNADIOS, A.; WELLER, C. L.; HANNA, M. A.; FRONING, G. W. Mechanical and barrier properties of egg albumen films. **Journal of Food Science**, v.61, p. 585-589, 1996.

GIAMPIERI, F.; ALVAREZ-SUAREZ, J.M.; BATTINO, M. Strawberry and human health: Effects beyond antioxidant activity. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 62, n. 18, p. 3867-3876, 2014.

GOMES, Laidson Paes et al. Purification and characterization of grape (*Vitis vinífera L. cv Red Globe*) chitinases for production of chitosan from shrimp chitin. **Química Nova**, v. 33, n. 9, p. 1882-1886, 2010.

GONTARD, N.; GUILBERT, S. Edible wheat gluten films: influence of the main process variables on film properties using response surface methodology. **Journal of Food Science**, v. 57, n. 1, p. 190-195, 1992.

GONTARD, N.; GUILBERT, S.; CUQ, J. Edible wheat gluten films: influence of the main process variables on film properties using response

surface methodology. **Journal of Food Science**, v. 57, n. 1, p. 190-195, 1992.

GONTARD, N.; RING, S. Edible wheat gluten film: influence of water content on glass transition temperature. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 44, n. 11, p. 3474-3478, 1996.

GONTARD, Nathalie. Films et enrobages comestibles: étude et amélioration des propriétés filmogènes du gluten. 1991.

GOOSEN, M. E. A. Applications of chitin and chitosan. **Technomic Publishing Company**, Lancaster, 1996.

HALLEY, P.; RUTGERS, R.; COOMBS, S.; KETTELS, J.; GRALTON, J.; CHRISTIE, G.; LONERGAN, G. Developing biodegradable mulch films from starch-based polymers. **Starch-Stärke**, v. 53, n. 8, p. 362-367, 2001.

HARBORNE, J. B. The flavonoids: recent advances. **Plant Pigments**, London, p. 298-343, 1988.

HARBORNE, J. B.; GRAYER, R.J. The anthocyanins. In: The flavonoids. **Springer**, 1988. p. 1-20.

HASSAN, C.M.; PEPPAS, N.A. Structure and applications of poly (vinyl alcohol) hydrogels produced by conventional crosslinking or by freezing/thawing methods. In: Biopolymers· PVA Hydrogels, Anionic Polymerisation Nanocomposites. **Springer Berlin Heidelberg**, p. 37-65, 2000.

HEIM, K.E., TAGLIAFERRO, A. R., BOBILYA, D. J. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. **J. Nutr. Biochem.**, v. 13, p. 572-584, 2002.

HEREDIA, F. J.; FRANCA-ARICHA, E. M.; RIVAS-GONZALO, J. C.; VICARIO, I. M.; SANTOS-BUELGA, C. Chromatic characterization of anthocyanins from red grapes—I. pH effect. **Food Chemistry**, v. 63, n. 4, p. 491-498, 1998.

HOLOWNIA, K. I.; CHINNAN, M. S.; ERICKSON, M. C.; MALLIKARJUNAN, P. Quality Evaluation of Edible Film-Coated Chicken Strips and Frying Oils. **Journal of Food Science**, v. 65, n. 6, p. 1087-1090, 2000.

HRAZDINA, G.; IREDALE, H.; MATTICK, L. R. Anthocyanin composition of Brassica oleracea cv. Red Danish. **Phytochemistry**, v. 16, n. 2, p. 297-299, 1977.

HUMEAU, C.; ROVEL, B.; GIRARDIN, M. Enzymatic esterification of bixin by L-ascorbic acid. **Biotechnology letters**, v. 22, n. 2, p. 165-168, 2000.

HAMBLETON, A.; FABRA, M. J.; DEBEAUFORT, F.; DURY-BRUN, C.; VOILLEY, A. Interface and aroma barrier properties of iota-carrageenan emulsion-based films used for encapsulation of active food compounds. **Journal of food engineering**, v. 93, n. 1, p. 80-88, 2009.

HWANG, San-pin et al. In vitro and in vivo antibacterial activity of shrimp chitosan against some intestinal bacteria. **Fisheries science**, v. 70, n. 4, p. 675-681, 2004.

HWANG, Jae Kwan et al. Rheological properties of chitosan solutions. *Korea-Australia Rheology Journal*, v. 12, n. 3-4, p. 175-179, 2000.

IACOBUCCI G.A.; SWEENEY J.G., The chemistry of anthocyanins, anthocyanidins and related flavylum salts. **Tetrahedron**, v.39, p. 3005-3038, 1983.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz**. v. 1: Métodos químicos e físicos para análise de alimentos, 3. ed. Sao Paulo: IMESP, 1985. p. 21-22.

IIJIMA, Y.; JOH, A. Pigment Composition Responsible for the Pale Yellow Color of Ginger (*Zingiber officinale*) Rhizomes. **Food Science and Technology Research**, v. 20, n. 5, p. 971-978, 2014.

ISHIHARA, M.; NAKANISHI, K.; ONO, K.; SATO, M.; KIKUCHI, M.; SAITO, Y.; KURITA, A. Photocrosslinkable chitosan as a dressing for

wound occlusion and accelerator in healing process. **Biomaterials**, v. 23, n. 3, p. 833-840, 2002.

JACKMAN, R. L.; SMITH, J. L. Anthocyanins and betalains. In: **Natural food colorants**. Springer US, 1996. p. 244-309.

JACKMAN, R.L. SMITH, J.L. Anthocyanins and betalains. In: Hendry, G.A.F. and Houghton, J.D. **Natural Food Colorants**. London: Blackie Academic, pp. 183-241, 1992.

JANIK, Romuald A.; ŁUKOWSKI, Tomasz. Wrapping interactions at strong coupling: the giant magnon. **Physical Review D**, v. 76, p. 126008, 2007.

JIA, et al. Synthesis and antibacterial activities of quaternary ammonium salt of chitosan. **Carbohydrate research**, v. 333, n. 1, p. 1-6, 2001.

JIANG, Y.; LI, J.; JIANG, W. Effects of chitosan coating on shelf life of cold-stored litchi fruit at ambient temperature. **LWT - Food Sci Technol**. v. 38, p. 757-761, 2005.

JIN, L.; BAI, R. Mechanisms of lead adsorption on chitosan/PVA hydrogel beads. **Langmuir**, v. 18, n. 25, p. 9765-9770, 2002.

JUNG, B. O.; KIM, C. H.; CHOI, K. S.; LEE, Y. M.; KIM, J. J. Preparation of amphiphilic chitosan and their antimicrobial activities. **Journal of applied polymer science**, v. 72, n. 13, p. 1713-1719, 1999.

KAYAL, S.; RAMANUJAN, R. V. Doxorubicin loaded PVA coated iron oxide nanoparticles for targeted drug delivery. **Materials Science and Engineering: C**, v. 30, n. 3, p. 484-490, 2010.

KEARSLEY, M. W.; RODRIGUEZ, N. The stability and use of natural colours in foods: anthocyanin, β -carotene and riboflavin. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 16, n. 4, p. 421-431, 1981.

KAFETZOPOULOS, D.; MARTINO, A.; BOURIOTIS, V. Bioconversion of chitin to chitosan: purification and characterization of

chitin deacetylase from *Mucor rouxii*. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. **90**, p. 2564-8, 1993.

KERRY, J. P.; O'GRADY, M. N.; HOGAN, S. A. Past, current and potential utilization of active and intelligent packaging systems for meat and muscle-based products: a review. **Meat Science**, v. 1, n. 74, p. 113-130, 2006.

KESTER, J. J.; FENNEMA, O. R. Edible films and coatings: a review. *Food technology (USA)*, 1986.

KHOR, E. Chitin: a biomaterial in waiting. **Current Opinion in Solid State and Materials Science**, v. 6, n. 4, p. 313-317, 2002.

KIM, C.H. et al. Synthesis of chitosan derivatives with quaternary ammonium salt and their antibacterial activity. **Polymer Bulletin**, v. 38, n. 4, p. 387-393, 1997.

KIMURA, I. Y.; GONÇALVES, A. C.; STOLBERG, J.; LARANJEIRA, M. C. M.; FÁVERE, V. T. Efeito do pH e do tempo de contato na adsorção de corantes reativos por microesferas de quitosana. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 9, n. 3, p. 51-57, 1999.

KINSELLA, J. E.; FRANKEL, E.; GERMAN, B.; KANNER, J. Possible mechanisms for the protective role of antioxidants in wine and plant foods. **Food technology**, 1993.

KOBAYASHI, K.; HUANG, C.; LODGE, T.P. Thermoreversible gelation of aqueous methylcellulose solutions. **Macromolecules**, v. 32, n. 21, p. 7070-7077, 1999.

KONG, J.M.; CHIA, L.S.; GOH, N.K.; CHIA, T.F.; BROUILLARD, R. Analysis and biological activities of anthocyanins. **Phytochemistry**, v. 64, n. 5, p. 923-933, 2003.

KROCHTA, J.M.; MULDER-JOHNSTON, C. Edible and biodegradable polymer films: challenges and opportunities. *Food Technology*, v. 51, n. 2, p. 61-74, 1997.

KUBOTA, E. H.; OLIVO, R.; SHIMOKOMAKI, M. Maturação da carne: um processo enzimático. **Revista Nacional da Carne**, v. 18, n. 200, out., p. 12-15, 1993.

KUBOTA, N.; TASTUMOTO, N.; SANO, T.; TOYA, K. A simple preparation of half Nacetylated chitosan highly soluble in water and aqueous organic solvents. **Carbohydrate Research**, v. 324, p. 268–274, 2000.

KUHNAU, J., The Flavonoids. A class of semi-essential food components: Their role in human nutrition. **World Rev. Nutr. Dietet.** v.24, p.117-191, 1976.

KUMAR, M.N.V.R. A review of chitin and chitosan applications. **Reactive and functional polymers**, v. 46, n. 1, p. 1-27, 2000.

KURITA, K. Chemistry and application of chitin and chitosan. **Polymer Degradation and stability**, v. 59, n. 1, p. 117-120, 1998.

LAROTONDA, F. D. S. Desenvolvimento de biofilmes a partir da fecula de mandioca. 2002.

LAUS, R.; COSTA, T. G.; SZPOGANICZ, B.; FÁVERE, V. T. Adsorption and desorption of Cu (II), Cd (II) and Pb (II) ions using chitosan crosslinked with epichlorohydrin-triphosphate as the adsorbent. **Journal of hazardous materials**, v. 183, n. 1, p. 233-241, 2010.

LE DUNG, P. et al. Water soluble derivatives obtained by controlled chemical modifications of chitosan. **Carbohydrate Polymers**, v. 24, n. 3, p. 209-214, 1994.

LEE, JIN HWAN; LEE, HYEON-JIN; CHOUNG, MYOUNG-GUN. Anthocyanin compositions and biological activities from the red petals of Korean edible rose (*Rosa hybrida* cv. Noblered). **Food chemistry**, v. 129, n. 2, p. 272-278, 2011.

LEWANDOWSKA, KATARZYNA. Rheological properties of chitosan acetate blends with vinyl polymers. **Progress on Chemistry and Application of Chitin and Its derivatives**, v. 14, p. 41-8, 2009.

LI, B.; KENNEDY, J. F.; PENG, J. L.; YIE, X.; XIE, B. J. Preparation and performance evaluation of glucomannan–chitosan–nisin ternary antimicrobial blend film. **Carbohydrate Polymers**, v. 65, n. 4, p. 488-494, 2006.

LIM, S.; HUDSON, S.M. Synthesis and antimicrobial activity of a water-soluble chitosan derivative with a fiber-reactive group. **Carbohydrate research**, v. 339, n. 2, p. 313-319, 2004.

LOPES, T.J.; QUADRI, M.B.; QUADRI, M.G.N. Estudo experimental da Adsorção de Antocianinas comercial de Repolho-roxo em argilas no processo de batelada. **Brazilian Journal of Food Technology**, 9: 49-56, 2006. LOPES et al., 2007.

LU, M.; LI, Z.; LIANG, H.; SHI, M.; ZHAO, L.; LI, W.; LI, Y. Controlled release of anthocyanins from oxidized konjac glucomannan microspheres stabilized by chitosan oligosaccharides. **Food Hydrocolloids**, v. 51, p. 476-485, 2015.

LUCAS, E.; SOARES, B. G.; MONTEIRO, E. Caracterização de Polímeros: determinação de peso molecular e análise térmica. Rio de Janeiro: Editora e-papers, p. 366, 2001.

MA, L.; GAO, C.; MAO, Z.; ZHOU, J.; SHEN, J.; HU, X.; HAN, C. Collagen/chitosan porous scaffolds with improved biostability for skin tissue engineering. **Biomaterials**, v. 24, n. 26, p. 4833-4841, 2003.

MACHOVÁ, E.; KVAPILOVA, K.; KOGAN, G.; ŠANDULA, J. Effect of ultrasonic treatment on the molecular weight of carboxymethylated chitin–glucan complex from *Aspergillus niger*. **Ultrasonics sonochemistry**, v. 5, n. 4, p. 169-172, 1999.

MACIEL, V. B. V.; YOSHIDA, C. M. P.; FRANCO, T. T. Development of a prototype of a colourimetric temperature indicator for monitoring food quality. **Journal of Food Engineering**, v.111, p.21-27, 2012.

MALACRIDA, C. R.; MOTTA, S. da. Antocianinas em suco de uva: composição e estabilidade. **Boletim do CEPPA**, v. 24, n. 1, p. 59-82, 2006.

MALIEN-AUBERT, C., DANGLES, O., AMIOT, M.J. Color stability of commercial anthocyanin based extracts in relation to the phenolic composition. **J. Agric. Food Chem.** 49, 170–176, 2001.

MARIOTTI, M.; PAGANI, M. A.; LUCISANO, M. The role of buckwheat and HPMC on the breadmaking properties of some commercial gluten-free bread mixtures. **Food Hydrocolloids**, v. 30, n. 1, p. 393-400, 2013.

MARKAKIS, P. Anthocyanins as Food Colors. New York: **Academic Press**, 1982.

MARTINS, A. F.; BUENO, P. V.; ALMEIDA, E. A.; RODRIGUES, F. H.; RUBIRA, A. F., MUNIZ, E. C. Characterization of N-trimethyl chitosan/alginate complexes and curcumin release. **International journal of biological macromolecules**, v. 57, p. 174-184, 2012.

MATHUR, N. K.; NARANG, C. K. – **J. Chem. Educ.**, 67 (11), p.938 (1990).

MATSUI, T.; EBUCHI, S.; KOBAYASHI, M.; FUKUI, K.; SUGITA, K.; TERAHARA, N.; MATSUMOTO, K. Anti-hyperglycemic effect of diacylated anthocyanin derived from Ipomoea batatas cultivar Ayamurasaki can be achieved through the α -glucosidase inhibitory action. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 50, n. 25, p. 7244-7248, 2002.

MAZZA, G. The mechanism of copigmentation of anthocyanins in aqueous solutions. **Phytochemistry**, v. 29, p. 1097, 1990.

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

MAZZA, G.; KAY, C. D.; COTTRELL, T.; HOLUB, B. J. Absorption of anthocyanins from blueberries and serum antioxidant status in human subjects. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 50, n. 26, p. 7731-7737, 2002.

MAZZA, G.; MINIATI, E. Anthocyanins in fruits, vegetables and grains, Boca Raton-Florida (USA): **CRC Press**. 1993.

METHACANON, P.; CHAIKUMPOLLERT, O.; THAVORNITI, P.; SUCHIVA, K. Hemicellulosic polymer from Vetiver grass and its physicochemical properties. **Carbohydrate Polymers**, v. 54, n. 3, p. 335-342, 2003.

MEYERS, K.J.; WATKINS, C.B.; PRITTS, M.P.; LIU, R.H. Antioxidant and antiproliferative activities of strawberries. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, n. 23, p. 6887-6892, 2003.

MCHUGH, TARA HABIG; KROCHTA, JOHN M. Sorbitol-vs glycerol-plasticized whey protein edible films: integrated oxygen permeability and tensile property evaluation. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 42, n. 4, p. 841-845, 1994.

MILIOLI, Camila Cardoso et al. Avaliação da atividade antimicrobiana da quitosana em pó dopada com prata. 2011.

MILOSAVLJEVIĆ, N.B.; KLJAJEVIĆ, L.M.; POPOVIĆ, I.G.; FILIPOVIĆ, J.M.; KALAGASIDIS KRUŠIĆ, M.T. Chitosan, itaconic acid and poly (vinyl alcohol) hybrid polymer networks of high degree of swelling and good mechanical strength. **Polymer International**, v. 59, n. 5, p. 686-694, 2010.

MITCHELL, R. A. C.; MITCHELL, V. J.; DRISCOLL, S. P.; FRANKLIN, J.; LAWLOR, D. W. Effects of increased CO₂ concentration and temperature on growth and yield of winter wheat at two levels of nitrogen application. **Plant, Cell and Environment**, v. 16, n. 5, p. 521-529, 1993.

MIYAMOTO, D. M.; PIRES, G.; DE LIRA, R. A.; MELO, V. H.; JUNIOR, J. A. O.; NASCIMENTO, N.; MARIANGELA DE BURGOS,

M. Chitosan Microspheres loaded with holmium-165 produced by Spray Dryer for liver cancer therapy: preliminary experiments. 2011.

MORETTO, E.; FETT, R. Manual de aditivos para indústrias de alimentos. 2ª Edição, 1988.

MOURA, Márcia R. D.; AOUADA, Fauze A.; MATTOSO, Luiz HC. Preparation of chitosan nanoparticles using methacrylic acid. **Journal of colloid and interface science**, v. 321, n. 2, p. 477-483, 2008.

MUZZARELLI, Corrado et al. Alkaline chitosan solutions. **Carbohydrate research**, v. 338, n. 21, p. 2247-2255, 2003.

NACZK, M.; SHAHIDI, F. Extraction and analysis of phenolics in food. **Journal of chromatography A**, v. 1054, n. 1, p. 95-111, 2004.

NAKATSUKA, S.; ANDRADY, A.L. Permeability of vitamin B-12 in chitosan membranes. Effect of crosslinking and blending with poly (vinyl alcohol) on permeability. **Journal of applied polymer science**, v. 44, n. 1, p. 17-28, 1992.

NARAYAN, M. S.; NAIDU, K. A.; RAVISHANKAR, G. A.; SRINIVAS, L.; VENKATARAMAN, L. V. Antioxidant effect of anthocyanin on enzymatic and non-enzymatic lipid peroxidation. **Prostaglandins, leukotrienes and essential fatty acids**, v. 60, n. 1, p. 1-4, 1999.

NAYAK, PADMA L. Biodegradable polymers: opportunities and challenges. 1999.

NEAMTU, I.; CHIRIAC, A.P.; NITA, L.E.; BERCEA, M.; STOLERIU, A. Investigation of poly (aspartic acid)/vinyl polymer interpolymer complex. **Journal of optoelectronics and advanced materials**, v. 9, n. 4, p. 981-984, 2007.

NEVES, ANDRÉIA LANGE DE PINHO. Preparação e caracterização de nanopartículas de quitosana incorporadas com zinco com potencial atividade cicatrizante e antimicrobiana. 2013.

NGUYEN, S.; WINNIK, F. M.; BUSCHMANN, M.D. Improved reproducibility in the determination of the molecular weight of chitosan by analytical size exclusion chromatography. **Carbohydrate Polymers**, v. 75, n. 3, p. 528-533, 2009.

NODA, Y.; KNEYUKI, T.; IGARASHI, K.; MORI, A.; PACKER, L. Antioxidant activity of nasunin, an anthocyanin in eggplant peels, **Toxicology**, v. 148, p. 119-123, 2000.

OGALE, A.A.; CUNNINGHAM, P. L.; DAWSON, J.C.; ACTON, J.C. Viscoelastic, Thermal, and Microstructural Characterization of Soy Protein Isolate Films. **Journal of Food Science**, v. 65, 4, p.672-679, 2000.

OKUYAMA, K.; NOGUCHI, K.; KANEMARI, M.; EGAWA, T.; OSAWA, K.; OGAWA, K. Structural diversity of chitosan and its complexes. **Carbohydrate Polymers**, v.41, p.237-247, 2000.

ONYANGO, C.; UNBEHEND, G.; LINDHAUER, M.G. Effect of cellulose-derivatives and emulsifiers on creep-recovery and crumb properties of gluten-free bread prepared from sorghum and gelatinised cassava starch. **Food Research International**, v. 42, n. 8, p. 949-955, 2009.

PARPARITA, E.; CHEABURU, C.N.; VASILE, C. Morphological, thermal and rheological characterization of polyvinyl alcohol/chitosan blends. **Cellulose Chem. Technol**, v. 46, p. 571-581, 2012.

PASSAMONTI, S.; VRHOVSEK, U.; VANZO, A.; MATTIVI, F. The stomach as a site for anthocyanins absorption from food. **Federation of the European Biochemical Societies Letters**, v. 544, p. 210–213, 2003.

PEN, L. T.; JIANG, Y. M. Effects of chitosan coating on shelf life and quality of fresh-cut Chinese water chestnut. **Lebensmittel, Wissenschaft und Technologie**, San Diego, v. 36, n. 3, p. 359-364, 2003.

PETERSON, J.; DWYER, J. An Informatics Approach to Flavonoid Database Development, **J. Food Compos. Anal.**, 13, 441-454, 2000.

PEREZ ESPITIA, P. J.; DE FÁTIMA FERREIRA SOARES, N.; DOS REIS COIMBRA, J. S.; DE ANDRADE, N. J.; SOUZA CRUZ, R.; MEDEIROS, A.; ANTONIO, E. Bioactive peptides: synthesis, properties, and applications in the packaging and preservation of food. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 11, n. 2, p. 187-204, 2012.

PHAECHAMUD, T.; KOIZUMI, T.; RITTHIDEJ, G.C. Chitosan citrate as film former: compatibility with water-soluble anionic dyes and drug dissolution from coated tablet. **International journal of pharmaceutics**, v. 198, n. 1, p. 97-111, 2000.

PRIMO-MARTÍN, C.; SANZ, T.; STERLINGA, D. W.; SALVADOR, A.; FISZMAN, S. M.; VAN VLIET, T. Performance of cellulose derivatives in deep-fried battered snacks: Oil barrier and crispy properties. **Food Hydrocolloids**, v. 24, n. 8, p. 702-708, 2010.

Product Information Bulletin for Powdered San Red RC. San-Ei Gen F.F.I, Inc. 489 Fifth Avenue, New York, NY, 2000.

RENAUD, S.; DE LORGERIL, M. Wine, alcohol, platelets, and the French paradox for coronary heart disease. **Lancet**, 339(8808), 1523-1526, 1992.

RESENDE, Josane Maria. Revestimentos biodegradáveis para conservação do coco. 2007.

RHIM, J.W. Physical Mechanical Properties of Agar/ κ -Carrageenan Blend Film and Derived Clay Nanocomposite Film. **Journal of food science**, v. 77, n. 12, p. N66-N73, 2012.

RHOADES, J.; ROLLER, S. Antimicrobial actions of degraded and native chitosan against spoilage organisms in laboratory media and foods. **Applied and environmental microbiology**, v. 66, n. 1, p. 80-86, 2000.

RINAUDO, M.; PAVLOV, G.; DESBRIERES, J. Influence of acetic acid concentration on the solubilization of chitosan. **Polymer**, v. 40, n. 25, p. 7029-7032, 1999.

RINAUDO, Marguerite. Chitin and chitosan: properties and applications. **Progress in polymer science**, v. 31, n. 7, p. 603-632, 2006.

DOS SANTOS, J. E.; DA P SOARES, J.; DOCKAL, E. R.; FILHO, S. P. C.; CAVALHEIRO, É. T. Caracterização de quitosanas comerciais de diferentes origens. **Polímeros Ciência e Tecnologia**, v. 13, n. 4, p. 242-249, 2003.

SANTOS, D. T.; MEIRELES, M. A. A. Jabuticaba as a source of functional pigments. **Pharmacognosy Reviews**, v. 3, n. 5, p. 127-132, 2009.

SAPERS, G.M.; TAFFER, I.; ROSS, L.R. Functional properties of a food colorant prepared from red cabbage. **Food Science**. 46, 105–109, 1981.

SARANTÓPOULOS, CIGL; OLIVEIRA, LM; CANAVESI, E. Carnes, Aves, Pescados e Derivados. **Requisitos de conservação de alimentos em embalagens flexíveis**. Campinas, SP: CETEA, 151-174, 2001.

SARANTÓPOULOS, C. G. L.; OLIVEIRA, L. M.; PADULA, M.; COLTRO, L.; ALVES, R. M. V.; GARCIA, E. E. C. Embalagens plásticas flexíveis: principais polímeros e avaliação de propriedades. **Campinas: CETEA/ITAL**, 2002.

SARANTÓPOULOS, C. G. L.; MORAES, B. B. Embalagens ativas e inteligentes para frutas e hortaliças. CETEA, Instituto de Tecnologia de Alimentos, ITAL, **Boletim de Tecnologia e Desenvolvimento de Embalagem**, v. 21, 2009.

SATHIVEL, S. Chitosan and protein coatings affect yield, moisture loss, and lipid oxidation of pink salmon (*Oncorhynchus gorbusha*) fillets during frozen storage. **Journal of food science**, v. 70, n. 8, p. e455-e459, 2005.

SATO, T.; ISHII, T.; OKAHATA, Y. In vitro gene delivery mediated by chitosan. Effect of pH, serum, and molecular mass of chitosan on the transfection efficiency. **Biomaterials**, v. 22, n. 15, p. 2075-2080, 2001.

SHARMA, P.K. Surface studies relevant to microbial adhesion and bioflotation of sulphide minerals. 2001.

SHI, Z.; LIN, M.; FRANCIS, F. J. Stability of anthocyanins from *Tradescaniapallida*. **Journal of food science**, v. 57, n. 3, p. 758-770, 1992.

SHIGEMASA, Y. et al. Chemical modification of chitin and chitosan 1: preparation of partially deacetylated chitin derivatives via a ring-opening reaction with cyclic acid anhydrides in lithium chloride/N, N-dimethylacetamide. **Carbohydrate polymers**, v. 39, n. 3, p. 237-243, 1999.

SHRIKHANDE, A. J.; FRANCIS, F. J. Effect of flavonols on ascorbic acid and anthocyanin stability in model systems. **Journal of Food Science**, v. 39, n. 5, p. 904-906, 1974.

SILVA, HÉLIO SR; DOS SANTOS, KÁTIA SCR; FERREIRA, ELIZABETH I. Chitosan: hydrossoluble derivatives, pharmaceutical applications and recent advances. *Química Nova*, v. 29, n. 4, p. 776-785, 2006.

SILVA, H. S. R. C.; DOS SANTOS, K. S. C. R.; FERREIRA, Elizabeth I. Quitosana: derivados hidrossolúveis, aplicações farmacêuticas e avanços. **Química Nova**, v. 29, n. 4, p. 776, 2006.

ŠIMKOVIC, I.; LASZLO, J.A.; THOMPSON, A.R. Preparation of a weakly basic ion exchanger by crosslinking starch with epichlorohydrin in the presence of NH₄ OH. **Carbohydrate polymers**, v. 30, n. 1, p. 25-30, 1996.

SINGLA, A. K.; CHAWLA, M. Chitosan: Some pharmaceutical and biological aspects-an update. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 53, n. 8, p. 1047-1067, 2001.

SKJAK-BRAEK, G.; ANTHONSEN, T.; SANDFORD, P. Chitin and chitosan. In: **Proceedings of the 4th International Conference on Chitin and Chitosan**, Elsevier, London. 1989.

SMOLANDER, M. The use of freshness indicators in packaging. In: Ahvenainen. R. (Ed.), *Novel Food Packaging Techniques*. **Woodhead Publishing**, Cambridge, U.K., pp. 127-143, 2003

SOARES, N. D. F. F.; SILVA, D. F. P.; CAMILLOTO, G. P.; OLIVEIRA, C. P.; PINHEIRO, N. M.; MEDEIROS, E. A. A. Antimicrobial edible coating in post-harvest conservation of guava. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 33, n. SPE1, p. 281-289, 2011.

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

SOLOMONS, T. W. G. – Carbohydrates, in: **Organic Chemistry**, cap. 22, John Wiley and Sons, New York, 1996.

SUGIMOTO, K.; YOSHIDA, M.; Yata, T.; HIGAKI, K.; KIMURA, T. Evaluation of poly (vinyl alcohol)-gel spheres containing chitosan as dosage form to control gastrointestinal transit time of drugs. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 21, p. 1202-1206, 1998.

SUN, J.; CHU, Y. F.; WU, X.; LIU, R.H. Antioxidant and antiproliferative activities of common fruits. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 25, p. 7449-7454, 2002.

TANAKA, Y.; SASAKI, N.; OHMIYA, A. Biosynthesis of plant pigments: anthocyanins, betalains and carotenoids. **Plant Journal**, v. 54, p. 733-749, 2008.

TANG, Y. F.; DU, Y. M.; HU, X. W.; SHI, X. W.; KENNEDY, J.F. Rheological characterisation of a novel thermosensitive chitosan/poly (vinyl alcohol) blend hydrogel. **Carbohydrate Polymers**, v. 67, n. 4, p. 491-499, 2007.

TANG, X.; ALAVI, S. Structure and physical properties of starch/poly vinyl alcohol/laponite RD nanocomposite films. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 60, n. 8, p. 1954-1962, 2012.

TERAHARA, N. et al. Five new anthocyanins, ternatins A3, B4, B3, B2, and D2, from *Clitoria ternatea* flowers. **Journal of natural products**, v. 59, n. 2, p. 139-144, 1996.

THARANATHAN, R.N.; KITTUR, F.S. Chitin—the undisputed biomolecule of great potential. 2003.

TOUFEILI, I. M. A. D.; DAGHER, S. H. A. W. K. Y.; SHADAREVIAN, S. O. S. S. Y.; NOUREDDINE, A. B. I. R.; SARAKBI, M.; FARRAN, M. T. Formulation of gluten-free pocket-type flat breads: optimization of methylcellulose, gum Arabic, and egg albumen levels by response surface methodology. **Cereal Chemistry**, v. 71, n. 6, p. 594-600, 1994.

UENO, H.; YAMADA, H.; TANAKA, I.; KABA, N.; MATSUURA, M.; OKUMURA, M.; FUJINAGA, T. Accelerating effects of chitosan for healing at early phase of experimental open wound in dogs. **Biomaterials**, v. 20, n. 15, p. 1407-1414, 1999.

VALDUGA, E., LIMA, L., DO PRADO, R., PADILHA, F. F., TREICHEL, H. Extração, secagem por atomização e microencapsulamento de antocianinas do bagaço da uva isabel (*vitis labrusca*). a a, v. 1, n. 2, p. 1, 2008.

VEIGA-SANTOS, P.; DITCHFIELD, C.; TADINI, C.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.

VELDE, V. K.; KIEKENS, P. Biopolymers: overview of several properties and consequences on their applications. **Polymer Testing**, v. 21, p. 433-442, 2002.

VIGOURET, M.; RINAUDO, M.; DESBRIERES, J. Thermogelation of methylcellulose in aqueous solutions. **Journal de chimie physique**, v. 93, n. 5, p. 858-869, 1996.

VINCIERI, F. F.; ROMANI, A.; BALDI, A.; MULINACCI, N.; BAMBAGIOTTI ALBERTI, M. Analysis HPLC of anthocyanins present

in fluid extract from *Malva silvestris* L. flowers and leaves. **Bulletin de Liaison Groupe Polyphenols** (France), 1992.

WAGNER, L. A.; WATHESEN, J. J. Stability of spray-dried encapsulated carrot carotene. **Journal of Food Science**, v. 60, n. 5, p. 1048-1053, 1995.

WALTON, M. C.; LENTLE, R. G.; REYNOLDS, G. W.; KRUGER, M. C.; MCGHIE, T. K. Anthocyanins absorption and antioxidant status in pigs. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 20, p. 7940-7946, 2006.

WAN, L.S.C; PRASAD, K.P.P. Relationship between temperature and swelling of Methycelloulose in Tablets. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 16, n. 6, p. 945-950, 1990.

WANG, S.; TAN, Y.; ZHAO, D.; LIU, G. Amperometric tyrosinase biosensor based on Fe₃O₄ nanoparticles–chitosan nanocomposite. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 23, n. 12, p. 1781-1787, 2008.

WANG, X.; SUN, R.; WANG, C. pH dependence and thermodynamics of Hg (II) adsorption onto chitosan-poly (vinyl alcohol) hydrogel adsorbent. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 441, p. 51-58, 2014.

WARD, Ian M.; HADLEY, Dennis W. An introduction to the mechanical properties of solid polymers. John Wiley & Sons Ltd.; John Wiley & Sons, Inc., 1993.

WROLSTAD, R. E. Anthocyanin pigments—Bioactivity and coloring properties. **Journal of Food Science**, v. 69, n. 5, p. C419-C425, 2004.

WULF, L. W.; NAGEL, C. W. High-pressure liquid chromatographic separation of anthocyanins of *Vitis vinifera*. **American Journal of Enology and Viticulture**, 29, 42–49, 1978.

WUNDERLICH, B. Macromolecular Physics. V.3- Crystal Melting. **Academic Press**, 1981.

XIE, W.; XU, P.; LIU, Q. Antioxidant activity of water-soluble chitosan derivatives. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 11, n. 13, p. 1699-1701, 2001.

XU, Y.X.; KIM, K.M.; HANNA, M.A.; NAG, D. Chitosan–starch composite film: preparation and characterization. **Industrial Crops and Products**, v. 21, n. 2, p. 185-192, 2005.

YADAV, A. V.; BHISE, S. B. Chitosan: A potential biomaterial effective against typhoid. **Current Science**, v. 87, n. 9, p. 1176-1178, 2004.

YAM, K. L.; TAKHISTOV, P. T.; MILTZ, J. Intelligent packaging: concepts and applications. **Journal of Food Science**, p.70, 2005.

YANG, L.; HSIAO, W. W.; CHEN, P. Chitosan–cellulose composite membrane for affinity purification of biopolymers and immunoadsorption. **Journal of Membrane Science**, v. 197, n. 1, p. 185-197, 2002.

YANG, C.; XU, L.; ZHOU, Y.; ZHANG, X.; HUANG, X.; WANG, M.; LI, J. A green fabrication approach of gelatin/CM-chitosan hybrid hydrogel for wound healing. **Carbohydrate Polymers**, v. 82, n. 4, p. 1297-1305, 2010.

YANG, L.; PAULSON, A. T. Mechanical and water vapour barrier properties of edible gellan films. *Food Research International*, v. 33, n. 7, p. 563-570, 2000.

YOO, S.R.; KROCHTA, J.M. Starch–methylcellulose–whey protein film properties. *International Journal of Food Science & Technology*, v. 47, n. 2, p. 255-261, 2012.

YOSHIDA, HIROYUKI; OKAMOTO, AKIHIDE; KATAOKA, TAKESHI. Adsorption of acid dye on cross-linked chitosan fibers: equilibria. **Chemical Engineering Science**, v. 48, n. 12, p. 2267-2272, 1993.

YOSHIDA, C.M.P.; BASTOS, C.E.N.; FRANCO, T.T. Modeling of potassium sorbate diffusion through chitosan films. **LWT-Food Science and Technology**, v. 43, n. 4, p. 584-589, 2010.

YOSHIDA, C.M.P.; OLIVEIRA, E.N.; FRANCO, T.T. Chitosan tailor-made films: the effects of additives on barrier and mechanical properties. **Packaging Technology and Science**, v. 22, n. 3, p. 161-170, 2009.

ZHAI, M.; ZHAO, L.; YOSHII, F.; KUME, T. Study on antibacterial starch/chitosan blend film formed under the action of irradiation. **Carbohydrate Polymers**, v. 57, n. 1, p. 83-88, 2004.

ZHANG, D.; QUANTICK, C. Effect of chitosan coating on enzymatic browning and decay during postharvest storage of litchi (*Litchi chinensis* Sonn.) fruit. **Postharvest Biology Technology**, v. 12, p. 195-202. 1997.

ZHENG, L.; ZHU, J. Study on antimicrobial activity of chitosan with different molecular weights. **Carbohydrate Polymers**, v. 54, n. 4, p. 527-530, 2003.

**CAPÍTULO 2: EXTRAÇÃO, DESENVOLVIMENTO E
CARACTERIZAÇÃO DE MICROPARTÍCULAS DE
ANTOCIANINAS DO REPOLHO ROXO**

RESUMO

As antocianinas presentes no repolho roxo foram extraídas e o extrato hidroalcoólico foi concentrado. Os extratos concentrados foram secos por *spray drying* e o conteúdo de antocianinas foi determinado. As micropartículas obtidas a partir do extrato concentrado expuseram maior concentração dos pigmentos frente à determinação por pH diferencial e maior poder corante. As propriedades térmicas determinaram as micropartículas como potencial utilização na indústria de alimentos, uma vez que os resultados obtidos são característicos para micropartículas formadas em *spray dryer*. Além disso, adição de maltodextrina proporcionou elevada temperatura de transição vítrea aos extratos, contribuindo para a elevada estabilidade térmica revelada pelas propriedades térmicas dos extratos em pó.

1 INTRODUÇÃO

O repolho roxo (*Brassica oleracea* L. Var. *Capitata f. rubra*) é uma promissora fonte para obtenção de antocianinas na forma concentrada que podem ser utilizadas como corantes naturais para alimentos. Devido a presença das antocianinas, o extrato do repolho roxo apresenta coloração vermelha em pH ácido que tende ao azul a medida que o pH aumenta (DYRBY et al., 2001).

As antocianinas (ANT) - do grego *anthos* (flor) e *kyanos* (azul) - formam o grupo de pigmentos de maior abundância na natureza. São pigmentos naturais hidrossolúveis, de estrutura polifenólica, responsáveis pelas cores vermelho, azul e roxo de diversos vegetais. São pigmentos não tóxicos e não mutagênicos de origem natural podendo ser usado sem limitações com relação a quantidade (CAVALCANTI; SANTOS; MEIRELES, 2011; DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2010; JANIK et al., 2007; MARTINS et al., 2012; SANTOS; MEIRELES, 2009; WALTON et al., 2006; WROLSTAD, 2004). Atualmente, a indústria de alimentos utiliza, principalmente, os corantes sintéticos devido à estabilidade química e pureza elevada em relação a alguns corantes naturais. No entanto, devido aos efeitos nocivos à saúde humana, alguns destes aditivos alimentares não têm utilização recomendada para a indústria de alimentos (DELL GIOVINE; BOCCA, 2003; LOPES; QUADRI; QUADRI, 2006). Assim, as antocianinas são consideradas promissores corantes naturais alimentares em contrapartida ao potencial carcinogênico, mutagênico e alergênico associado ao uso dos corantes artificiais (LOPES; QUADRI; QUADRI, 2006). Porém, apresentam sensibilidade quando expostos a condições adversas de luz, oxigênio e calor. Considera-se que os extratos de antocianinas apresentam *shelf life* reduzido em contrapartida à sua potencial utilização como aditivo alimentar de origem natural.

Neste contexto, a estabilização de corantes como as antocianinas para utilização em processos industriais pode ser promovida pela utilização de técnicas de microencapsulação. Através da transformação de extratos aquosos em extratos secos, os pigmentos de antocianinas podem apresentar maior estabilidade físico-química e microbiológica, maior concentração dos compostos ativos e maior facilidade de manipulação (TEIXEIRA; BASSANI, 1997; OLIVEIRA; PETROVICK, 2009).

A microencapsulação pode ser descrita como uma técnica na qual um composto bioativo é encapsulado em um biopolímero que irá conferir proteção contra oxigênio, umidade, luz e outros fatores com o intuito de promover a estabilidade e facilitar a manipulação pela transformação de líquidos em pós e pela redução do peso do produto, facilitando o armazenamento e transporte (GHARSALLAOUI et al., 2007). Dentre as técnicas de encapsulação, o *spray drying* tem ampla utilização na indústria de alimentos por ser uma técnica de baixo custo e fácil operação, podendo ser conduzido em grande escala. É definido como um processo de secagem pela remoção de umidade através do rápido contato com o calor a baixa pressão (HASHIB et al., 2015). Basicamente, o *spray drying* consiste em três etapas: atomização, secagem e separação do pó obtido (MUJUMDAR, 2006). Durante a atomização, a solução de alimentação é transportada através de bomba peristáltica até o bico atomizador que dispersa o líquido em pequenas gotículas antes de atingir a câmara de secagem (BAKER, 1997). Dentro da Câmara de secagem, as gotículas entram em contato com o ar de secagem com elevada temperatura, que as transforma em pó instantaneamente. As micropartículas formadas são separadas no ciclone e coletadas na base em um frasco coletor (HELDMAN; HARTEL, 1997).

Os parâmetros do processo de secagem podem variar e com eles as propriedades dos pós obtidos também podem ser distintas. Por exemplo, a secagem de extratos contendo antocianinas geralmente é realizada em temperatura entre 130 a 180 °C, podendo, neste caso, afetar o teor de antocianinas no produto final. Ainda, através do controle da temperatura, efeitos distintos são gerados nos pós, acarretando em mudanças nas propriedades de umidade, densidade, tamanho da partícula, temperatura de transição vítrea, entre outros. Sendo que, são propriedades de importância na aplicação de pós: a solubilidade, temperatura de fusão (T_f) higroscopicidade e a temperatura de transição vítrea (T_g) (TELIS; MARTINEZ-NAVARRETE, 2010).

Maltodextrinas (MD) com diferentes graus de hidrólise (DE – dextrose equivalente) são comumente utilizadas como agente encapsulante, uma vez que apresentam elevada solubilidade em água, baixa viscosidade, pouco conteúdo de açúcares e, sobretudo, por não afetar a cor das soluções nas quais são adicionados. Essas propriedades fazem da MD um potencial ingrediente na indústria alimentar (AVALTRONI; BOUQUERAND; NORMAND, 2004; BHANDARI et al., 1997). A Goma Arábica (GA) obtida das árvores *Acacia senegal var.*

Senegal é o tipo mais comum dentre as gomas utilizadas. A ampla utilização da GA é devido à sua solubilidade em água e baixa viscosidade em comparação com outros polissacarídeos, boa característica emulsificante e natureza atóxica (TAHA et al., 2012). O ácido cítrico (AC) é usualmente empregado como conservador natural em extratos de antocianinas secos por *spray drying* (VALDUGA et al., 2007). No caso de extratos vegetais, a presença de açúcares pode ocasionar formação de pós com alta higroscopicidade, aumentando a adesão entre as partículas e diminuindo o rendimento do processo. Portanto, é fundamental a utilização de agentes carreadores com alto peso molecular como polímeros e gomas, visando facilitar o processo de secagem e as operações de transporte e armazenamento conforme desejado.

Em alimentos de teor de umidade baixo a intermediário, o estado físico do produto (estado vítreo ou elástico) é determinante das taxas de difusão dos reagentes, afetando assim a taxa de reações deteriorantes em alimentos, inclusive de degradação da cor (LEVINE; SLADE, 1992; SERRIS; BILIADERIS, 2001; TSIMIDOU; BILIADERIS, 1997).

A estabilidade de produtos secos tem sido atribuída à mobilidade molecular que só é permitida em presença de umidade. Sabe-se que a temperatura de transição vítrea (T_g) é altamente sensível à presença de umidade e é considerada uma temperatura de referência: abaixo da T_g , espera-se que o alimento seja estável, enquanto que acima desta temperatura, o alimento pode apresentar alterações em decorrência de processos físicos, químicos e enzimáticos possibilitados pela mobilidade das moléculas. A diferença entre a temperatura de armazenamento e a T_g ($T-T_g$) é considerada a faixa ideal para garantia de não deterioração de alimentos secos. Desta forma, agentes carreadores com maior estabilidade térmica, conseqüentemente, proporcionam maior estabilidade aos extratos fenólicos encapsulados (GRADINARU et al., 2003; SLADE; LEVINE, 1991).

A técnica utilizada para determinação da T_g em alimentos tem sido a calorimetria exploratória diferencial - do inglês, *Differential scanning calorimetry* (DSC), que em conjunto com a termogravimetria (TG) tem aplicação na caracterização das propriedades térmicas de pós constituídos por polímeros. As análises térmicas compõem um grupo de técnicas em que uma propriedade física de uma amostra é medida em função do tempo ou da temperatura enquanto a amostra é submetida a um programa controlado de temperatura (GOULA; ADAMOPOULOS,

2010; TONON et al., 2009; JAYA; DAS, 2004; YOUSEFI et al., 2011; IONASHIRO; GIOLITO, 1980).

Através das análises térmicas pode-se verificar possíveis interações entre os sistemas poliméricos e determinar parâmetros como a temperatura de transição vítrea (T_g), temperatura de fusão (T_f) e de cristalização (T_c), bem como a capacidade calorífica (C_p) e taxa de degradação térmica.

O objetivo deste trabalho é encapsular o extrato hidroalcolólico contendo antocianinas extraídas do repolho roxo em presença da maltodextrina e goma Arábica pela técnica de *spray drying*, afim de avaliar a proporção de biopolímeros adequada para obtenção de extrato com elevado teor de antocianinas e obter pós com características de aplicação à indústria de alimentos. Para isso, os extratos de antocianinas foram avaliados quanto ao teor de antocianinas e determinação dos parâmetros da cor antes e após a secagem. As propriedades físico-químicas de umidade, higroscopicidade e atividade de água foram estudadas e relacionadas às análises térmicas de DSC e TG, além da Microscopia Eletrônica de Varredura e da Espectroscopia na região do Infravermelho.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material

Amostras de Repolho roxo foram adquiridas em mercado local na cidade de Florianópolis, Santa Catarina, Brasil, no período de outubro de 2016. Para extração de antocianinas foi utilizado álcool etílico 90% (Vetec, Brasil), e ácido clorídrico (Merk, Brasil) para acidificação dos extratos. Na secagem dos extratos por *spray drying*, foi utilizada maltodextrina DE 25 (Sigma Aldrich, Brasil), goma Arábica (Vetec, Brasil) e ácido cítrico monohidratado (Synth, Brasil). Para produção das soluções tampão pH 1,0 e 4,5, foram utilizados cloreto de potássio (Nuclear, Brasil) e fosfato de sódio monobásico (Vetec, Brasil). Os reagentes utilizados na execução deste trabalho foram todos de grau analítico.

2.2 Extração de antocianinas do repolho roxo

A extração do conteúdo antociânico presente no repolho roxo, foi realizada em presença de etanol (EH) e o extrato foi concentrado (EC). Após obtenção, os extratos EH e EC contendo as antocianinas do repolho roxo foram mantidos sob refrigeração (8 ± 2 °C) em frascos âmbar até posterior utilização.

Considerando o conteúdo contendo ineditismo nesde trabalho, detalhes das formulações foram preservados para apresentar apenas na publicação dos resultados do projeto.

2.2.1 Caracterização do extrato

A determinação do teor de antocianinas foi realizada através do método do pH diferencial (GIUSTI; WROLSTAD, 2001). Os extratos contendo antocianinas foram pesados em balões volumétricos e em seguida o conteúdo do balão foi diluído com as soluções tampão de pH 1,0 e pH 4,5. Após homogeneização da solução, estas foram mantidas em repouso durante 25 minutos sob o abrigo da luz. Os extratos foram preparados em triplicata para cada uma das soluções tampão. Em seguida, a absorvância das soluções contendo os extratos foi determinada (SP2000 UV, BEL-Photonics, Brasil) nos comprimentos de onda de 510 e 700 nm, utilizando água destilada como branco.

A quantificação do teor de antocianinas foi determinada através da equação descrita abaixo (Equação 1 e 2) e o resultado expresso em equivalente da antocianina principal, no caso, cianidina-3-glucosídeo, principal antocianina presente no repolho roxo ($\text{mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$).

$$A = (A_{510} - A_{700})_{pH1,0} - (A_{510} - A_{700})_{pH4,5} \quad (1)$$

$$AM = \frac{A \cdot PM \cdot fd \cdot 100}{\varepsilon \cdot l} \quad (2)$$

Onde, PM é o peso molecular ($449,2 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$); fd é o fator de diluição, e ε é a absorvidade molar da cianidina-3-glucosídeo ($26,900 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$).

2.3 Secagem dos extratos

2.3.1 Preparo das soluções de alimentação

Para obtenção de extratos secos de repolho roxo foram produzidas soluções de alimentação contendo extrato (EH) e extrato concentrado (EC), maltodextrina, goma Arábica e ácido cítrico, com base em ensaios anteriores, e que foram mantidas sob agitação (Dist, Brasil) até completa homogeneização.

2.3.2 Secagem

O processo de secagem foi realizado em *spray dryer* de escala laboratorial (Buchi B-290 mini *Spray Dryer*, Suíça). As soluções de alimentação contendo extrato de repolho (EH e EC) foram mantidas sob agitação e introduzidas na câmara de secagem.

A partir do extrato de antocianinas provenientes do repolho roxo foram obtidas as micropartículas EH25/25; EH35/15 e EH50/0. Da mesma forma, o extrato de antocianinas do repolho roxo concentrado em rotaevaporador originou as micropartículas EC25/25; EC35/15; ER50/0. Após secagem, as micropartículas de antocianinas do repolho roxo foram coletadas na base do ciclone e homogeneizadas com espátula. As amostras foram transferidas para frascos Falcon estéreis e armazenadas a $-8 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ ao abrigo da luz.

O processo de secagem foi caracterizado quanto ao rendimento (m/m) dos pós obtidos em relação ao teor de sólidos adicionados na solução de alimentação.

2.4 Caracterização das micropartículas de antocianinas

2.4.1 Teor de antocianinas após secagem

Os pós contendo as micropartículas de antocianinas do repolho roxo foram caracterizadas quanto ao teor de antocianinas pelo método de pH diferencial conforme descrito no item 2.2.1. Os extratos secos foram diluídos na proporção (1:10), adequada à faixa de absorção desejada entre 0,100 - 1,200 nos comprimentos de onda utilizados.

2.4.2 Determinação da cor dos extratos

Os parâmetros da cor dos extratos foram determinados em colorímetro Chroma Meter CR 400 (Konica Minolta, Japão). Os parâmetros de cor (L^* , a^* , b^*) dos extratos EH e EC foram determinados utilizando cubetas de quartzo. Foram realizadas três medições dos parâmetros por amostra.

Os extratos secos EC25/25; EC35/15; EC50/0 e EH25/25; EH35/15; EH50/0 foram avaliados quanto a variação da cor a partir dos extratos de origem, além da determinação dos parâmetros L^* , a^* , b^* . Para a medida da cor, os pós foram acomodados em placas de petri e analisados sobre placa padrão de cor branca ($L^* = 97,40$; $a^* = 0,10$; $b^* = 2,11$). Os extratos foram avaliados quanto a diferença total de cor (ΔE^*) e suas coordenadas cilíndricas (Chroma - C^* intensidade da cor e Hue - H^* tonalidade ou cor propriamente) determinadas. Para determinação da diferença total de cor foi utilizada a Equação 3 e para determinar as coordenadas cilíndricas, as Equações 4 e 5.

$$\Delta E^* = \sqrt{(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2} \quad (3)$$

Onde, $\Delta L^* = L^*_{\text{extrato de origem}} - L^*_{\text{analisado}}$; $a^*_{\text{extrato de origem}} - a^*_{\text{analisado}}$; $b^*_{\text{extrato de origem}} - b^*_{\text{analisado}}$. Controle corresponde ao extrato líquido a ser comparado (EH ou EC).

$$C^* = \sqrt{(a^*)^2 + (b^*)^2} \quad (4)$$

$$H^* = \arctan \frac{b^*}{a^*} \quad (5)$$

Sendo que, para todas as determinações, L^* é determinada como a luminosidade dos extratos, a^* e b^* são os parâmetros da cromaticidade. Podendo L^* variar de 0 a 100 (0 = preto; 100 = branco), e a^* e b^* entre -100 e +100 ($a < 0$ = verde; $a > 0$ = vermelho; $b < 0$ = azul; $b > 0$ = amarelo), $C^* = 0$ = cinza, e $H^* = 0^\circ$ = vermelho; 90° = amarelo; 180° = verde; 270° = azul.

2.4.3 Teor de umidade

O teor de umidade dos pós obtidos por *spray drying* foram determinados por gravimetria em secagem direta em estufa a 105 ± 1 °C (TE-395, Tecnal, Brasil) até peso constante (AOAC, 1996).

2.4.4 Atividade de água

A atividade de água (Aa) das amostras foi analisada no equipamento Aqualab 4TE (Degagon Devices Inc., São Paulo, Brasil), após prévia estabilização das amostras a temperatura ambiente (25 °C) por 30 minutos.

2.4.5 Higroscopicidade

A higroscopicidade dos pós foi determinada de acordo com metodologia proposta por Cai e Corke (2000), com algumas modificações. Amostras de aproximadamente 1 g foram colocadas em frasco hermético contendo solução saturada de NaCl (75,3%) e mantidas a 25 °C. Após atingir equilíbrio, as amostras foram pesadas e a higroscopicidade expressa como gramas de umidade absorvida por 100 g de amostra em base seca ($\text{g} \cdot 100 \text{g}^{-1}$).

2.4.6 Morfologia das partículas

Os extratos obtidos após secagem em *spray dryer* foram analisados por microscopia eletrônica de varredura (MEV), de acordo

com metodologia proposta por Rosenberg e Young (1993). As micropartículas foram fixadas em um suporte metálico de cobre (*stubs*) com auxílio de uma fita dupla face de carbono e recobertas com uma fina camada de ouro em recobridora a vácuo Leica EM SCD500 (Leica, EUA).

A visualização foi realizada em aumentos de 100 a 1500 vezes, em microscópio eletrônico de varredura JEOL modelo JSM-6390LV (Jeol, Tóquio, Japão), com voltagem de excitação de 10 kV. E o tamanho médio das partículas determinado pelo *software* livre *Image Processing and Analysis in Java - ImageJ* (*National Institutes of Health*, EUA).

2.4.7 Análises térmicas

A análise de termogravimetria (TG) foi realizada em termobalança TGA-50 (Shimadzu Corporation, Japão) na faixa de temperatura de 30 a 600 °C, em cadinho de platina com aproximadamente 4 mg de amostra, atmosfera dinâmica de nitrogênio (50mL.min⁻¹) e razão de aquecimento de 10 °C.min⁻¹.

As curvas de calorimetria exploratória diferencial (DSC) foram obtidas em equipamento MC-DSC (TA Instruments, EUA), acoplado a um analisador térmicos TA2000 (TA Instruments, EUA). Foram utilizadas cápsulas de aço Hastelloy hermeticamente fechadas contendo aproximadamente 2 mg de amostra sob atmosfera dinâmica de nitrogênio (50 mL.min⁻¹), com razão de aquecimento de 2 °C.min⁻¹, na faixa de temperatura de -20 a 140 °C.

2.4.8 Espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier (IV)

A espectroscopia no IV - do inglês *Fourier transform infrared spectroscopy* (FTIR) - foi realizada para observar interações estruturais nos filmes. Os espectros no IV foram obtidos em equipamento FTIR Frontier (Perkin Elmer, Brasil) na região entre 4000 e 600 cm⁻¹ com resolução de 4 cm⁻¹, com 32 *scans* em média. Todas as leituras foram realizadas a temperatura ambiente.

2.5 Análise estatística

Os dados obtidos foram expressos com médias e desvio padrão das determinações realizadas em triplicata. Os resultados foram submetidos à análise de variância e a comparação de médias foi realizada pelo Teste de Tukey com nível de significância de 5%, utilizando-se o programa Statistical Analysis Software - SAS, versão 10 (SAS Institute, Inc.; Cary, N.C.).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Teor de antocianinas

O extrato de repolho roxo concentrado tem maior teor de antocianinas ($50,76 \pm 1,13 \text{ mg} \cdot 100^{-1} \text{g}$) do que o extrato hidroalcoólico ($31,14 \pm 2,33 \text{ mg} \cdot 100^{-1} \text{g}$). Os valores obtidos para o teor de antocianinas são semelhantes aos encontrados na literatura (Tabela 1) (BRITO et al., 2007; CARVALHO et al., 2016; JARDIM; COUTINHO, 2009). Os resultados apresentados sugerem que o processo de extração foi eficiente, apresentando altos teores de antocianinas nos extratos EH e EC. A concentração de extratos por evaporação tem sido utilizada eficientemente para diversos compostos bioativos, dentre eles as antocianinas (LAOKULDILOK; KANHA, 2015; FLORES; SINGH; KONG, 2014; CARVALHO et al., 2016).

A quantidade de antocianinas em extratos de repolho roxo pode variar, dentre outros fatores com cultivo e com a maturidade dos frutos. Em geral, o conteúdo total de antocianinas varia entre 20 mg a 2 g por cada 100 g de frutos (DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2010). Além da fonte de obtenção, o teor de antocianina dos extratos é relacionado ao grau de extração, que por sua vez, depende de diversos fatores como a relação entre solvente e massa de amostra, o tipo do solvente empregado, o pH e a utilização de ácidos, bem como a temperatura em que se realiza o processo (PARK et al., 2014).

Tabela 1 – Teor de antocianinas monoméricas expressas em $\text{mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$ e rendimento (%) do processo de secagem

	Antocianinas ($\text{mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$)	Rendimento (%)
EH	$31,14 \pm 2,33^{\text{B}}$	-
EH25/25	$71,55 \pm 2,57^{\text{d}}$	55,94
EH35/15	$53,27 \pm 1,16^{\text{e}}$	56,11
EH50/0	$53,60 \pm 1,42^{\text{d,e}}$	66,61
EC	$50,76 \pm 1,13^{\text{A}}$	-
EC25/25	$94,10 \pm 9,43^{\text{a,b}}$	54,49
EC35/15	$108,46 \pm 9,57^{\text{a}}$	44,07
EC50/0	$88,34 \pm 9,61^{\text{b,c}}$	67,07

Valores apresentados como a média \pm desvio padrão das amostras em triplicata. Letras minúsculas e maiúsculas diferentes indicam diferença significativa ($p < 0,05$) quando analisadas pelo teste de Tukey.

O processo de secagem dos extratos hidroalcoólico e concentrado por *spray drying* resultou na obtenção de pós de cor violeta e tamanho uniforme das partículas formadas. O rendimento (m/m) (Tabela 1) das micropartículas, variando entre 54 e 67 %, comprova a adição de sólidos à solução de alimentação. Valores de rendimento para secagem por *spray drying* superiores a 40 % do teor de sólidos na solução de alimentação são considerados excelentes e viabilizam a utilização desta tecnologia.

O rendimento obtido em equipamentos *spray-dryers* pode também ser afetado pela estrutura, tamanho e fabricante. Vale ressaltar, que o equipamento utilizado é de escala de bancada laboratorial.

Os resultados obtidos para os extratos de antocianinas após a secagem (Tabela 1) apresentam maior concentração dos pigmentos com relação aos extratos EH e EC. Assim, considera-se eficaz a utilização destes extratos como corante alimentar, pelo alto teor de antocianinas, bem como o poder corante. Ainda, os resultados sugerem que a utilização de baixas temperaturas foi essencial para manutenção das antocianinas após a secagem, favorecendo a retenção destas às micropartículas (CAI; CORKE, 2000; CARVALHO et al., 2016; FERRARI et al., 2012; TONON; BRABET; HUBINGER, 2009), ademais, as antocianinas podem ser consideradas estáveis à temperatura utilizada e quando utilizado água como solvente (VALDUGA et al., 2007; ROCKENBACH et al., 2008; ZARDO, 2014). Além disso, a secagem por *spray drying* causa menor perda de antocianinas quando comparado a técnicas como a liofilização e secagem a vácuo, uma vez que utiliza de menor tempo para secagem (HORSZWALD; JULIEN; ANDLAUER, 2013).

Em geral, as micropartículas obtidas a partir do EC apresentaram maior teor de antocianinas. Os extratos EC25/25 e EH25/25 apresentaram maior teor de antocianinas quando comparados aos seus semelhantes sugerindo a formulação MD/GA 25/25 como a melhor partícula obtida, com relação ao teor de antocianinas. Foram encontrados resultados semelhantes no estudo da secagem de antocianinas presentes na amora preta (FERRARI et al., 2012).

3.2 Determinação da cor dos extratos

Na Tabela 2 são apresentados os parâmetros de cor L^* , a^* , b^* para os extratos de antocianinas do repolho roxo. Os extratos EH e EC apresentaram cor distinta, uma vez que o EC tem o conteúdo de antocianinas concentrado e pode apresentar escurecimento em

decorrência do aquecimento no processo de evaporação. Assim, os parâmetros L^* e a^* têm valores maiores no EH devido sua maior transparência e por apresentar cor vermelha mais intensa do que o EC. Da mesma forma, o Chroma (C^*) para o EH é mais elevado do que em EC, pois esse apresenta a intensidade da cor característica no extrato.

Tabela 2 – Propriedades da cor dos extratos de antocianinas do repolho roxo.

Extrato	L^*	a^*	b^*	ΔE	Chroma	Hue °
EC	17,26 ± 0,01 ^c	2,55 ± 0,01 ^c	1,41 ± 0,01 ^c	-	2,23	26,56
EC25/25	63,31 ± 1,03 ^a	41,01 ± 0,67 ^a	8,48 ± 0,47 ^a	60,71	41,8	11,04
EC35/15	62,89 ± 0,08 ^a	42,62 ± 1,46 ^a	7,79 ± 0,86 ^a	60,50	42,6	9,46
EC50/0	65,32 ± 0,63 ^c	41,27 ± 1,13 ^a	6,66 ± 0,40 ^a	62,05	41,4	8,32
EH	21,09 ± 0,01 ^d	22,13 ± 0,11 ^d	8,03 ± 0,95 ^a	-	23,4	19,98
EH25/25	70,67 ± 0,12 ^f	42,39 ± 1,10 ^a	3,94 ± 0,25 ^b	53,87	42,1	4,08
EH35/15	74,38 ± 0,10 ^b	39,46 ± 0,67 ^{a,b}	3,19 ± 0,16 ^{b,c}	56,33	39,1	4,39
EH50/0	73,07 ± 0,18 ^b	36,45 ± 1,73 ^b	4,01 ± 0,23 ^b	54,15	36,2	6,34

Valores apresentados como a média ± desvio padrão das amostras em triplicata. Letras minúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa ($p < 0,05$) quando analisadas pelo teste de Tukey.

Em geral, os extratos não apresentaram diferença no ΔE com relação a proporção de MD e GA. Sendo que os extratos obtidos a partir do EC apresentaram menor L^* , o que corrobora com a cor mais escura apresentada por estes em relação aos EH. A expressão de cor mais escura nos extratos do EC são indicativo da maior concentração de antocianinas nessas amostras e pode ser decorrente do processo de concentração do extrato. Sob a influência do calor, pode-se esperar a formação de antocianinas poliméricas decorrentes de uma possível degradação (AHMED et al., 2010; TONON; BRABET; HUBINGER, 2009). A presença da MD promove o aumento do L^* por se apresentar sob a forma de pó e coloração branca (FERRARI et al., 2012; KHA et al., 2010; TONON; BRABET; HUBINGER, 2009).

Os C^* próximo a zero no EC é relativo à maior concentração de pigmentos e sólidos presentes na solução, favorecendo a expressão de cor mais próximo ao bordô. Ainda, as micropartículas apresentaram valores para C^* maior do que nos extratos, uma vez que a adição dos agentes carreadores MD e GA favorecem o aparecimento da tonalidade vermelha, distanciando-se da cor bordô inicialmente apresentada nos extratos.

Os resultados de H^* ($\approx 10^\circ$) estão localizados no primeiro quadrante ($+a^*$ e $+b^*$), muito próximo à região do vermelho em 0° . A

avaliação dos parâmetros de cor para os extratos de antocianinas e as micropartículas foi relevante, uma vez que os resultados obtidos remetem à coloração vermelha, e são indicativo da presença de antocianinas (JIMÉNEZ-AGUILAR et al., 2011).

3.3 Teor de umidade

Os valores para o teor de umidade dos extratos de antocianinas são apresentados na Tabela 3.

Tabela 3 – Teor de umidade dos extratos de antocianinas

Extrato	Umidade (g.100g ⁻¹)
EC25/25	16,38 ± 0,40 ^a
EC35/15	16,17 ± 1,26 ^a
EC50/0	16,42 ± 0,27 ^a
EH25/25	10,58 ± 0,52 ^b
EH35/15	6,25 ± 0,28 ^c
EH50/0	6,73 ± 0,02 ^c

Valores apresentados como a média ± desvio padrão. Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa ($p < 0,05$) quando analisadas pelo teste de Tukey.

Pode-se observar um aumento no conteúdo de água presente nas micropartículas obtidas a partir do extrato concentrado. O teor de umidade dos pós está relacionado aos parâmetros utilizados no processo de secagem. Baixas temperaturas do ar de secagem tendem a gerar pós com maior teor de umidade quando a MD é empregada como agente carreador, em relação a outros polissacarídeos. Assim, a transferência de calor para a amostra em contato com o ar de secagem na câmara é menor, o que resulta numa evaporação da água mais lenta e conseqüente aumento na umidade (FERRARI et al., 2012).

Em geral, micropartículas produzidas a baixas temperaturas têm tendência à aglomeração, graças ao teor de umidade. Tal comportamento pode ser benéfico no acondicionamento dos pós e estabilidade dos compostos bioativos, uma vez que a aglomeração diminui a exposição dos pós ao oxigênio, luz e outros fatores que podem provocar degradação (QUEK; CHOK; SWEDLUND, 2007).

A MD e a GA têm sido relatadas por aumentar a umidade em extratos secos por *spray drying* quando em comparação com outros agentes carreadores (CARVALHO et al., 2016).

3.4 Atividade de água

A atividade de água (Aa) das micropartículas dos extratos de antocianinas (Tabela 4) está dentro da faixa normalmente encontrada para produtos atomizados (TONON; BRABET; HUBINGER, 2009).

Tabela 4 – Atividade de água dos extratos de antocianinas após secagem

Extrato	Aa
EC25/25	0,63 ± 0,02 ^c
EC35/15	0,64 ± 0,02 ^c
EC50/0	0,55 ± 0,01 ^b
EH25/25	0,52 ± 0,02 ^{ab}
EH35/15	0,48 ± 0,01 ^a
EH50/0	0,48 ± 0,02 ^a

Valores apresentados como a média ± desvio padrão. Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa ($p < 0,05$) quando analisadas pelo teste de Tukey.

Os valores obtidos para a Aa dos pós de extratos antocianos são considerados intermediários, podendo ocorrer pouca ou nenhuma chance de crescimento microbiano. Ferrari et al. (2012) relacionam a utilização de baixas temperaturas na atomização com fator que contribui para o aumento da Aa de pós obtidos por *spray drying*.

Ainda, a estabilidade das antocianinas é favorecida em valores de Aa próximos de 0,63, indicando que os pigmentos utilizados são estáveis na Aa obtida para as micropartículas (DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2010).

3.5 Higroscopicidade

O comportamento das micropartículas de extratos antocianos acondicionadas em umidade relativa de 75,3% a 25 °C durante 7 dias é apresentado na Tabela 5. Os resultados obtidos sugerem que não houve diferença significativa ($p < 0,05$) na higroscopicidade dos pós devido à adição de GA. Entretanto, as formulações obtidas a partir do EH se diferenciam daquelas contendo EC.

Os extratos antocianos obtidos neste estudo podem ser classificados como pós com média higroscopicidade, o que indica que os pós são de fácil armazenamento e manuseio (AIDOO et al., 2014). Ainda,

de acordo com os resultados, a eficácia dos agentes carreadores pode ser comprovada (DA SILVA CARVALHO et al., 2016). Sendo que, a MD é considerada um dos materiais mais utilizados para a secagem por *spray drying* devido a sua eficiência e baixo custo (DE SOUZA et al., 2015; TONON; BRABET; HUBINGER, 2009).

Tabela 5 – Higroscopicidade dos extratos de antocianinas após secagem

Extrato	Higroscopicidade (g.100g⁻¹)
EC25/25	22,49 ± 2,55 ^a
EC35/15	21,25 ± 0,31 ^a
EC50/0	25,05 ± 0,98 ^a
EH25/25	12,89 ± 2,06 ^b
EH35/15	14,01 ± 0,92 ^b
EH50/0	10,66 ± 1,07 ^b

Valores apresentados como a média ± desvio padrão. Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa ($p < 0,05$) quando analisadas pelo teste de Tukey.

Vale ressaltar, que a higroscopicidade é uma propriedade que pode ser influenciada por parâmetros empregados no processo de secagem como a temperatura e tempo de exposição na câmara de secagem, concentração e composição da solução de alimentação, atomização da amostra e tamanho das partículas formadas (CAI; CORKE, 2000; JAYA; DASS, 2004; RODRÍGUEZ-HERNÁNDEZ et al., 2005).

As micropartículas contendo EC de antocianinas (EC25/25, EC35/15, EC 50/0) apresentaram maior higroscopicidade (Tabela 5). A maltodextrina utilizada na obtenção dos extratos secos por *spray drying* possui DE 25. Assim, por apresentar grau de hidrólise elevado, contém mais cadeias curtas com maior quantidade de grupos hidrofílicos, acarretando na formação de pós mais higroscópicos. Portanto, a adsorção de água pelas micropartículas pode estar associada à presença de grupos hidrofílicos na estrutura de cada agente carreador. Uma vez que, polissacarídeos como GA e MD possuem elevado número de grupos hidrofílicos, e conseqüentemente, absorvem mais facilmente a umidade presente no ambiente (CAI; CORKE, 2000; CARVALHO et al., 2016).

Da mesma forma, as micropartículas derivadas do EC apresentaram os maiores valores nas propriedades de teor de umidade e de atividade de água. Os valores elevados são referentes a alta higroscopicidade dos pós. Os agentes carreadores empregados na obtenção das micropartículas apresentaram maior facilidade de formação de ligações

com a água livre presente na atmosfera de acondicionamento das partículas contendo o EC.

3.6 Morfologia das partículas

As micropartículas contendo antocianinas provenientes do repolho roxo apresentaram aparência e distribuição de tamanho uniformes. O tamanho das partículas formado é apresentado na Tabela 6.

As amostras não apresentaram diferença significativa ($p < 0,05$) com relação a distribuição de tamanho quanto a adição de goma Arábica. As formulações contendo extrato concentrado apresentaram formação de partículas de maior tamanho. O que pode ser explicado pela maior higroscopicidade apresentadas por estes pós, uma vez que partículas higroscópicas tendem a se aderir umas às outras, resultando na observação das micropartículas com maior tamanho. A variação do tamanho das partículas ocorre pela aglomeração das partículas formadas, graças a maior higroscopicidade dos pós. Há tendência para que os pós de secagem contendo goma Arábica apresentem a formação de aglomerados devido a higroscopicidade (CARVALHO et al., 2016).

Tabela 6 – Distribuição do tamanho médio das micropartículas obtidos por MEV

Micropartícula	Tamanho de Partícula (μm)
EC25/25	$17,51 \pm 7,76^a$
EC35/15	$15,79 \pm 8,05^a$
EC50/0	$13,31 \pm 5,02^a$
EH25/25	$12,53 \pm 4,68^b$
EH35/15	$15,58 \pm 10,00^a$
EH50/0	$17,12 \pm 6,45^a$

Valores apresentados como a média \pm desvio padrão. Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa ($p < 0,05$) quando analisadas pelo teste de Tukey.

As amostras não apresentaram diferença significativa ($p < 0,05$) com relação a distribuição de tamanho quanto a adição de goma Arábica. As formulações contendo extrato concentrado apresentaram formação de partículas de maior tamanho. O que pode ser explicado pela maior higroscopicidade e atividade de água apresentadas por estes pós, uma vez que partículas higroscópicas tendem a se aderir umas às outras, resultando na observação das micropartículas com maior tamanho. A variação do tamanho das partículas ocorre pela aglomeração das partículas formadas,

graças à maior higroscopicidade dos pós. Há tendência para que os pós de secagem contendo goma Arábica apresentem a formação de aglomerados devido à higroscopicidade (CARVALHO et al., 2016). Ainda, a maior higroscopicidade pode gerar o intumescimento da micropartícula e consequentemente, ocasionar o aumento de tamanho.

Em geral, as partículas apresentam tamanho característico para secagem em *spray dryer* (0,2-5000 µm). O teor de sólidos adicionado à solução de alimentação tem relação ao tamanho das partículas formadas, pois, quanto maior a adição de sólidos à solução de alimentação, menor o tamanho das partículas formadas.

Além disso, utilização de baixas temperaturas do ar de secagem, como a utilizada neste trabalho, acarreta no encolhimento da partícula durante o processo, o que corrobora com os resultados obtidos (TONON; BRABET; HUBINGER, 2009; NIJDAM; LANGRISH, 2006; FERRARI et al., 2012).

De modo geral, as partículas exibiram formato esférico e são caracterizadas pela diferença de tamanho e superfície lisa (Figuras 1 e 2). Há presença de poucas partículas com característica de formação de parede murcha ou enrugada. A presença de micropartículas de morfologia não esférica pode ocorrer em processos de secagem ocorridos sob temperatura baixa. As depressões que aparecem na superfície das micropartículas são formadas devido à contração das partículas durante a secagem e o resfriamento. Além disso, a extensão das depressões observadas em micropartículas produzidas por *spray drying* é função da natureza do agente carreador utilizado, sendo significativa naquelas que possuem cobertura de polissacarídeos (TONON; BRABET; HUBINGER, 2009).

Pode-se relacionar, também, a formação de partículas mais uniformes, bem como maior quantidade de partículas, às formulações que apresentaram teores elevados de antocianinas.

Figura 1 – Micrografias por MEV dos extratos EC25/25; EC35/15 e EC50/0 nos aumentos 100, 500 e 1,500x

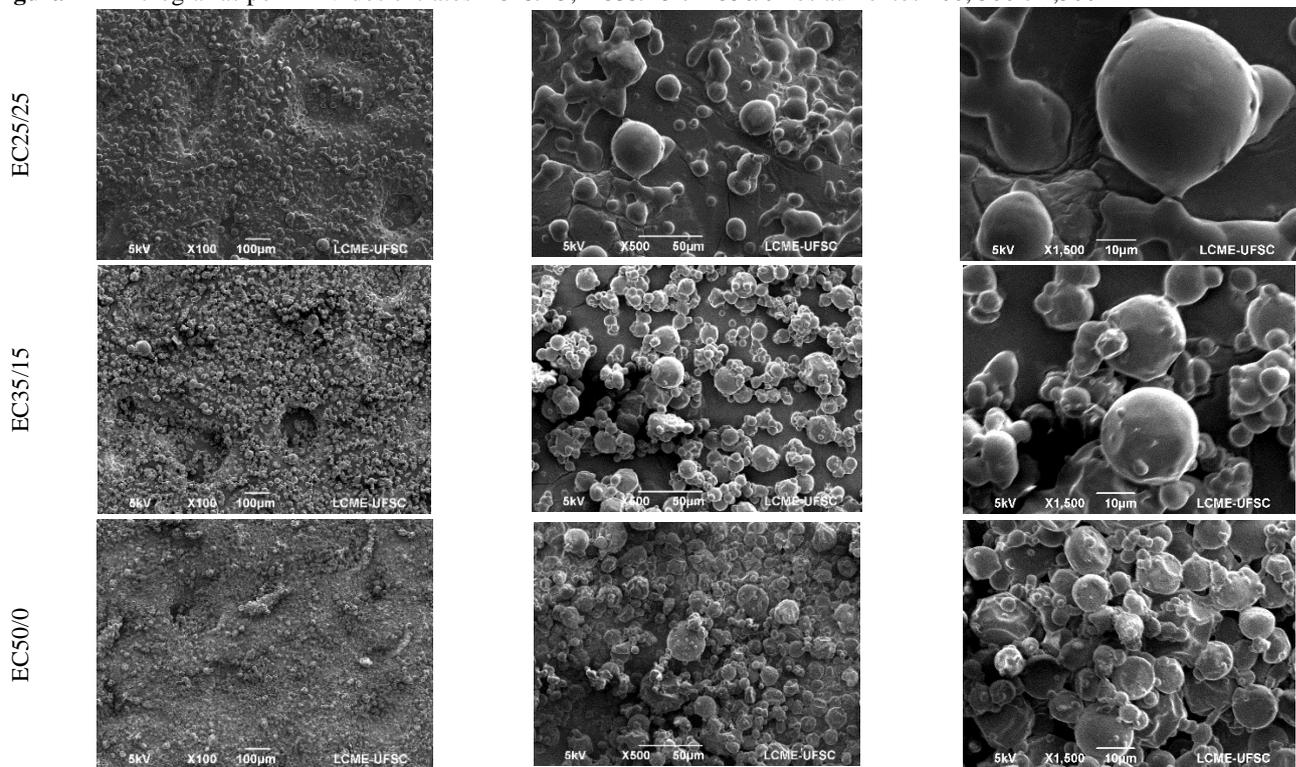
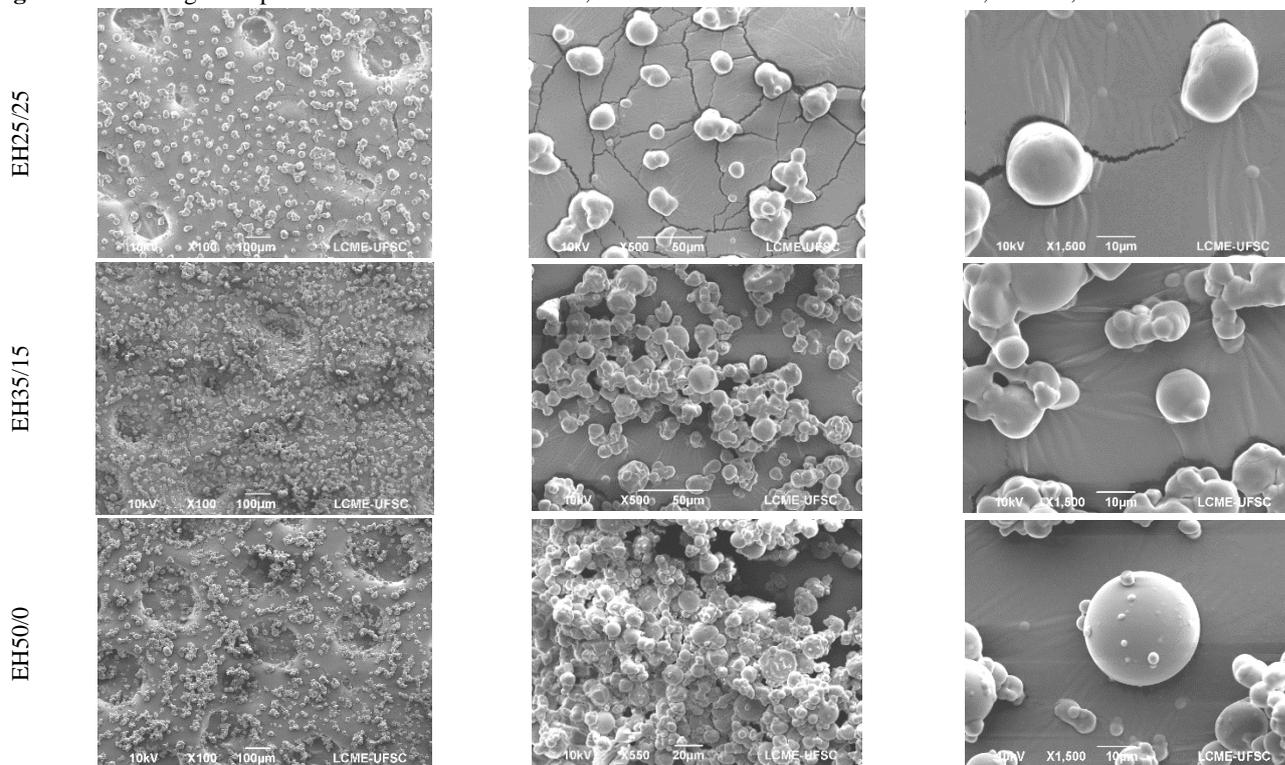


Figura 2 – Micrografias por MEV dos extratos EH25/25; EH35/15 e EH50/0 nos aumentos 100, 500 e 1,500x

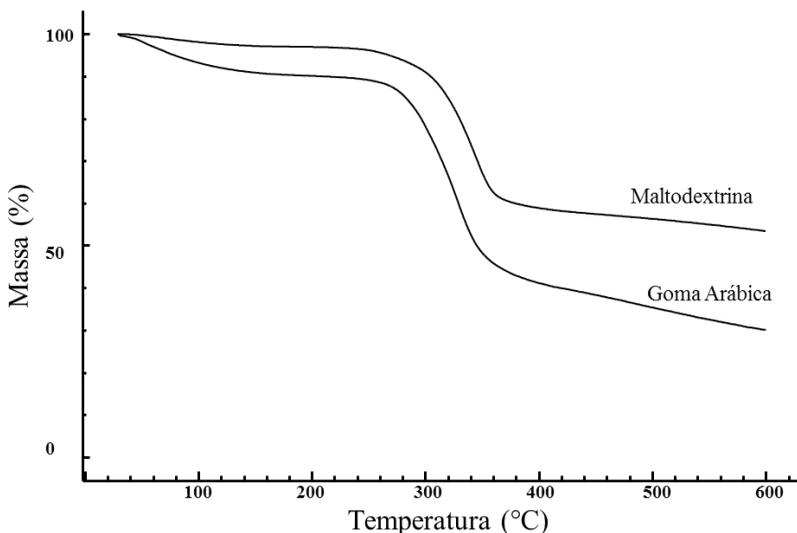


3.7 Análises térmicas

A análise de termogravimetria (TG) é uma técnica útil na avaliação da estabilidade térmica de materiais poliméricos através da perda de peso em função da temperatura (MARTINS; CERQUEIRA; VICENTE, 2012). As curvas de TG obtidas para os extratos de antocianinas secos por *spray drying* são apresentados nas Figuras 3, 4, 5 e na Tabela 7.

As curvas de TG referentes aos polissacarídeos (Figura 3) apresentam eventos isolados de perda de massa de acordo com a sua composição. Conforme apresentado nas figuras, os extratos secos tiveram comportamento semelhante aos polissacarídeos de origem, expondo apenas um evento na perda de massa.

Figura 3 – Curvas de TG dos polissacarídeos maltodextrina e goma Arábica *in bulk*



A Tabela 7 apresenta os dados de temperatura de degradação térmica para os componentes dos extratos apresentados nas curvas de TG a seguir.

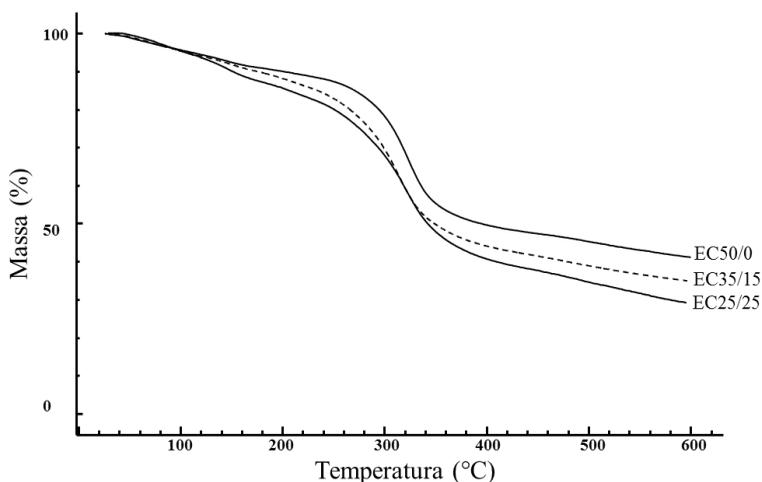
Tabela 7 – Parâmetros das transições térmicas das micropartículas contendo antocianinas do repolho roxo

	Mid Point (°C)	Onset (°C)	Endset (°C)	Weight loss (mg)	Weight loss (%)
EC25/25	309,74	293,59	340,16	-1,40	-36,72
EC35/15	311,41	296,79	336,04	-2,04	-30,02
EC50/0	317,11	299,04	342,92	-2,24	-34,10
EH25/25	309,91	293,52	337,89	-2,18	-31,22
EH35/15	309,72	289,09	338,57	-2,44	-55,11
EH50/0	328,37	312,32	351,15	-2,08	-42,13
Goma Arábica	317,63	292,35	347,23	-1,87	-46,58
Maltodextrina	333,47	314,98	358,34	-1,97	-35,09

As micropartículas de antocianinas apresentaram comportamento semelhante entre si (Figura 4). Os extratos EC25/25, EC35/15 e EC50/0 apresentaram degradação térmica a uma temperatura menor em comparação à MD e GA. Quando há maior adição de MD a temperatura necessária para a degradação é mais elevada.

A perda de massa é maior no extrato contendo igual proporção de maltodextrina e goma Arábica (EC25/25 = -36,72 %) e menor perda de massa no extrato contendo pouca goma Arábica (EC50/0 = -34,10 %). O EC35/15 é considerado o extrato com menor perda de massa decorrente da degradação térmica de seus componentes. A presença de goma Arábica acarreta na diminuição da temperatura necessária para degradação térmica, assim ocasionando maior perda de massa nas formulações nas quais está presente.

Figura 4 – Curvas de TG dos extratos EC25/25, EC35/15 e EC50/0

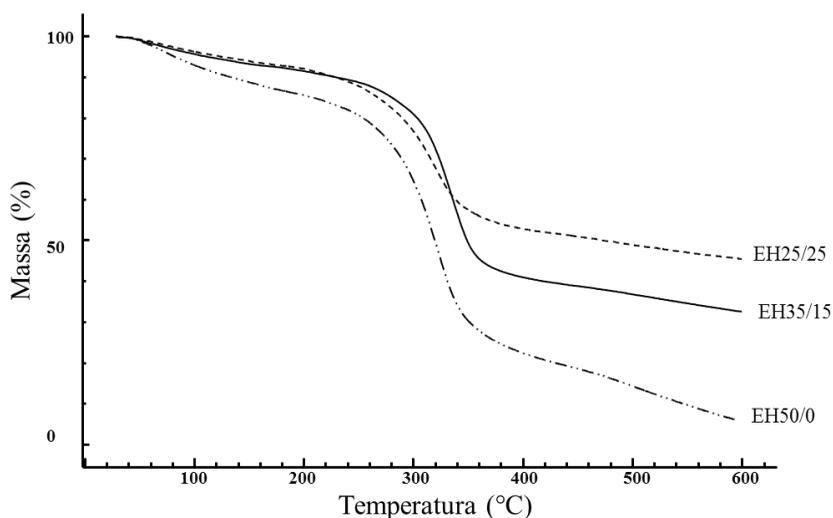


A Figura 5 expõe nas curvas de TG para os extratos EH25/25, EH35/15 e EH50/0. Os extratos EH25/25 e EH35/15 apresentaram valores para temperatura de degradação semelhantes (EH25/25 = 309,91; EH35/15 = 309,72), e EH50/0 tem início de degradação em temperatura

mais elevada, o que pode ser explicado pela presença da MD em maior quantidade.

O extrato EH50/0 é caracterizado por apresentar maior estabilidade térmica, pois apresenta menor perda de massa, indicando que a interação entre os componentes utilizados na secagem do extrato é benéfica.

Figura 5 – Curvas de TG dos extratos EH25/25, EH35/15 e EH50/0



A partir das curvas de DSC é possível confirmar o aprisionamento de um composto ativo em uma matriz polimérica, bem como possíveis interações que ocorrem entre ambos, através de deslocamentos de picos de fusão, cristalização ou demais transições térmicas. Ainda, é um método amplamente utilizado por necessitar de pouca amostra e prover resultados rápidos na caracterização de sistemas multicomponentes como nas micropartículas (GIORDANO; NOVAL; MOYANO, 2001).

A Figura 6 apresenta as curvas de DSC dos polissacarídeos utilizados na obtenção das micropartículas de antocianinas. As endogramas obtidas para as micropartículas de antocianinas sugerem que

todos os extratos sofreram interação no momento da atomização, uma vez que apresentam comportamento distinto dos endogramas dos polissacarídeos.

É possível observar a diminuição da temperatura de transição vítrea dos extratos secos com relação a MD, GA e o ácido cítrico adicionados à formulação. Comprovando a interação entre os componentes, uma vez que, a MD apresenta T_g em 66,18 °C e a GA em 39,66 °C. O comportamento exibido pelos polímeros MD e GA estão de acordo com os dados encontrados na literatura. Carvalho et al. (2016) obtiveram valores de T_g de 78,40 °C e de 37,30 para MD de DE 20 e 30, respectivamente.

As micropartículas apresentaram distintos valores de T_g de acordo com a proporção dos agentes carreadores utilizados. Os extratos EC25/25, EC35/15 e EC50/0 (Figura 7) apresentaram T_g de 37,00; 37,17; e 37,89 °C, respectivamente. As temperaturas de fusão para os referidos extratos foram, 95,17; 88,84; e 86,50 °C. Tais valores estão em conformidade com os dados obtidos para os polissacarídeos *in bulk*.

Figura 6 – Curvas de DSC dos polissacarídeos MD e GA, e do ácido cítrico utilizados nos extratos

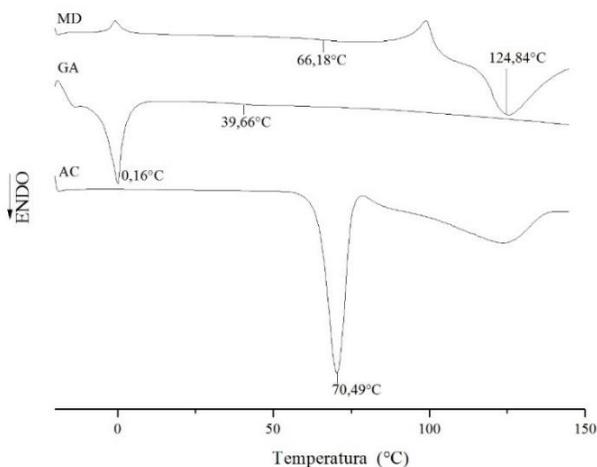


Figura 7 – Curvas de DSC dos extratos secos obtidos a partir do EC

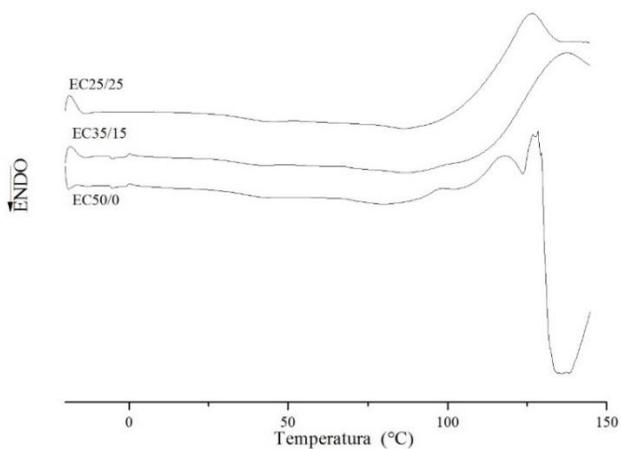
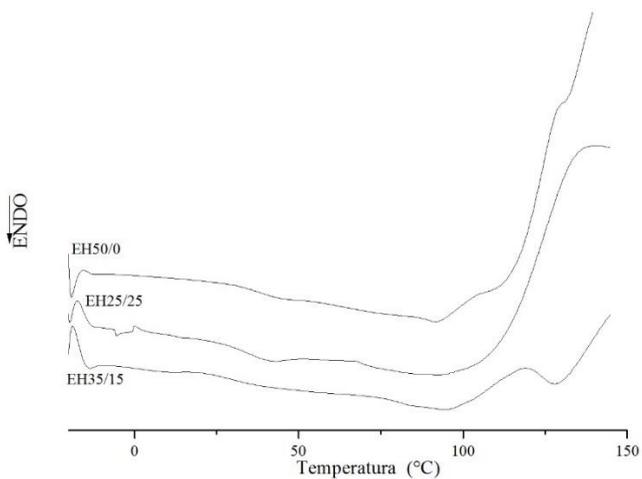


Figura 8 – Curvas de DSC dos extratos secos obtidos a partir do EH



Os extratos EH25/25, EH35/15 e EH50/0 (Figura 8) apresentaram T_g de 34,34; 30,84; e 38,67 °C, respectivamente. As temperaturas de fusão para estes extratos foram, 92,17; 94,50; 94,17 °C.

O emprego da MD com alto teor de hidrólise ($DE \approx 30$) é relatado como causador da diminuição da T_g em pós obtidos por *spray drying*. Quanto maior o DE, menor o peso molecular, portanto, menor será a T_g resultante nas partículas. Embora a adição de MD nos processos de secagem possa acarretar em T_g pouco baixas, este carreador é considerado de excelente utilização, uma vez que não altera a viscosidade dos produtos aos quais é adicionada (ROOS, 1995).

A presença de GA acarretou em pós com T_g menor do que aqueles que somente apresentam MD na composição (FERRARI et al., 2013). Tal fato também foi observado pela degradação térmica na TG, maior nos extratos com GA.

O elevado teor de umidade característicos das amostras em estudo promove a diminuição da T_g dos extratos (GOULA; ADAMOPOULOS, 2010). Em geral, micropartículas com baixo teor de umidade apresentam maior T_g , uma vez que a ação da água como plastificante é limitada (CARVALHO et al., 2016). Da mesma forma, a Aa se relaciona com a T_g , implicando na sua diminuição (CARVALHO et al., 2016).

A T_g de extratos após a secagem pode ser utilizada como indicador da estabilidade durante o armazenamento (38). Com base nos comportamentos exibidos pelos extratos de antocianinas secos por *spray drying* pode-se afirmar que tais micropartículas são estáveis em temperatura de armazenamento ambiente (25 ± 2 °C), uma vez que as T_g dos extratos estão entre 30 e 40 °C ($T_g >$ Temperatura de armazenamento).

Os valores para a T_g dos extratos de antocianinas estão de acordo com dados encontrados na literatura (RIGHETTO; NETTO, 2005). Sendo que os extratos tiveram adição de sólidos semelhantes e foram obtidos a partir dos mesmos extratos (EC e EH), os resultados de T_g semelhantes eram esperados (FERRARI et al., 2013).

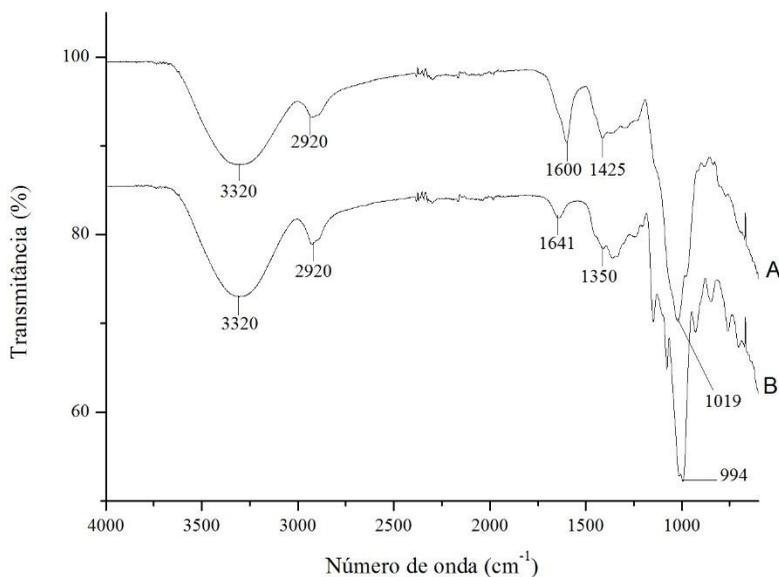
3.8 Espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier (IV)

A análise de espectroscopia no IV foi realizada com a finalidade de identificar os grupos funcionais e observar possíveis interações

presentes no extrato antociano junto aos polissacarídeos utilizados na secagem. Ainda, a análise tem como objetivo identificar mudanças com relação às interações devido a proporção de polissacarídeos empregada, bem como avaliar as mudanças estruturais das micropartículas obtidas a partir do extrato puro e concentrado.

O espectro IV da goma Arábica (Figura 9) expressa banda de absorção característica em 3320 cm^{-1} referente à presença de grupamento OH e ligações de hidrogênio, que se sobrepôs à banda do grupamento amino. A banda em 2920 cm^{-1} indica a presença dos açúcares galactose, arabinose e ramnose, além do estiramento das ligações C-H dos grupamentos CH_3 e CH_2 . Na região de 1600 cm^{-1} ocorre a banda característica do estiramento C=C e amidas primárias provenientes de aminoácidos (DAOUB et al., 2016).

Figura 9 – Espectroscopia no Infravermelho dos polissacarídeos maltodextrina (B); goma Arábica (A)



No espectro IV referente a maltodextrina (Figura 9) é possível observar uma banda em 3320 cm^{-1} referente aos grupamentos OH, e em 2920 cm^{-1} ao estiramento de C-H. Na região de 1641 e 1458 cm^{-1} são características da presença de amidas I, pelo estiramento C=O e C-N, e amidas II pela deformação NH e estiramento C-N.

Nos espectros dos extratos obtidos a partir do EH (Figura 10) é possível observar bandas de absorção correspondentes aos grupamentos OH na região de 3300 e 3330 cm^{-1} . A vibração dos grupamentos OH é atribuída à presença de água e aos grupamentos álcoois e fenóis presentes nos extratos. As vibrações são apresentadas distintamente conforme a umidade dos extratos. O EH apresentou absorção máxima na região de 3334 cm^{-1} . A banda de 2920 cm^{-1} é característica do estiramento das ligações C-H e presença dos grupos funcionais CH_2 e CH_3 (FORATO; BICUDO; COLNAGO, 2003). A região entre 1550 e 1450 cm^{-1} é característica de compostos aromáticos, como a antocianina, sendo que em 1639 cm^{-1} há uma banda de estiramento da ligação C-C dos compostos aromáticos, e entre 1500 e 1300 cm^{-1} a deformação angular em C=O dos compostos fenólicos. Em 1026 cm^{-1} é observada banda referente ao estiramento C-O de álcool. Ainda, as variações apresentadas entre os números de ondas 1000 e 750 cm^{-1} são característicos da presença de anéis aromáticos com substituição na posição *ortho*, característica de extratos antocianínicos (HORST; PARIZE; SOUZA, 2009; PEREIRA JR et al., 2015).

Nos espectros dos extratos antocianos concentrados (Figura 11) é possível observar bandas de absorção correspondentes aos grupamentos OH na região de 3320 e 3295 cm^{-1} . A vibração dos grupamentos OH é atribuída à presença de água e aos grupamentos álcoois e fenóis presentes nos extratos. As vibrações são apresentadas distintamente conforme a umidade dos extratos. O EH apresentou absorção máxima na região de 3295 cm^{-1} . A banda de 2924 cm^{-1} é característica do estiramento das ligações C-H e presença dos grupos funcionais CH_2 e CH_3 . A região entre 1415 e 1360 cm^{-1} é característica de compostos aromáticos, como a antocianina, sendo que em 1641 cm^{-1} há uma banda de estiramento da ligação C-C dos compostos aromáticos, e entre 1411 e 1240 cm^{-1} a deformação angular em C=O dos compostos fenólicos. Em 1014 cm^{-1} é observada banda referente ao estiramento C-O de álcool.

Figura 10 - Espectroscopia no Infravermelho do extrato EH (A), e das micropartículas EH25/25 (B); EH35/15 (C); e EH50/0 (D)

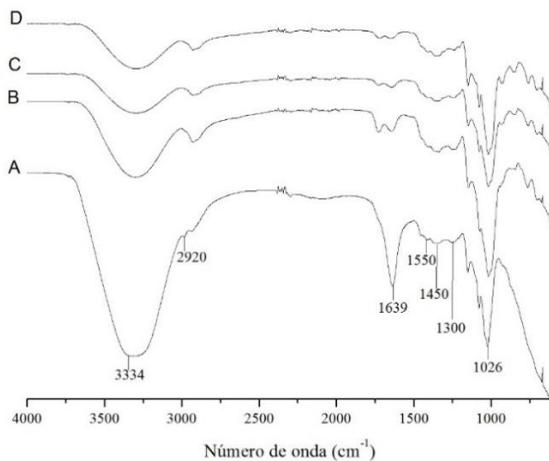
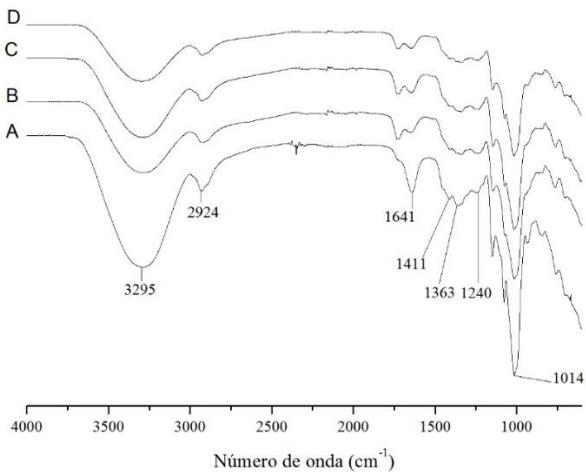


Figura 11 - Espectroscopia no Infravermelho do extrato EC (A), e das micropartículas EC25/25 (B); EC35/15 (C); e EC50/0 (D)



Todas as micropartículas não apresentaram diferenças nas bandas de absorção quando comparados entre si. O que sugere que os compostos adicionados às micropartículas estão presentes em igual forma.

As bandas de absorção características dos polissacarídeos maltodextrina e goma Arábica apresentam mudanças em 1750 a 1600 cm^{-1} quando nos extratos, com aumento da intensidade das bandas nesta região. Considera-se, assim, que as antocianinas foram efetivamente incorporadas aos extratos secos.

Pode-se observar diferença entre os espectros de IV obtidos para todos os extratos após a secagem com relação aos polímeros maltodextrina e goma Arábica puros. Os extratos puro e concentrado apresentaram bandas características da presença de compostos aromáticos, como as antocianinas, que permaneceram nos extratos após a secagem. O perfil de absorção no espectro IV dos extratos apresentam conformidade com os dados relatados na literatura (PEREIRA JR et al., 2015).

CONCLUSÃO

A realização deste trabalho permitiu identificar que a utilização de temperatura de secagem mais branda proporciona elevado teor de antocianinas nos extratos secos obtidos em comparação com estudos semelhantes. O EC apresentou coloração mais escura do que EH, além de que o ΔE foi mais elevado no EC. O mesmo comportamento foi observado para as micropartículas. Os pós contendo o EH expuseram menor teor de umidade, atividade de água reduzida e menor higroscopicidade. As cápsulas do Ec apresentaram maior tamanho de partícula. Os resultados obtidos são característicos para micropartículas formadas em *spray dryer*. Os extratos secos apresentaram teor de antocianinas e coloração eficientes para utilização como corante alimentar. A espectroscopia no IV permitiu confirmar encapsulação pelos polímeros utilizados. As propriedades térmicas caracterizaram todos os sistemas de micropartículas como térmicamente estáveis e possibilitam o seu emprego na indústria de alimentos.

REFERÊNCIAS

AHMED, M.; AKTER, M. S.; LEE, J. C.; EUN, J. B. Encapsulation by spray drying of bioactive components, physicochemical and morphological properties from purple sweet potato. **LWT-Food Science and Technology**, v. 43, n. 9, p. 1307-1312, 2010.

AIDOO, R.P.; AFOAKWA, E.O.; DEWETTINCK, K. Optimization of inulin and polydextrose mixtures as sucrose replacers during sugar-free chocolate manufacture – Rheological, microstructure and physical quality characteristics. **Journal of Food Engineering**, v.126, p.35–42, 2014.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists (method 926.12) Arlington: A.O.A.C., 1996, chapter 33. p. 5.

AVALTRONI, F.; BOUQUERAND, P. E.; NORMAND, V. Maltodextrin molecular weight distribution influence on the glass transition temperature and viscosity in aqueous solutions. **Carbohydrate Polymers**, v. 58, n. 3, p. 323-334, 2004.

BHANDARI, B. R.; DATTA, N.; CROOKS, R.; HOWES, T.; RIGBY, S. A semi-empirical approach to optimise the quantity of drying aids required to spray dry sugar-rich foods. **Drying Technology**, v. 15, n. 10, p. 2509-2525, 1997.

BRITO, E. S.; DE ARAUJO, M. C. P.; ALVES, R. E.; CARKEET, C.; CLEVIDENCE, B. A.; NOVOTNY, J. A. Anthocyanins present in selected tropical fruits: acerola, jambolão, jussara, and guajiru. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, n. 23, p. 9389-9394, 2007.

CAI, Y. Z.; CORKE, H. Production and Properties of Spray-dried Amaranthus Betacyanin Pigments. **Journal of food science**, v. 65, n. 7, p. 1248-1252, 2000.

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

CARVALHO, A. G.; DA COSTA MACHADO, M. T.; DA SILVA, V. M.; SARTORATTO, A.; RODRIGUES, R. A. F.; HUBINGER, M. D. Physical properties and morphology of spray dried microparticles containing anthocyanins of jussara (*Euterpe edulis Martius*) extract. **Powder Technology**, v. 294, p. 421-428, 2016.

DAMODARAN, Srinivasan; PARKIN, Kirk L.; FENNEMA, Owen R. Química de alimentos de Fennema. Artmed, 2010.

DAOUB, R. M.; ELMUBARAK, A. H.; MISRAN, M.; HASSAN, E. A.; OSMAN, M. E. Characterization and functional properties of some natural Acacia gums. **Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences**, 2016.

DEL GIOVINE, L.; BOCCA, A. Piccioli. Determination of synthetic dyes in ice-cream by capillary electrophoresis. **Food Control**, v. 14, n. 3, p. 131-135, 2003.

DE SOUZA, V. B.; THOMAZINI, M.; DE CARVALHO BALIEIRO, J. C.; FÁVARO-TRINDADE, C. S. Effect of spray drying on the physicochemical properties and color stability of the powdered pigment obtained from vinification byproducts of the Bordo grape (*Vitis labrusca*). **Food and Bioproducts Processing**, v. 93, p. 39-50, 2015.

DYRBY, M.; WESTERGARD, N.; STAPELFELDT, H. Light and heat sensitivity of red cabbage extract in soft drink models systems. **Food Chemistry**, v. 72, p. 431-437, 2001.

FERRARI, CRISTHIANE CAROLINE; GERMER, SILVIA PIMENTEL MARCONI; DE AGUIRRE, JOSÉ MAURÍCIO. Effects of spray-drying conditions on the physicochemical properties of blackberry powder. **Drying Technology**, v. 30, n. 2, p. 154-163, 2012.

FERRARI, C. C.; MARCONI GERMER, S. P.; ALVIM, I. D.; DE AGUIRRE, J. M. Storage stability of spray-dried blackberry powder produced with maltodextrin or gum arabic. **Drying Technology**, v. 31, n. 4, p. 470-478, 2013.

FLORES, FLOIRENDO P.; SINGH, RAKESH K.; KONG, FANBIN. Physical and storage properties of spray-dried blueberry pomace extract with whey protein isolate as wall material. **Journal of Food Engineering**, v. 137, p. 1-6, 2014.

FORATO, LUCIMARA A.; BICUDO, TATIANA DE C.; COLNAGO, LUIZ A. Conformation of α zeins in solid state by Fourier transform IR. **Biopolymers**, v. 72, n. 6, p. 421-426, 2003.

GHARSALLAOUI, A.; ROUDAUT, G.; CHAMBIN, O.; VOILLEY, A.; SAUREL, R. Applications of spray-drying in microencapsulation of food ingredients: An overview. **Food Research International**, v.40, p. 1107 – 1121, 2007.

GIORDANO, F.; NOVAK, C.; MOYANO, J. R. Thermal analysis of cyclodextrins and their inclusion compounds. **Thermochimica Acta**, v. 380, n. 2, p. 123-151, 2001.

GIUSTI, M. MÓNICA; WROLSTAD, RONALD E. Characterization and measurement of anthocyanins by UV-visible spectroscopy. **Current protocols in food analytical chemistry**, 2001.

GOULA, ATHANASIA M.; ADAMOPOULOS, KONSTANTINOS G. A new technique for spray drying orange juice concentrate. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 11, n. 2, p. 342-351, 2010.

GRADINARU, G.; BILIADERIS, C. G.; KALLITHRAKA, S.; KEFALAS, P.; GARCIA-VIGUERA, C. Thermal stability of *Hibiscus sabdariffa* L. anthocyanins in solution and in solid state: effects of copigmentation and glass transition. **Food Chemistry**, v. 83, n. 3, p. 423-436, 2003.

HASHIB, S. A.; RAHMAN, N. A.; SUZIHAQUE, M. U. H.; IBRAHIM, U. K.; HANIF, N. E. Effect of Slurry Concentration and Inlet Temperature Towards Glass Temperature of Spray Dried Pineapple Powder. **Procedia-Social and Behavioral Sciences**, v. 195, p. 2660-2667, 2015.

HELDMAN, DENNIS R.; HARTEL, RICHARD W. Principles of food processing. Springer Science & Business Media, 1997.

HORSZWALD, ANNA; JULIEN, HERITIER; ANDLAUER, WILFRIED. Characterisation of Aronia powders obtained by different drying processes. **Food chemistry**, v. 141, n. 3, p. 2858-2863, 2013.

IONASHIRO, M.; GIOLITO, I. Nomenclatura, padrões e apresentação dos resultados em análise térmica. **Cerâmica**, v. 26, n. 121, p. 17-24, 1980.

JANIK, ROMUALD A.; ŁUKOWSKI, TOMASZ. Wrapping interactions at strong coupling: the giant magnon. **Physical Review D**, v. 76, p. 126008, 2007.

JARDIM, C. D.; COUTINHO, M. R. Estudo da extração de antocianinas do resíduo da fabricação de vinho caseiro. Anais da SIEPE – Semana de Integração Ensino, Pesquisa e Extensão. Universidade Estadual do Centro-Oeste, 2009.

JAYA, S.; DASS, H. Effect of maltodextrin, glycerol monostearate and tricalcium phosphate on vacuum dried mango powder properties, **Journal of Food Engineering**, v.63, p.125–134, 2004.

JIMÉNEZ-AGUILAR, D.M.; ORTEGA-REGULES, A.E.; LOZADA-RAMÍREZ, J.D; PÉREZ-PÉREZ, M.C.I; VERNON-CARTER, E.J.; WELTI-CHANGES, J. Color and chemical stability of spray-dried blueberry extract using mesquite gum wallmaterial, **Food and Bioproducts Processing**, 24, 889–894, 2011.

LAOKULDILOK, THUNNOP; KANHA, NATTAPONG. Effects of processing conditions on powder properties of black glutinous rice (*Oryza sativa* L.) bran anthocyanins produced by spray drying and freeze drying. **LWT-Food Science and Technology**, v. 64, n. 1, p. 405-411, 2015.

LEVINE, HARRY; SLADE, LOUISE. Glass transitions in foods. **Physical chemistry of foods**, p. 83-221, 1992.

LOPES, T. J.; QUADRI, M. B.; QUADRI, M. G. N. Estudo Experimental da Adsorção de Antocianinas Comerciais de Repolho Roxo em Argilas no Processo em Batelada. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 9, n. 1, p. 49-56, 2006.

MARTINS, A. F.; BUENO, P. V.; ALMEIDA, E. A.; RODRIGUES, F. H.; RUBIRA, A. F., MUNIZ, E. C. Characterization of N-trimethyl chitosan/alginate complexes and curcumin release. **International journal of biological macromolecules**, v. 57, p. 174-184, 2012.

MARTINS, J.T.; CERQUEIRA, M.A.; VICENTE, A.A. Influence of tocopherol on physicochemical properties of chitosan-based films. **Food Hydrocolloids**, v. 27, p. 220-227, 2012.

MARKOWSKI, ADAM S.; MUJUMDAR, ARUN S. Handbook of Industrial Drying. 2006.

NISHINARI, K.; YAMATOYA, K.; SHIRAKAWA, M.; XYLOGLUCAN, R.; PHILLIPS, G. O.; WILLIAMS, P. A. Handbook of hydrocolloids. Woodhead Publ., Cambridge, UK, p. 247-267, 2000.

NIJDAM, J. J.; LANGRISH, T. A. G. The effect of surface composition on the functional properties of milk powders. **Journal of Food Engineering**, v. 77, n. 4, p. 919-925, 2006.

OLIVEIRA, OLIVIA WERNER; PETROVICK, PEDRO ROS. Spray drying of plant extracts: basic remarks and application. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 4, p. 641-650, 2010.

PARK, S.; ARASU, M. V.; JIANG, N.; CHOI, S. H.; LIM, Y. P.; PARK, J. T.; KIM, S. J. Metabolite profiling of phenolics, anthocyanins and flavonols in cabbage (*Brassica oleracea var. capitata*). **Industrial Crops and Products**, 60, 8-14, 2014.

PEREIRA, VALDIR ANICETO; DE ARRUDA, IZA NATÁLIA QUEIROZ; STEFANI, RICARDO. Active chitosan/PVA films with anthocyanins from *Brassica oleraceae* (Red Cabbage) as time-temperature indicators for application in intelligent food packaging. **Food Hydrocolloids**, v. 43, p. 180-188, 2015.

QUEK, SIEW YOUNG; CHOK, NGAN KING; SWEDLUND, PETER. The physicochemical properties of spray-dried watermelon powders. **Chemical Engineering and Processing: Process Intensification**, v. 46, n. 5, p. 386-392, 2007.

RIGHETTO, ANDRÉA; MARIA NETTO, FLAVIA. Effect of encapsulating materials on water sorption, glass transition and stability of juice from immature acerola. **International Journal of Food Properties**, v. 8, n. 2, p. 337-346, 2005.

ROCKENBACH, I. I.; SILVA, G. L.; RODRIGUES, E.; KUSKOSKI, E. M.; FETT, R. Influência do solvente no conteúdo total de polifenóis, antocianinas e atividade antioxidante de extratos de bagaço de uva (*Vitis vinifera*) variedades Tannat e Ancelota. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, 28, 238-244, 2008.

RODRÍGUEZ-HERNÁNDEZ, G. R., GONZÁLEZ-GARCÍA, R., GRAJALES-LAGUNES, A., RUIZ-CABRERA, M. A., ABUD-ARCHILA, M. Spray-drying of cactus pear juice (*Opuntia streptacantha*): effect on the physicochemical properties of powder and reconstituted product. **Drying Technology**, v. 23, n. 4, p. 955-973, 2005.

ROOS, YRJO H.; DRUSCH, STEPHAN. Phase transitions in foods. **Academic Press**, 2015.

ROSENBERG, M.; YOUNG, S. L. Whey proteins as microencapsulating agents. Microencapsulation of anhydrous milkfat-structure evaluation. **Food Structure**, v. 12, n. 1, p. 4, 1993.

SANTOS, D. T.; MEIRELES, M. A. A. Jabuticaba as a source of functional pigments. **Pharmacognosy Reviews**, v. 3, n. 5, p. 127-132, 2009.

SERRIS, GEORGE S.; BILIADERIS, COSTAS G. Degradation kinetics of beetroot pigment encapsulated in polymeric matrices. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 81, n. 8, p. 691-700, 2001.

SLADE, LOUISE; LEVINE, HARRY; REID, DAVID S. Beyond water activity: recent advances based on an alternative approach to the assessment of food quality and safety. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 30, n. 2-3, p. 115-360, 1991.

TAHA, K. K.; ELMAHI, R. H.; HASSAN, E. A.; AHMED, S. E.; SHYOUB, M. H. Analytical Study On Three Types Of Gum From Sudan. **Journal of Forest Products & Industries**, v. 1, n. 1, p. 11-16, 2012.

TEIXEIRA, HELDER FERREIRA; BASSANI, VALQUIRIA LINCK. Avaliação da influência de adjuvantes farmacêuticos sobre características físicas, químicas, tecnológicas e farmacológicas de extratos secos nebulizados de *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC.-Compositae-Marcela. **Caderno de farmácia**, Porto Alegre, RS. Vol. 13, n. 2 (jul./dez. 1997), p. 151-152, 1997.

TELIS, V. R. N.; MARTINEZ-NAVARRETE, N. Application of compression test in analysis of mechanical and color changes in grapefruit juice powder as related to glass transition and water activity. **LWT-Food Science and Technology**, v. 43, n. 5, p. 744-751, 2010.

TONON, RENATA VALERIANO; BRABET, CATHERINE; HUBINGER, MÍRIAM DUPAS. Influência da temperatura do ar de secagem e da concentração de agente carreador sobre as propriedades físico-químicas do suco de açaí em pó. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 29, n. 2, p. 444-450, 2009.

TONON, R. V.; BRABET, C.; PALLET, D.; BRAT, P.; HUBINGER, M. D. Physicochemical and morphological characterisation of açaí (*Euterpe oleraceae* Mart.) powder produced with different carrier agents. **International journal of food science and technology**, v. 44, n. 10, p. 1950-1958, 2009.

TSIMIDOU, MARIA; BILIADERIS, COSTAS G. Kinetic studies of saffron (*Crocus sativus* L.) quality deterioration. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 45, n. 8, p. 2890-2898, 1997.

VALDUGA, E.; LIMA, L.; DO PRADO, R.; PADILHA, F. F.; TREICHEL, H. Extração, secagem por atomização e

microencapsulamento de antocianinas do bagaço da uva isabel (*Vitis labrusca*). **Ciência e Agrotecnologia**, 1, 2, 1, 2007.

WALTON, M. C.; LENTLE, R. G.; REYNOLDS, G. W.; KRUGER, M. C.; MCGHIE, T. K. Anthocyanins absorption and antioxidant status in pigs. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 20, p. 7940-7946, 2006.

WROLSTAD, R. E. Anthocyanin pigments—Bioactivity and coloring properties. **Journal of Food Science**, v. 69, n. 5, p. C419-C425, 2004.

ZARDO, I. Extração e microencapsulação de compostos antociânicos do bagaço de mirtilo (*Vaccinium corymbosum* L.). Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2014.

**CAPÍTULO 3: DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO
DE FILMES DE QUITOSANA E poli(ÁLCOOL VINÍLICO)
CONTENDO ANTOCIANINAS COMO INDICADOR NATURAL
DO pH**

RESUMO

Filmes poliméricos contendo antocianinas foram elaborados a partir da blenda de quitosana e álcool polivinílico. As propriedades mecânicas e de cor determinaram formulação com potencial aplicação como embalagem ativa para a determinação indireta da deterioração de alimentos perecíveis. A partir dos resultados obtidos, foram selecionadas cinco formulações de filmes para caracterização por análises térmicas, microscopia eletrônica de varredura, ângulo de contato e eficiência da cor. Com base nestas determinações, uma formulação ideal (70/30/10) dos filmes foi eleita para aplicação e avaliação da mudança de cor com o crescimento microbiano. O crescimento da *Escherichia coli* ocasionou variação do pH nos meios de cultura estudados. A cor do filme sofreu mudança de cor, de acordo com o pH. Os extratos antocianínicos preparados a partir do repolho roxo também foram avaliados quanto a eficiência da cor diante da deterioração do pescado. De acordo com a aplicação, os filmes indicadores de pH atuaram de maneira eficaz na determinação da alteração do pH, indicando processo de deterioração no alimento estudado.

1 INTRODUÇÃO

O conceito de embalagem ativa implica na existência de funções adicionais se comparada ao tradicional conceito de material de embalagem, limitadas ao fator proteção do alimento contra a influência do ambiente de comercialização. Em geral, a embalagem ativa visa aumentar a vida de prateleira e/ ou contribuir para a segurança dos alimentos, bem como melhorar a qualidade sensorial. Trata-se de um conceito inovador que pode ser definido como um tipo de embalagem em que ocorre a interação entre ela própria, o produto acondicionado e o ambiente (GONÇALVES, 2011). Com o intuito de contribuir para a segurança dos alimentos, o desenvolvimento de embalagens inteligentes que proporcionam ao consumidor informações referentes a qualidade sanitária do alimento são de grande importância na tecnologia de alimentos.

O desenvolvimento de filme indicador de pH têm como objetivo informar o consumidor sobre a vida de prateleira do alimento perecível, de maneira facilitada (por meio de mudança de cor), a partir de componentes biodegradáveis e não tóxicos.

Para isso, foram produzidos filmes de quitosana (QTS), poli(álcool vinílico) (PVA) e sorbitol que em presença das antocianinas (ANT) promovem a mudança da cor, necessária para aplicação em sistema de embalagem. A QTS é um polímero derivado da quitina, que é comumente encontrada no exoesqueleto de crustáceos e insetos. A QTS é um amino polissacarídeo catiônico de elevada massa molecular, solúvel em ácidos orgânicos, sendo considerada segura para consumo humano (*GRAS – Generally Recognized as Safe*) (BORIWANWATTANARAK et al., 2008; JIANG et al., 2005). É formada por unidades D-glicosamina, as quais diferem a estrutura molecular da quitina e da quitosana de acordo com o grau de desacetilação (MATHUR; NARANG, 1990). Devido a presença de cargas (grupos hidroxila e amino reativos) em sua estrutura, a QTS tem diversas aplicações, pois é capaz de se acoplar a ligantes, tem grande afinidade por metais pesados e corantes aniônicos, além de ser altamente biodegradável (BRINE et al., 1992; MUZZARELLI, 2003). Em geral, sua capacidade de formar filmes é bastante explorada.

Da mesma forma, o PVA é um polímero sintético hidrossolúvel, porém biodegradável, que permite a formação de filmes (NEAMTU et al., 2007). É extremamente biocompatível, e não tóxico o que promove a

sua utilização na indústria de alimentos. Geralmente, é utilizado na elaboração de blendas poliméricas, uma vez que apresenta elevada resistência mecânica e flexibilidade (KAYAL; RAMANUJAN, 2010; CHEN et al., 2014). Biofilmes compósitos de QTS/ PVA apresentam melhores propriedades térmicas, mecânicas e viscoelásticas quando comparados com os polímeros puros (PARPARITA; CHIABURU; VASILE, 2012) podendo, assim, cumprir com os requisitos para aplicações como biomateriais e na incorporação em embalagens ativas (PARPARITA; CHIABURU; VASILE, 2012; ABDELAAL et al., 2007; WANG; SUN; WANG, 2014). A utilização da QTS e do PVA é bastante relatada na literatura pela formação de blendas poliméricas na obtenção de filmes. Da mesma forma, o sorbitol é um plastificante amplamente utilizado em filmes para obtenção de sistemas de embalagens.

As antocianinas (ANT) - do grego *anthos* (flor) e *kyanos* (azul) - são pigmentos naturais hidrossolúveis, de estrutura polifenólica, responsáveis pelas cores vermelho, azul e roxo de diversos vegetais. É um corante orgânico natural, obtido a partir de vegetais, podendo ser usado sem limitações com relação a quantidade, portanto, são pigmentos não tóxicos e não mutagênicos (BROUILLARD, 1983; DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2010; WROLSTAD, 2004). A estrutura básica das antocianinas (aglicona) é o 2-fenilbenzopirona ou cátion *flavylium* (Figura 7) a partir do qual as estruturas secundárias são derivadas (BROUILLARD; DANGLES, 1994; JACKMAN; SMITH, 1992). O repolho roxo (*Brassica oleracea* L.) é uma importante fonte de pigmentos antocianínicos na forma concentrada. Por ser um pigmento de fonte natural é amplamente utilizado como corante alimentar (DYRBY et al, 2001; JACKMAN; SMITH, 1992; HRAZDINA et al., 1977). A coloração das antocianinas varia de acordo com o pH do meio onde estão presentes e, por isso, podem se apresentar em 4 formas estruturais diferentes em equilíbrio químico, dependendo do pH em meio aquoso (DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2010; MORETTO; FETT, 1988).

Uma vez que, os pescados frescos e a carne fresca compõem as principais fontes de proteínas consumidas no mundo, e são considerados alimentos altamente perecíveis (FRANCO et al., 2015). Tendo em vista o objetivo de avaliar a atuação da antocianina como indicador da mudança de pH, foram elaborados extratos de antocianinas do repolho roxo. Os extratos foram encapsulados por *spray drying* e as propriedades físico-químicas determinadas. O presente trabalho tem como finalidade a

aplicação do filme indicador de pH em matriz alimentar perecível. Para isso, foram desenvolvidas blendas de QTS, PVA e sorbitol, em diferentes proporções, com adição de antocianinas. A partir das propriedades mecânicas e de cor, foram escolhidas as formulações mais promissoras para aplicação em escala laboratorial. Tais formulações, foram caracterizadas quanto aos constituintes da matriz polimérica do filme, e possíveis interações entre os polímeros foram observadas por meio das análises térmicas. Ainda, os filmes foram caracterizados quanto a morfologia, interação com solventes através do ângulo de contato, e a relação da reologia das soluções com as propriedades dos filmes foi determinada. Seus parâmetros de opacidade e da cor em determinados pH, também foram estabelecidos. Com base nas análises realizadas, foi selecionado uma formulação de filme para estudo da mudança da cor com o crescimento microbiano e para aplicação em matriz alimentar.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material

Para a elaboração dos filmes biodegradáveis foi utilizada a quitosana (alta viscosidade; Sigma Aldrich, Brasil), juntamente com ácido acético (Merck, Brasil), álcool polivinílico (89,5 %; Vetec, Brasil) e antocianina comercial (AC-2-12R-WS-P; Christian Hansen, Brasil), empregada como indicador colorimétrico natural de pH. O azul de bromotimol (Merck, Brasil) será utilizado para verificar efetividade da mudança de cor do indicador natural. Os reagentes utilizados na execução deste trabalho são todos de grau analítico.

2.2 Obtenção dos filmes

Foram preparadas soluções de quitosana e álcool polivinílico em água destilada. As soluções foram mantidas sobre agitação, até completa dissolução dos polímeros (YOSHIDA et al., 2009).

Considerando o conteúdo contendo ineditismo nesde trabalho, detalhes das formulações foram preservados para apresentar apenas na publicação dos resultados do projeto. Após secagem, os filmes foram removidos e armazenados em dessecador contendo partículas de sílica, ao abrigo da luz, para futuras análises.

2.3 Propriedades físico-químicas dos filmes

A espessura dos filmes foi medida utilizando micrômetro digital Digimess (110.284; São Paulo, Brasil) com divisões de 0,01 mm e capacidade de leitura de 0-25 mm. As medidas de espessura foram conduzidas em 10 replicatas de cada filme e foram tomadas aleatoriamente 5 medidas de cada replicata. Os valores médios foram utilizados para calcular as propriedades mecânicas do filme.

Para determinação das propriedades mecânicas dos filmes indicadores de pH, inicialmente os corpos de prova foram cortados em dimensões de 100 mm de comprimento e 25,4 mm de largura e foram produzidas 10 repetições de cada amostra. Os filmes foram previamente acondicionados em dessecador com solução saturada de NaBr a 23 ± 2 °C com umidade relativa (UR) de 50 ± 10 % por pelo menos 40

horas, de acordo com a norma ASTM D882-12 (2012) que compreende a determinação das propriedades de tensão ou tração de plásticos em forma de folhas delgadas, incluindo filmes, com espessura menor que 1,0 mm.

As propriedades mecânicas dos filmes, incluindo deformação na ruptura, ou alongação (E%), resistência a tração (RT), e módulo de elasticidade, ou módulo de Young (ME), foram obtidas através de ensaio de tração em texturômetro (TA-XT2i Stable Micro System, Inglaterra), com célula de carga de 50 kgf, controlado pelo software *Exponent Stable Micro Systems* (Stable Micro System, Inglaterra), e determinadas através das Equações:

$$\tau = \frac{F}{A_0} \quad \text{Equação 1}$$

$$\varepsilon = \frac{(L-L_0)}{L_0} \quad \text{Equação 2}$$

$$\tau = E \cdot \varepsilon \quad \text{Equação 3}$$

Onde, τ é a tensão (MPa), F é a força, ou carga, aplicada (N), A_0 é a área da seção reta transversal (cm²), ε é a deformação, L_0 é o comprimento inicial da amostra e L é o comprimento instantâneo. E é o módulo de elasticidade.

As medidas foram efetuadas dentro de um tempo médio de 5 minutos para que as condições de temperatura e umidade relativa do ar não interfiram nos resultados experimentais. Os resultados obtidos para RT e ME serão expressos em MPa e E% em porcentagem.

A partir dos resultados obtidos para as propriedades mecânicas dos filmes indicadores de pH, foram escolhidas as formulações mais promissoras para aplicação em embalagem inteligente para alimentos.

2.4 Determinação da cor dos filmes

Os parâmetros da cor dos filmes foram determinados em colorímetro Chroma Meter CR 400 (Konica Minolta, Japão). Para a determinação dos parâmetros L^* , a^* , b^* , os filmes foram acomodados em placas de Petri e analisados sobre placa padrão de cor branca ($L^* = 97,40$; $a^* = 0,10$; $b^* = 2,11$). Os filmes foram avaliados quanto a diferença total

de cor (ΔE), com relação ao filme controle, de acordo com a equação a seguir:

$$\Delta E^* = \sqrt{(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2} \quad (4)$$

Onde, $\Delta L^* = L^*_{\text{controle}} - L^*_{\text{amostra}}$; $\Delta a^* = a^*_{\text{controle}} - a^*_{\text{amostra}}$; $\Delta b^* = b^*_{\text{controle}} - b^*_{\text{amostra}}$. Sendo o filme controle utilizado como padrão.

2.5 Comportamento reológico das soluções filmogênicas

As soluções filmogênicas foram caracterizadas quanto ao seu comportamento reológico em reômetro Brookfield RVDV-IIICP, modelo de *spindle* do tipo SSA, SC4-21 e 28, equipado com um banho termoestabilizado (TE 184, Tecnal, Brasil) para controle da temperatura (25 ± 2 °C). As soluções foram mantidas em repouso durante 10 min, e em seguida colocadas no porta-amostras para equilíbrio da temperatura e indução do estresse de relaxamento.

Os dados foram obtidos utilizando o *software* Reocalc 32 (Brookfield, Brasil). Medições de fluxo em estado estacionário foram realizadas para cada solução filmogênica durante 20 min e os parâmetros reológicos k (índice de consistência) e n (índice de comportamento de fluxo) foram determinados pelo *software*. As curvas de fluxo experimentais foram ajustados para o modelo de Lei da Potência, dado pela Equação 5.

$$T = k(\gamma)^n \quad (\text{Equação 5})$$

Onde, T é a tensão de cisalhamento (Pa); k é o índice de consistência (Pa.sⁿ); γ é a taxa de deformação, e n é o índice de comportamento de fluxo (adimensional).

2.6 Teor de umidade

O teor de umidade dos filmes foi determinado por gravimetria, após secagem em estufa a vácuo a 70 °C durante aproximadamente 12 horas, até atingir peso constante (AOAC, 1996).

2.7 Ângulo de contato e energia livre superficial

O ângulo de contato dos filmes foi obtido utilizando o equipamento OCA 15EC (Filderstadt, Alemanha), com sistema processador de imagem de alta resolução (Data Physics Instruments). Os ensaios foram executados em temperatura ambiente (25 °C) e o volume dos líquidos depositados sobre a superfície de cada filme foi de 5 µL, 4 µL e 0,8 µL para água deionizada, formamida e diiodometano, respectivamente. As medidas do ângulo estático são automatizadas e os dados apresentados correspondem ao valor da média final.

A energia livre superficial foi determinada utilizando o método de Owens-Wendt o qual também determina os componentes, polar e dispersivo e é geralmente utilizado para polímeros. A energia livre superficial total de um sólido (γ^T) pode ser expressa como a soma do componente dispersivo (γ^d) e polar (γ^p) (Equação 6). A equação de Owens-Wendt (Equação 7) aplica os dados dos líquidos polares e não polares, com componentes dispersivos (γ^d) e polares (γ^p) conhecidos, da energia livre superficial total e do ângulo de contato (θ) (JAMSHIDIAN et al., 2012).

$$\gamma_s^T = \gamma_s^d + \gamma_s^p \quad \text{Equação (6)}$$

$$\gamma_L (1 + \cos \theta) = 2 \left(\sqrt{\gamma_s^d \gamma_L^d} + \sqrt{\gamma_s^p \gamma_L^p} \right) \quad \text{Equação (7)}$$

Onde γ_L é a tensão superficial do líquido. Sendo água deionizada ($\gamma^T = 72.8$ mN/m, $\gamma^d = 21.8$ mN/m, $\gamma^p = 51.0$ mN/m), diiodometano ($\gamma^T = 50.8$ mN/m, $\gamma^d = 50.8$ mN/m, $\gamma^p = 0$ mN/m) e formamida ($\gamma^T = 58,0$ mN/m, $\gamma^d = 39,0$ mN/m, $\gamma^p = 19,0$ mN/m).

2.8 Morfologia dos filmes

Os filmes e blendas QTS/PVA/Sorb foram analisados por microscopia eletrônica de varredura (MEV). Foram realizadas criofraturas transversais nos filmes. Corpos de prova (0,5 x 0,5 cm) foram fixados em um suporte metálico de cobre (*stubs*) com auxílio de uma fita dupla face de carbono e recobertos com uma fina camada de ouro em recobridora à vácuo (EM SCD500, Leica, EUA).

A visualização foi realizada em aumentos de 1000 e 2300 vezes, em microscópio eletrônico de varredura JEOL modelo JSM-6390LV (Jeol, Tóquio, Japão), com voltagem de excitação de 10 kV. A superfície dos filmes e as seções transversais foram avaliadas e a espessura determinada pelo *Software* livre *Image Processing and Analysis in Java - ImageJ* (*National Institutes of Health*, EUA).

2.9 Absorbância e opacidade

Para as medidas de espectroscopia de absorbância e opacidade, os filmes foram recortados em formas retangulares (5 x 1 cm) de acordo com o tamanho de cubetas de quartzo utilizadas. Uma cubeta vazia foi utilizada como branco. Os espectros UV-Vis dos filmes indicadores de pH foram obtidos em espectrofotômetro UV-Vis (U-1800, Hitachi, Japão), operando na região de 190 a 900 nm.

Para determinação do grau de opacidade dos filmes indicadores de pH foi realizada leitura da absorbância dos filmes no comprimento de onda de 600 nm (SP2000 UV, Bel-Photonics, Brasil), e o grau de opacidade expresso de acordo com a Equação 8:

$$O = Abs_{600} / x \quad (\text{Equação 8})$$

Onde, Abs_{600} representa o valor da absorbância em 600 nm e x a espessura dos filmes (mm). De acordo com esta equação, valores altos de O indicam menor transparência e maior o grau de opacidade.

2.10 Espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier (IV)

A análise de espectroscopia no IV foi realizada para observar interações estruturais nos filmes. Os espectros no IV foram obtidos em equipamento FTIR Frontier (Perkin Elmer, Brasil) na região entre 4000 e 600 cm^{-1} com resolução de 4 cm^{-1} , com 32 *scans* em média. Todas as leituras foram realizadas a temperatura ambiente.

2.11 Análises térmicas

As curvas de calorimetria exploratória diferencial (DSC) foram obtidas em equipamento MC-DSC (TA Instruments, EUA), acoplado a um analisador térmico TA2000 (TA Instruments, EUA). Foram utilizadas cápsulas de aço Hastelloy hermeticamente fechadas contendo aproximadamente 2 mg dos filmes sob atmosfera dinâmica de nitrogênio ($50 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$), com razão de aquecimento de $2 \text{ }^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$, na faixa de temperatura de -20 a $140 \text{ }^\circ\text{C}$.

A termogravimetria (TG) é usada para avaliar a estabilidade e degradação térmica de materiais poliméricos. A TG foi realizada em termobalança TGA-50 (Shimadzu Corporation, Japão) na faixa de temperatura de $30 \text{ }^\circ\text{C}$ a $600 \text{ }^\circ\text{C}$, em cadinho de platina com aproximadamente 3 mg de amostra, atmosfera dinâmica de nitrogênio e razão de aquecimento de $10 \text{ }^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$.

2.13 Eficiência da Cor e pH

Os filmes foram imersos em soluções tampão com diferentes condições de pH variando do 1,0 ao 12,0 e mantidos em temperatura ambiente ($25 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$) durante 24 horas. Após esse período, os filmes foram removidos da solução tampão e acondicionados em placas de petri de poliestireno. As placas contendo os filmes foram colocadas sobre a placa branca padrão para igualar o fundo das medições. Para cada filme em cada pH, foram determinados os parâmetros de cor (L^* , a^* , b^*) de acordo com a escala CIELab através de um colorímetro Chroma Meter CR 400 (Konica Minolta, Japão), utilizando placa branca para calibração. Os filmes foram avaliados quanto a diferença total de cor (ΔE^*) e suas coordenadas cilíndricas (*Chroma* - C^* intensidade da cor e *Hue* - H^* tonalidade ou cor propriamente dita) determinadas. Para determinação da diferença total de cor foi utilizada a Equação 9 e para determinar as coordenadas cilíndricas, as Equações 10 e 11.

$$\Delta E^* = \sqrt{(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2} \quad \text{Equação (9)}$$

$$C^* = \sqrt{(a^*)^2 + (b^*)^2} \quad (10)$$

$$H^* = \arctan \frac{b^*}{a^*} \quad (11)$$

Onde, $\Delta L^* = L_p^* - L_{Ta}^*$; $a_p^* - a_{La}^*$; $b_p^* - b_a^*$, onde a corresponde a amostra de cada filme avaliada em determinado pH, e o p é o padrão amostral (o mesmo filme no pH 7,0).

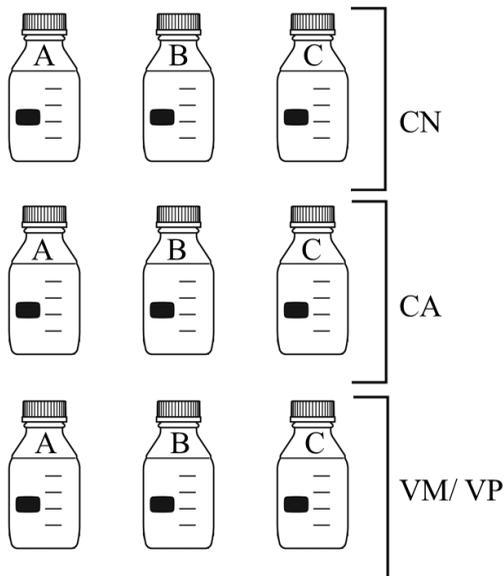
2.14 Eficiência da cor e crescimento microbiano

A cepa de *Escherichia coli* ATCC 11229 (Lote: 0805032) utilizada pertencente à Coleção de Culturas de Bactérias de Interesse em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Ministério da Saúde, Rio de Janeiro. A cepa foi mantida a $-20\text{ }^\circ\text{C}$ em criotubos (TPP, Suíça) contendo 1 mL de caldo *Brain Heart Infusion* (BHI; Difco, USA) e 25 % (v/v) de glicerol (Labsynth, Brasil). Para uso, a cepa foi cultivada em ágar tripticase de soja com 0,6 % de extrato de levedura (TSAye, Oxoid, Inglaterra) e mantida a $4\text{ }^\circ\text{C}$. Para preparação da cultura para inóculo experimental, a cepa foi cultivada em BHI por 18-24 h a $37\text{ }^\circ\text{C}$ e submetida à diluição em água peptonada 0,1% (Oxoid, Inglaterra) para obtenção de uma suspensão com 8 log UFC/mL, a concentração foi verificada pela turvação equivalente a 0.5 da escala de McFarland.

Além da realização dos ensaios em caldos Nutriente (CN) e Vermelho de Metila/ Vogel Proskauer (VM/VP), foi elaborado o caldo de carne (CA), com a finalidade de realizar o teste do filme indicador de pH em matriz alimentar. Para tanto, foram pesados 500 g de carne bovina, cozidas por 3 horas sob fervura em 1000 mL de água destilada, filtrados (filtro qualitativo, Unifil, Brasil), suplementados com glicose (10%) e esterilizados a $121\text{ }^\circ\text{C}$ por 15 min (AV 75, Tecnal, Brasil).

O teste para mudança da cor com crescimento microbiano foi realizado em frascos contendo 150 mL dos caldos Nutriente (CN), Carne (CA) e Vermelho de Metila/ Vogel Proskauer (VM/VP) inoculados com 1,5 mL da bactéria utilizada, resultando numa concentração inicial de 3 log UFC.mL⁻¹. O experimento foi montado de acordo com o esquema (Figura 1) a seguir.

Figura 1 – Incubação dos filmes controle e 70/30/10 nos meios de cultura CN, CA e VM/ VP



Fonte: Elaborado pelo autor

Para cada meio de cultura (CN, CA e VM/VP) foram preparados três frascos (Figura 1). Em um dos frascos (A) colocou-se o filme controle, em outro frasco (B), o filme 70/30/10. Sendo que A e B foram inoculados. O frasco C não sofreu inoculação, nem adição de filme, pois atuou como controle negativo para o crescimento microbiano. Todos os frascos foram mantidos em banho a 37 °C com agitação (Personal Shaker) por 24 horas.

Alíquotas dos caldos foram retiradas nos tempos: 0, 2, 4, 6 e 24 horas para análise de pH. Nestes mesmos períodos, as amostras passaram por diluições seriadas em água peptonada (0,1%) e foram inoculadas pela técnica de plaqueamento em superfície em placas de Petri contendo ágar padrão de contagem (PCA, Kasvi), em duplicata, seguidas de incubação (37°C/ 24h). Ainda, nos referidos tempos, foram determinados os parâmetros de cor (L^* , a^* , b^*) dos filmes de acordo com a escala CIELab através de um colorímetro Chroma Meter CR 400 (Konica Minolta, Japão), utilizando placa branca para calibração. Os filmes foram avaliados quanto a diferença total de cor (ΔE^*) e suas coordenadas

cilíndricas (*Chroma* - C^* intensidade da cor e *Hue* - H^* tonalidade ou cor propriamente dita) determinadas. Para determinação da diferença total de cor foi utilizada a Equação 12 e para determinar as coordenadas cilíndricas, as Equações 13 e 14.

$$\Delta E^* = \sqrt{(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2} \quad \text{Equação (12)}$$

onde, $\Delta L^* = L_{T0}^* - L_{Tx}^*$; $a_{T0}^* - a_{Tx}^*$; $b_{T0}^* - b_{Tx}^*$, onde $x = T2, T4, T6$ e $T24$ horas.

$$C^* = \sqrt{(a^*)^2 + (b^*)^2} \quad (13)$$

$$H^* = \arctan \frac{b^*}{a^*} \quad (14)$$

Os resultados obtidos são expressos em variação da cor no filme resultante da mudança de pH em detrimento do crescimento bacteriano, com relação ao tempo zero.

2.15 Ativação do filme indicador de pH

Filmes na proporção de 70/30/10 foram preparados contendo os extratos de antocianinas (5%) e o azul de bromotimol (5%) como indicador de pH. Filés de peixe foram adquiridos em mercado local. Os filés de peixe (*Corvina* - *Micropogonias furnieri*) foram cortados (2 x 2 cm) e acomodados em frascos de vidro. Os frascos foram identificados e cobertos pelos filmes indicadores avaliados. O pH do peixe foi determinado (Bel Photonics, Brasil) no primeiro e quinto dia. Os frascos foram acondicionados a 25 ± 2 °C durante 5 dias e a cor dos filmes foi determinada pelos parâmetros L^* , a^* , b^* , C^* , H° e ΔE^* no dia 1 e 5.

2. 16 Análise estatística

Os dados obtidos foram expressos com médias e desvio padrão das determinações realizadas em triplicata. Os resultados foram submetidos à análise de variância e a comparação de médias foi realizada pelo Teste de Tukey com nível de significância de 5%, utilizando-se o

programa Statistical Analysis Software - SAS, versão 10 (SAS Institute, Inc.; Cary, N.C.).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Propriedades físico-químicas dos filmes

A espessura de filmes degradáveis é considerada um parâmetro importante porque pode influenciar nas propriedades biológicas e na vida de prateleira do alimento revestido (AKHTAR et al., 2012). A natureza do polímero formador de película e o teor de aditivos afetam a espessura do filme por suas interações com a matriz polimérica (SALMIERI, LACROIX, 2006; SEBTI et al., 2007).

Os valores de espessura variaram entre $25,62 \pm 11,35 \mu\text{m}$ e $58,17 \pm 20,05 \mu\text{m}$, conforme ilustrado na Tabela 1.

Tabela 1 – Espessura dos filmes de quitosana e PVA contendo antocianinas como indicador de pH

QTS/ PVA/ Sorbitol	Espessura (μm)
controle	$22,82 \pm 2,5^a$
30/ 70/ 10	$27,08 \pm 5,77^{a,b}$
30/ 70/ 20	$25,62 \pm 11,35^{a,b}$
30/ 70/ 30	$38,73 \pm 6,17^{a,b,c,d,e}$
30/ 70/ 40	$38,38 \pm 9,97^{b,c,d,e}$
30/ 70/ 50	$47,34 \pm 11,74^{c,d,e,f,g}$
50/ 50/ 10	$33,00 \pm 7,14^{a,b,c}$
50/ 50/ 20	$34,89 \pm 7,85^{a,b,c,d,e}$
50/ 50/ 30	$35,50 \pm 7,09^{a,b,c,d,e}$
50/ 50/ 40	$42,05 \pm 13,08^{b,c,d,e,f,g}$
50/ 50/ 50	$50,31 \pm 13,00^{e,f,g}$
70/ 30/ 10	$33,18 \pm 3,63^{a,b,c}$
70/ 30/ 20	$33,98 \pm 3,58^{a,b,c,d}$
70/ 30/ 30	$47,36 \pm 4,49^{c,d,e,f,g}$
70/ 30/ 40	$50,83 \pm 4,89^{d,e,f,g}$
70/ 30/ 50	$50,43 \pm 5,57^{e,f,g}$
100/ 0/ 10	$44,82 \pm 9,91^{c,d,e,f,g}$
100/ 0/ 20	$40,38 \pm 6,80^{b,c,d,e,f}$
100/ 0/ 30	$49,00 \pm 4,89^{d,e,f,g}$
100/ 0/ 40	$54,91 \pm 12,94^{f,g}$
100/ 0/ 50	$58,17 \pm 20,05^g$

Valores apresentados como a média \pm desvio padrão. Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa ($p < 0,05$) quando analisadas pelo teste de Tukey.

Pode-se observar que a adição de sorbitol afetou a espessura dos filmes com relação ao filme controle. Os filmes contendo 50 % de sorbitol apresentaram maior espessura em relação aos demais. Há uma tendência no aumento da espessura dos filmes quando comparadas as formulações contendo 10 e 20 % de sorbitol com aquelas que contém 40 e 50%.

O mesmo comportamento foi observado para a adição de QTS nas formulações. O que pode ser explicado pela diferença de massa molecular dos polímeros em questão. Ainda, a adição de plastificantes é comprovada pelo aumento da espessura de filmes, uma vez que estes atuam entre as moléculas da matriz polimérica, formando camadas que tendem a ocupar maior espaço, e conseqüentemente, aumentar a espessura.

Assim, a natureza dos polímeros utilizados nas blendas, bem como o teor de plastificante empregado e a presença de antocianinas afetaram a espessura dos filmes através de interações na matriz polimérica (SALMIERI; LACROIX, 2006; SEBTI et al., 2007). Park e Zhao (2004) observaram o aumento da espessura em filmes de quitosana adicionados de compostos bioativos.

Os resultados obtidos para a espessura dos filmes estão de acordo com a norma para filmes finos (< 1,0 mm) e com dados da literatura (PINOTTI et al., 2007). A espessura dos filmes obtidos é menor do que a encontrada por Antoniou et al., 2015 (0,088 mm) que utilizou QTS na blenda dos filmes e maior do que os valores encontrados por Yoshida, Oliveira e Franco, 2009 (0,0194 mm).

A determinação das propriedades mecânicas se faz importante para caracterização de filmes quanto aos parâmetros de manutenção da integridade de um alimento, de proteção física e da taxa de liberação de compostos bioativos (LAZARIDOU; BILIADERIS, 2002).

As propriedades mecânicas dos filmes (Tabela 2) foram obtidas a partir das curvas da tensão-deformação. Em geral, os filmes apresentaram comportamento semelhante, característico dos polímeros utilizados. As alterações das propriedades mecânicas juntamente com a composição dos filmes estão relacionadas com o grau de compatibilidade entre os polímeros (ARVANITTOYANNIS et al., 1997).

A QTS é um material rígido e quebradiço que facilmente é rompido em testes de tensão-deformação (TM DOV, 2002). A incorporação de PVA na QTS torna o filme mais flexível e resistente à ruptura. As interações existentes entre as cadeias dos polímeros

apresentam uma melhora nas propriedades mecânicas quando comparado aos filmes dos polímeros puros.

Tabela 2 – Propriedades mecânicas dos filmes de QTS e PVA contendo antocianina como indicador de pH

QTS/ PVA/ Sorbitol	Deformação na ruptura (%)	Resistência a tração (MPa)	Módulo de Elasticidade (MPa)
controle	4,82 ± 1,38 ^e	54,81 ± 4,79 ^a	1555,17 ± 181,16 ^a
30/ 70/ 10	78,83 ± 8,52 ^b	20,64 ± 3,67 ^c	65,68 ± 5,74 ^d
30/ 70/ 20	117,40 ± 9,44 ^a	5,64 ± 1,15 ^{efg}	9,59 ± 0,09 ^d
30/ 70/ 30	90,00 ± 6,42 ^b	7,77 ± 1,17 ^{efg}	7,81 ± 0,06 ^d
30/ 70/ 40	78,52 ± 7,11 ^b	5,52 ± 1,38 ^{efg}	6,59 ± 0,84 ^d
30/ 70/ 50	89,77 ± 9,68 ^b	6,68 ± 1,08 ^{efg}	7,73 ± 0,85 ^d
50/ 50/ 10	52,65 ± 11,47 ^c	20,72 ± 4,19 ^c	31,97 ± 4,29 ^d
50/ 50/ 20	54,88 ± 8,73 ^c	8,14 ± 3,87 ^{efg}	13,88 ± 3,54 ^d
50/ 50/ 30	43,70 ± 11,31 ^{cd}	2,84 ± 0,75 ^g	7,09 ± 0,55 ^d
50/ 50/ 40	51,98 ± 7,90 ^c	3,78 ± 1,05 ^{efg}	6,00 ± 1,4 ^d
50/ 50/ 50	56,54 ± 9,98 ^c	3,34 ± 1,39 ^g	5,34 ± 1,37 ^d
70/ 30/ 10	33,39 ± 9,97 ^d	22,37 ± 5,65 ^{bc}	166,79 ± 26,43 ^c
70/ 30/ 20	44,89 ± 4,98 ^{cd}	10,79 ± 1,35 ^{de}	20,90 ± 1,46 ^d
70/ 30/ 30	52,87 ± 6,91 ^c	5,10 ± 1,57 ^{efg}	8,02 ± 1,73 ^d
70/ 30/ 40	50,21 ± 8,17 ^c	3,19 ± 1,04 ^g	5,36 ± 0,93 ^d
70/ 30/ 50	52,59 ± 11,44 ^c	3,15 ± 1,49 ^g	4,46 ± 1,06 ^d
100/ 0/ 10	7,44 ± 2,51 ^e	28,32 ± 6,97 ^b	516,22 ± 94,13 ^b
100/ 0/ 20	30,08 ± 8,65 ^d	14,35 ± 5,30 ^d	42,11 ± 3,50 ^d
100/ 0/ 30	44,90 ± 5,05 ^{cd}	9,74 ± 2,46 ^{def}	18,02 ± 2,48 ^d
100/ 0/ 40	54,17 ± 6,35 ^c	7,01 ± 1,60 ^{efg}	12,23 ± 1,50 ^d
100/ 0/ 50	45,53 ± 4,98 ^{cd}	4,73 ± 1,05 ^{efg}	9,03 ± 1,05 ^d

Valores apresentados como a média ± desvio padrão. Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa ($p < 0,05$) quando analisadas pelo teste de Tukey.

O comportamento mecânico de um material reflete a relação entre sua resposta, ou deformação, a uma carga ou força aplicada. A Deformação na ruptura, ou alongação (E%) é a capacidade de alongação do filme antes da ruptura. Os filmes das blendas de QTS, PVA em presença de plastificante apresentaram diminuição de E% com o aumento na concentração de QTS. As formulações que continham maior proporção de PVA apresentaram melhor desempenho para elasticidade. Dentre os filmes com maior teor de PVA, a porcentagem de deformação na ruptura foi maior para o filme contendo QTS30/PVA70/S10 (117,40 ± 9,44). O filme com menor capacidade de alongação foi a formulação de QTS100/PVA0/S50 (5,61 ± 3,24). O mesmo comportamento foi

Tabela 3 – Estudo comparativo das propriedades mecânicas dos filmes indicadores de pH e dados encontrados na literatura

Plímeros	Formação do Filme	Deformação na ruptura (%)	Resistência a tração (MPa)	Módulo de elasticidade (MPa)	Referência
- QTS (alta viscosidade, a 2% em ácido acético (1%))	<i>casting</i>	4,28	54,81	1555,17	Filme controle Presente estudo
- QTS (alta viscosidade, a 2% em ácido acético (1%)) - PVA (86,6% hidrólise, 2% em água) - Sorbitol	<i>casting</i>	7,44 - 78,83	20,64 - 28,32	31,97 - 166,79	Diversas blendas Presente estudo
- QTS (média viscosidade, a 1%, em ácido acético (1%)) - PVA (99% hidrólise, 1% em água)	<i>cross-linking</i> <i>casting</i>	controle 16,2 blenda 26,8	controle 31,8 blenda 9,8	controle 24,37 blenda 3,53	Pereira Jr et al., 2015
- QTS (média viscosidade, a 2%, em ácido acético)	<i>casting</i>	controle 3,89	controle 49,98	controle 2400	Yoshida et al., 2014
- QTS (Média viscosidade)	<i>casting</i>	7,61	48,20	-	Yoshida, Oliveira, Franco, 2009
- QTS (Média viscosidade (2% em ácido acético) - Clorofila	<i>casting</i>	2,46-4,22	56,07-64-98	3110-3270	Maciel, Franco, Yoshida, 2012
- QTS (Média viscosidade em ácido acético)	<i>casting</i>	1,85	35,2	1998,10	Rotta et al., 2009
	<i>casting</i>	3,90	15,8	10	Pinotti et al., 2007
- Celofane		20	114	-	Aydt, Weller, Testin, 1991

- LDPE	100-965	13-28	-	Park, Weller, Vergano, Testin, 1993
- PET	-	-	2100-3100	Plastic Products, 2010
- LDPE	-	-	200-400	Boedeker Plastics, 2013
- HDPE	-	-	600-1400	Boedeker Plastics, 2013
- PVC	-	-	25-1600	Boedeker Plastics, 2013

Fonte: Elaborado pelo autor

observado para as blendas de PVA e QTS encontradas na literatura (PEREIRA JR. et al., 2015).

Em geral, os filmes de QTS e PVA não se diferem quanto a E% ocasionada pelo aumento do sorbitol. O efeito da adição de plastificante pode ser observado claramente nas formulações contendo somente QTS e sorbitol pelo aumento na capacidade de E% dos filmes ($4,82 \pm 1,38 < 45,53 \pm 4,98$). Em geral, o plastificante promove a flexibilidade de filmes diminuindo a fragilidade. A adição de plastificantes leva a uma diminuição das forças intermoleculares ao longo da cadeia polimérica a qual acarreta um aumento da flexibilidade. Além disso, o plastificante é benéfico na remoção do filme das placas de secagem (YANG; PAULSON, 2000). Ainda, a deformação na ruptura teve comportamento linear nas formulações 30/70/10, 50/50/10, 70/30/10 e 100/0/10, caracterizado pela diminuição com a adição de QTS.

O módulo de elasticidade é o parâmetro que caracteriza o material quanto a rigidez. É dependente da composição e morfologia dos polímeros utilizados. Com relação ao ME, as amostras não apresentaram diferença estatística ($p < 0,05$) quando comparadas entre si, somente com relação ao filme padrão ($1539,14 \pm 359,4$). Porém, pode-se observar valores elevados para o ME nas formulações com menor teor de sorbitol. Há uma tendência no aumento do ME para as formulações contendo maior teor de quitosana.

A RT é a medida da resistência máxima que um filme suporta contra uma tensão de tração aplicada (PARK et al., 2004). A propriedade de resistência a tração mecânica é aumentada a medida que a concentração de quitosana aumenta. Ainda, a RT é afetada pela presença do sorbitol, quanto maior a sua adição menor são os valores para RT nos filmes de QTS e PVA contendo antocianinas.

Comportamento semelhante ao observado neste trabalho foi encontrado na literatura para filmes de quitosana (ROTTA et al., 2009; PINOTTI et al., 2007) e blendas de QTS e PVA (PEREIRA JR. et al., 2015), e pela utilização do sorbitol como plastificante (BARRETO, 2003). A Tabela 3 apresenta o resultado referente às propriedades mecânicas de estudos semelhantes. As possíveis variações nos resultados obtidos para as propriedades mecânicas em comparação com relatos encontrados na literatura (GÓMEZ-ESTACA et al., 2011; HOSSEINI; RAZAVI; MOUSAVI, 2009) são ocasionadas pela composição dos polímeros utilizados, fonte de obtenção como no caso da QTS e grau de hidrólise. Ainda, as etapas que compreendem a formulação (ácido

utilizado, período), secagem e armazenamento dos filmes podem promover alterações nas propriedades mecânicas (CANER; VERGANO; WILES, 1998).

3.2 Determinação da cor dos filmes

Os dados que caracterizam os filmes de QTS e PVA quanto a cor são apresentados na Tabela 4. A cor dos filmes foi determinada a partir dos parâmetros L^* , a^* , b^* . As blendas de polímeros testadas apresentaram diferença ($p < 0,05$) com relação a cor expressa pelo filme controle (QTS 100/0/0). Em geral, os filmes apresentaram coloração entre o vermelho/violeta característica da presença de extrato de antocianinas em pH neutro.

Os parâmetros L^* e a^* pouco se diferiram estatisticamente, portanto, somente o parâmetro b^* será avaliado afim de comparação. De acordo com a escala CIE-Lab, b^* corresponde ao eixo de variação da cor entre o azul e amarelo. Assim, os filmes contendo antocianinas apresentaram variação na cor com o aumento da proporção de QTS no filme. Assim, a presença de maior teor de quitosana fornece a solução filmogênica maior presença de cargas positivas que pode afetar o pH da mesma. A medida em que se incorpora QTS na matriz do filme, a cor tende ao roxo (presença de azul) pela aproximação do pH neutro. Quanto menor o teor de QTS menos azulado o filme, o que justifica os valores de b^* mais próximos de zero.

Da mesma forma, o aumento da proporção de QTS nos filmes promoveu maior variação da cor em relação ao filme controle.

Ainda que os filmes apresentaram variação na cor, todas as formulações obtidas foram consideradas adequadas para expressão da cor decorrente da presença das antocianinas.

Com base nas propriedades mecânicas, características de cor e nas observações obtidas durante o manuseio dos filmes de quitosana e PVA, foram escolhidas 5 principais formulações para realização das demais análises de caracterização. Uma vez que a presença do sorbitol foi considerada necessária para maleabilidade do filme e resistência mecânica, e que na sua menor utilização conferiu aos filmes a plasticidade necessária para os fins de aplicação desejado.

Os filmes que contém maior teor de sorbitol e PVA apresentaram melhores propriedades de alongação, característica que amplia a resistência destes filmes no momento da aplicação. Em contrapartida, tais

filmes apresentaram maior aderência, o que dificulta a manipulação destes. Sendo que os filmes elaborados no presente estudo têm como finalidade a incorporação em uma embalagem com o intuito de atuar como indicador natural do pH de alimentos, as propriedades relativas à resistência e alongamento dos filmes não é prioridade.

Assim, a fim de caracterização e comparação das propriedades térmicas, morfológicas, eficiência da cor e aplicação, as formulações 30/70/10; 50/50/10; 70/30/10 e 100/0/10 dos filmes indicadores de pH foram selecionadas. Na execução das referidas análises, tais formulações foram comparadas ao filme controle, contendo somente QTS em sua composição.

Tabela 4 – Propriedades da cor dos filmes de QTS e PVA contendo antocianinas

QTS 100	Parâmetros da Cor			-
	L_0^*	a_0^*	b_0^*	
	96,25 ± 0,58 ^h	-0,02 ± 0,03 ^{a,b}	3,29 ± 0,08 ^h	-
Blendas	L^*	a^*	b^*	ΔE
QTS/PVA (30/70) S10	22,38 ± 3,33 ^a	15,02 ± 1,29 ^{a,g}	-1,48 ± 0,95 ^{f,g,h}	75,53
QTS/PVA (30/70) S20	31,99 ± 3,22 ^{a,b,c,d,e,f}	41,56 ± 3,44 ^h	2,28 ± 2,95 ^{f,g,h}	76,54
QTS/PVA (30/70) S30	23,13 ± 2,07 ^{a,b,c}	14,12 ± 2,98 ^{f,g}	-1,62 ± 1,23 ^{f,g}	74,63
QTS/PVA (30/70) S40	22,70 ± 2,94 ^{a,b}	13,33 ± 2,90 ^{e,f,g}	-0,71 ± 1,74 ^{f,g,h}	74,85
QTS/PVA (30/70) S50	24,85 ± 3,59 ^{a,b,c,d}	16,025 4,11 ^g	-5,2 ± 3,92 ^{e,f}	73,67
QTS/PVA (50/50) S10	43,15 ± 4,51 ^{f,g}	8,03 ± 2,06 ^{c,d,e,f}	-11,99 ± 0,61 ^{b,c,d}	55,83
QTS/PVA (50/50) S20	35,25 ± 5,70 ^{d,e,f,g}	12,80 ± 2,76 ^{e,f,g}	-10,58 ± 1,63 ^d	63,85
QTS/PVA (50/50) S30	46,70 ± 3,53 ^{f,g}	2,46 ± 4,66 ^{a,b,c}	-13,71 ± 1,55 ^{b,c,d}	52,44
QTS/PVA (50/50) S40	38,90 ± 5,57 ^{f,g}	13,11 ± 2,24 ^{e,f,g}	-10,69 ± 0,33 ^d	60,47
QTS/PVA (50/50) S50	32,69 ± 15,61 ^{a,b,c,d,e,f}	12,59 ± 3,63 ^{e,f,g}	-9,42 ± 0,76 ^{d,e}	66,03
QTS/PVA (70/30) S10	40,25 ± 3,06 ^{e,f,g}	2,89 ± 0,64 ^{a,b,c}	-13,81 ± 0,76 ^{b,c,d}	58,62
QTS/PVA (70/30) S20	31,93 ± 4,77 ^{a,b,c,d,e,f}	-0,53 ± 2,46 ^a	-13,94 ± 2,31 ^{b,c,d}	66,58
QTS/PVA (70/30) S30	34,94 ± 3,29 ^{c,d,e,f,g}	-1,71 ± 1,15 ^a	-15,52 ± 0,89 ^{b,c}	64,15
QTS/PVA (70/30) S40	41,98 ± 4,04 ^{f,g}	12,98 ± 2,04 ^{e,f,g}	-11,26 ± 0,17 ^{c,d}	57,67
QTS/PVA (70/30) S50	34,40 ± 2,43 ^{b,c,d,e,f}	-2,51 ± 1,18 ^a	-15,57 ± 1,28 ^{b,c}	64,70
QTS/PVA (100/0) S10	42,15 ± 7,10 ^{f,g}	11,35 ± 2,29 ^{d,e,f,g}	-24,26 ± 5,71 ^a	61,76
QTS/PVA (100/0) S20	29,57 ± 4,08 ^{a,b,c,d,e}	7,585 ± 2,52 ^{d,e}	-11,90 ± 3,16 ^{b,c,d}	68,80
QTS/PVA (100/0) S30	39,40 ± 4,76 ^{e,f,g}	11,04 ± 4,44 ^{d,e,f,g}	-26,62 ± 1,26 ^a	65,18
QTS/PVA (100/0) S40	37,34 ± 2,19 ^{e,f,g}	5,705 ± 0,95 ^{b,c,d}	-16,37 ± 1,01 ^b	62,36
QTS/PVA (100/0) S50	39,53 ± 1,66 ^{e,f,g}	11,36 ± 1,4 ^{d,e,f,g}	-27,85 ± 0,27 ^a	65,69

Valores apresentados como a média ± desvio padrão. Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa ($p < 0,05$) quando analisadas pelo teste de Tukey.

3.3 Comportamento reológico das soluções filmogênicas

As soluções filmogênicas apresentaram comportamento pseudoplástico ($n < 1$) (Tabela 5), característico de fluidos não newtonianos. Assim, os fluidos com essa característica tendem a refluidificar quando a taxa de deformação aumenta. Para fluidos não newtonianos os valores de k , indicam o grau de resistência do fluido diante do escoamento, de modo que quanto maior o valor de k , maior é a consistência do fluido (LEWANDOWSKA, 2015).

As soluções formadoras dos filmes foram mais consistentes quanto maior a proporção de quitosana. Sendo que a solução do filme controle apresentou maior k do que a solução 100/0/10, indicando que a presença do sorbitol diminui significativamente ($p < 0,05$) a consistência da solução. Comportamento semelhante foi observado por Hou et al. (2012).

Tabela 5 – Comportamento reológico das soluções formadoras de filmes

Solução	k (Pa.s ⁿ)	n	pH
controle	2.915,00 ± 2,08 ^a	0,68 ± 0,01 ^c	3,87 ± 0,01
100/0/10	1.990,13 ± 67,40 ^b	0,65 ± 0,01 ^{c,d}	4,34 ± 0,08
70/30/10	459,35 ± 31,75 ^c	0,76 ± 0,01 ^a	4,17 ± 0,01
50/50/10	226,4 ± 15,35 ^d	0,71 ± 0,01 ^b	4,14 ± 0,03
30/70/10	106,45 ± 0,49 ^e	0,64 ± 0,01 ^d	4,06 ± 0,01

Valores apresentados como a média ± desvio padrão. n : índice de comportamento de fluxo; k : índice de consistência. Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa ($p < 0,05$) quando analisadas pelo teste de Tukey.

O aumento da concentração de QTS em soluções tem como consequência a diminuição do n e o aumento no k . Devido as baixas interações hidrodinâmicas nas soluções diluídas e pelo contato entre as cadeias do polímero, que condicionam o fluxo de soluções concentradas (MARTINEZ; CHORNET; RODRIGUE, 2004).

Bercea et al. (2015) estudaram a influência do pH na formação de soluções viscosas de QTS. Determinaram que o comportamento viscoelástico das soluções contendo quitosana é dependente do pH. Em condições de pH acima de 6,2 as soluções contendo QTS podem sofrer precipitação (ZHOU et al., 2015).

As propriedades catiônicas da QTS, devido aos aminos grupos que promovem a formação de cargas em condições de pH abaixo de 6,5, permitem com que estabeleça ligações com materiais com carga negativa

(ARGIN-SOYSALA; KAFINASB; LO, 2009). A solubilização da QTS ocorre em meios ácidos pela protonação dos grupamentos amino. A rede polimérica é formada pela sensibilidade das moléculas de QTS ao pH na presença do PVA. Assim, as soluções filmogênicas apresentaram valor de pH adequado para formação da rede polimérica que irá sustentar a matriz do filme.

As propriedades reológicas apresentadas pelas soluções estudadas sugerem ampla aplicação na formação de revestimentos e filmes de utilização na indústria de alimentos.

3.4 Teor de umidade

O teor de umidade dos filmes (Tabela 6) é maior na formulação controle, contendo somente quitosana em sua composição. Os filmes indicadores de pH tiveram valores para umidade semelhantes. Yoshida et al. (2014) obteve 8,79 g.100g⁻¹ de umidade em filmes de quitosana, valor abaixo do apresentado.

Tabela 6 – Teor de umidade dos filmes indicadores de pH

Filme	Umidade (g.100g ⁻¹)
Controle	10,24 ± 4,84 ^a
100/0/10	4,46 ± 2,11 ^b
70/30/10	5,22 ± 2,97 ^b
50/50/10	4,38 ± 2,75 ^b
30/70/10	5,51 ± 3,30 ^b

Valores apresentados como a média ± desvio padrão. Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa ($p < 0,05$) quando analisadas pelo teste de Tukey.

3.5 Ângulo de contato e energia livre superficial

A medida do ângulo de contato de líquidos com diferentes polaridades em contato com a superfície da amostra define a relação de polaridade de superfícies. Para valores do ângulo de contato com a água inferiores a 90 °C, a superfície é considerada hidrofílica e superiores a 90 °C, hidrofóbica (NORONHA et al., 2014). Os valores para os ângulos de contato dos filmes estudados em relação aos solventes testados são apresentados na Tabela 7.

Tabela 7 – Ângulo de contato, energia livre superficial total, componente dispersivo e componente polar dos filmes em contato com a água, formamida e diiodometano

Filme	Ângulo de Contato			Energia Livre Superficial		
	Água	Formamida	Diiodometano	γ^T (mN/m)	γ^d (mN/m)	γ^p (mN/m)
100/0/0	84,58 ± 1,96 ^c	70,54 ± 2,38 ^a	48,08 ± 1,16 ^b	34,86	30,93	3,93
100/0/10	84,02 ± 0,55 ^c	68,84 ± 1,89 ^a	49,84 ± 2,12 ^b	34,44	29,92	4,52
70/30/10	65,96 ± 2,18 ^a	53,42 ± 1,96 ^b	46,62 ± 2,19 ^b	40,65	26,81	13,84
50/50/10	72,74 ± 1,66 ^b	47,92 ± 1,58 ^b	38,16 ± 1,29 ^a	43,66	34,78	8,88
30/70/10	75,07 ± 2,79 ^b	54,72 ± 5,09 ^b	45,79 ± 2,89 ^b	39,34	30,67	8,67

Valores apresentados como a média ± desvio padrão. γ^T : energia livre superficial total; γ^d : componente dispersivo; γ^p : componente polar. Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa ($p < 0,05$) quando analisadas pelo teste de Tukey.

Os filmes controle e 100/0/10 apresentaram menor interação com a água (Figura 2) do que os filmes contendo PVA. O mesmo comportamento foi observado para a formamida, solvente de polaridade intermediária (Figura 3). Com relação ao ângulo de contato formado entre os filmes e o diiodometano, os filmes com adição de PVA apresentaram menor afinidade pelo solvente (Figura 4) (EL-HEFIAN; NASEF; YAHAYA, 2011). O ângulo de contato para o filme controle (84,58 ± 1,96) está de acordo com dados encontrados na literatura (EL-HEFIAN; NASEF; YAHAYA, 2011; NGPASUTHADOL; PONGCHASIRIKUL; HOVEN, 2003; ZHUANG; LI; FAN; LIN; HU, 2012).

Contudo, os filmes expuseram maior interação no ângulo de contato formado com a água do que com os demais solventes de menor polaridade. Portanto, quanto maior a hidrofiliabilidade exposta por um filme, menor o ângulo de contato formado com o diiodometano.

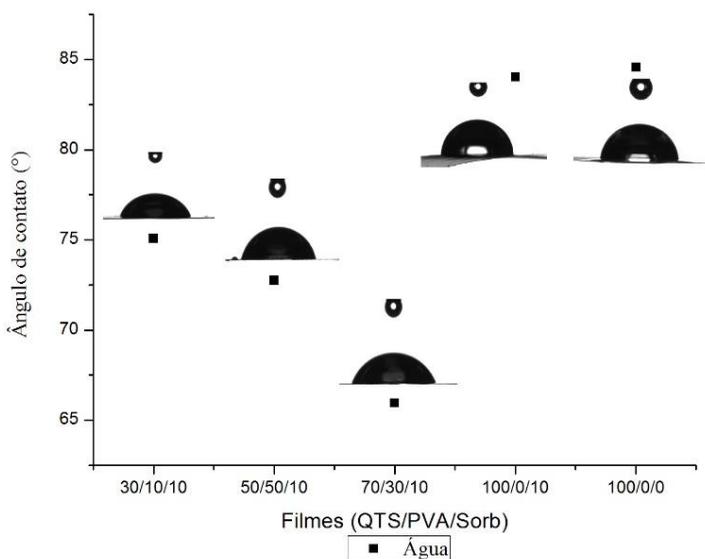
O ângulo de contato para a blenda 30/70/10 foi de 45,79 ± 2,89 para o diiodometano, e 75,07 ± 2,79 para a água. Assim, a presença do PVA demonstrou comportamento característico deste polímero, seu caráter anfifílico, com comportamento mais hidrofóbico que os demais filmes. Resultados semelhantes foram encontrados na literatura (CARVALHO, 2013).

O filme 70/30/10 teve o menor ângulo de contato com a água (65,96), sendo a formulação dentre os filmes com maior hidrofiliabilidade. Que pode ser comprovada pelo ângulo de contato do diiodometano (46,62), indicando pouca interação com solvente apolar. Sendo, então,

classificado como o filme com maior hidrofilicidade perante aos parâmetros da energia livre e superficial.

Já a formulação 50/50/10 do filme, apresentou afinidade pela água (72,74) e baixa interação com o diiodometano (38,16). Os dados referentes a energia livre superficial para a blenda 50/50/10 sugerem o predomínio de forças hidrofóbicas, por apresentar o maior valor para o componente dispersivo (34,78) e o menor valor para o componente polar (8,88).

Figura 2 – Ângulo de contato dos filmes indicadores de pH e água



Para a formamida, solvente de polaridade intermediária, os ângulos de contato de todos os filmes se situaram entre os valores encontrados para a água e para o diiodometano.

Em relação a energia livre superficial total, os valores seguiram o mesmo padrão para os ângulos de contato com a água, ou seja, os filmes controle e 100/0/10 se mostraram semelhantes e diferiram dos demais filmes. A energia livre superficial total foi maior para as blends de filmes contendo PVA. Estes apresentaram maiores valores para o componente dispersivo (hidrofóbico), e menores valores para o componente polar.

Figura 3 – Ângulo de contato dos filmes indicadores de pH e formamida

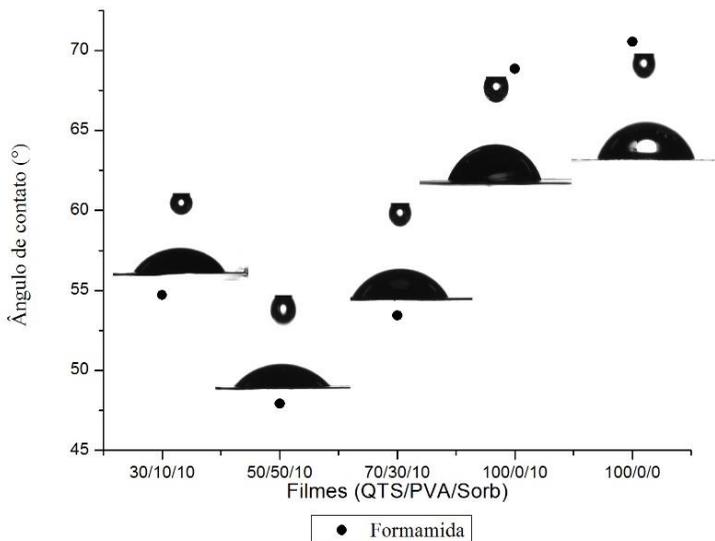
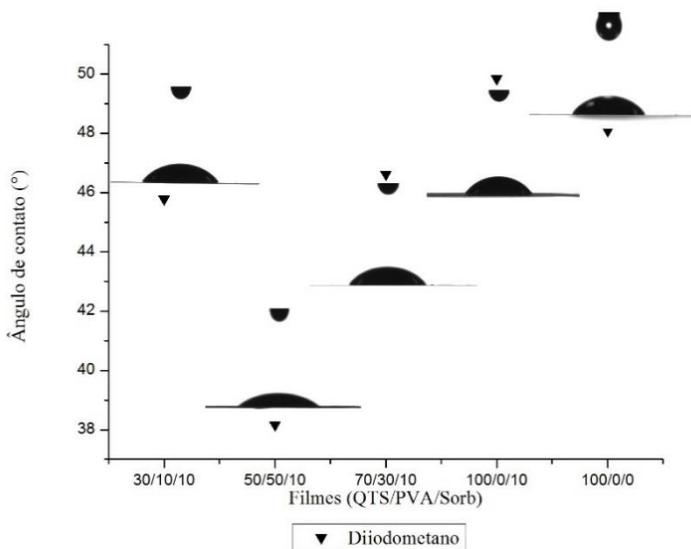


Figura 4 – Ângulo de contato dos filmes indicadores de pH e diiodometano



A presença do PVA afeta esses parâmetros de acordo com a sua proporção de adição no filme. Ainda, a energia livre superficial total apresentou maior valor nas blendas 70/30/30 e 50/50/10 com relação ao filme de controle. A presença de sorbitol no filme não afetou a energia livre superficial total do filme, bem como o ângulo de contato formado pelos solventes testados.

3.6 Morfologia dos filmes

As micrografias obtidas para dos filmes de QTS e PVA revelaram que não há diferença na superfície dos filmes ocasionada pela adição de PVA, sorbitol ou das antocianinas. Em geral, os filmes apresentaram estrutura compacta e homogênea, além da superfície lisa. Não há formação de poros ou rachaduras, evidenciados pela MEV (Figura 5 e 6).

A partir das micrografias da superfície dos filmes pode-se confirmar a agregação eficaz das moléculas à matriz filmogênica durante a evaporação do solvente (ROTTA, 2008).

Figura 5 – Micrografias da superfície e seção transversal dos filmes controle (100/0/0) e 100/0/10, nos aumentos 1000 e 2300x

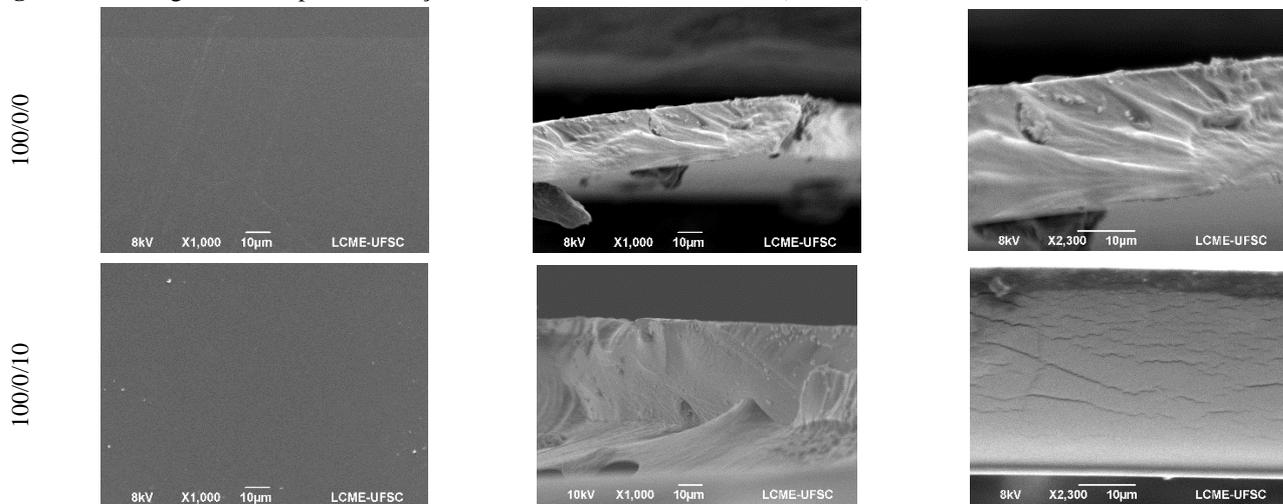
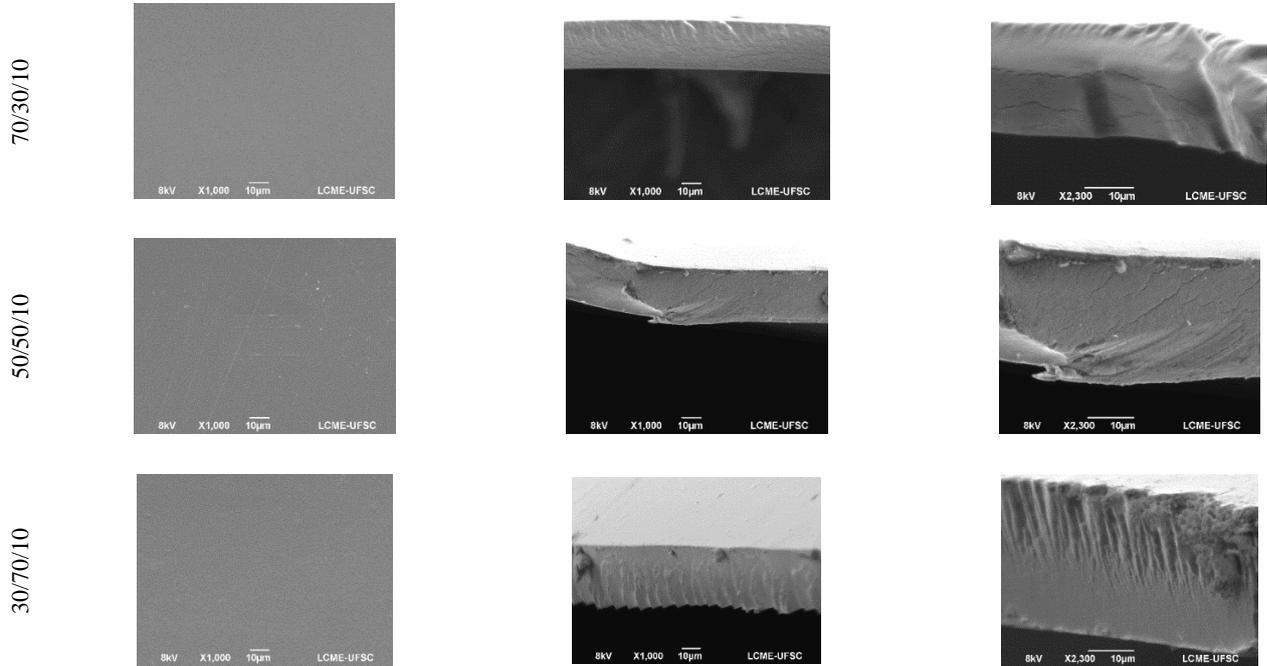


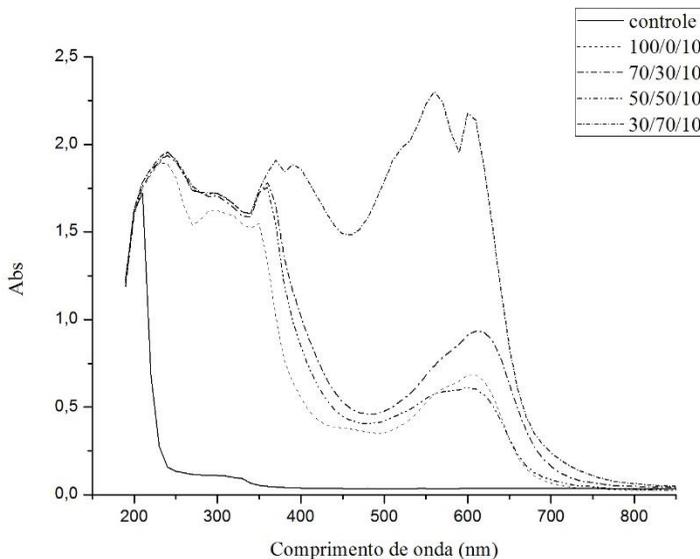
Figura 6 – Micrografias da superfície e seção transversal dos filmes, nos aumentos 1000 e 2300x



3.7 Absorbância e opacidade

A Figura 7 mostra o espectro de absorção dos filmes indicadores de pH. Os resultados apresentados confirmam a incorporação das antocianinas aos filmes indicadores de pH.

Figura 7 – Espectroscopia no UV-visível dos filmes indicadores de pH

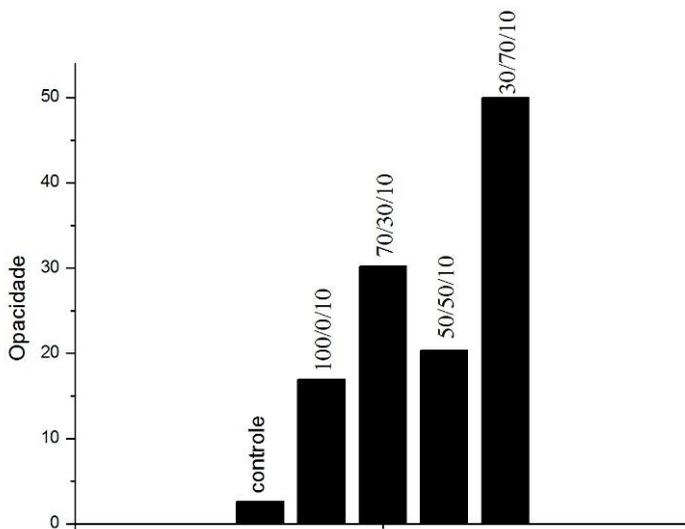


É possível observar um máximo de absorção na região UV-visível em comprimento de onda de 240 nm, referente a presença de antocianinas. O deslocamento da banda de absorção de 320 nm (antocianina em pH neutro) é ocasionado pela acidificação apresentada nas soluções formadoras dos filmes indicadores de pH, que apresentaram valores variando de 4,05 a 4,40 com o aumento da adição de quitosana. Os filmes indicadores de pH apresentaram uma mudança hipocrômica em comparação ao filme controle, sem adição de antocianinas (PEREIRA JR et al., 2015). O perfil espectrofotométrico para antocianinas obtido foi observado de maneira semelhante na literatura consultada (LEVI et al., 2004; PEREIRA JR et al., 2015).

O espectro (Figura 7) observado para o filme indicador de pH 30/70/10 pode ser ocasionado pelo aumento da opacidade (Figura 8)

observado neste filme com relação aos demais. Opacidade é uma análise que indica o grau de transparência do filme, quanto maior os valores de opacidade, menos transparência terá o filme.

Figura 8 – Opacidade dos filmes indicadores de pH



A transparência está inversamente relacionada com a absorção/reflexão da luz. Um material não transparente pode absorver luz e/ou refleti-la. Quanto mais transparente for um material, menos luz é absorvida e/ou refletida por ele (ROSA, 2016). Os filmes indicadores de pH tiveram o grau de opacidade aumentado quando comparado ao filme controle. As diferenças entre os filmes com antocianinas quanto ao grau de opacidade podem ser relativas ao período de secagem de necessário para cada formulação de filme.

3.8 Espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier (IV)

A Figura x mostra o espectro no IV para os polímeros QTS, PVA e sorbitol, *in bulk*. O espectro para o PVA apresenta picos de absorção em

3306 cm^{-1} para o estiramento de O-H (ANICUTA et al., 2019; RODRIGUES et al., 2007), em 2939 e 2910 cm^{-1} apresenta banda de absorção do C-H. Ainda, em 1730 cm^{-1} apresentou banda de absorção do (CH)-CH₂ e 1243 cm^{-1} correspondente ao grupo C-O e 1086 cm^{-1} para (C-O)-C-OH. Já em 945 cm^{-1} , o espectro apresentou absorção do CH-CH₂, e em 844 cm^{-1} para C-C. As bandas de absorção são características do polímero em questão (PEREIRA JR. et al., 2015).

Para a QTS, o espectro no IV apresentou banda de absorção máxima na região de 3355 a 3292 cm^{-1} característica da presença de ligações O-H. Em 2872 cm^{-1} , a presença da C-H₂ é confirmada, e em 1640 e 1312 cm^{-1} o C=O e o N-H característicos da amida I, respectivamente. Para as amidas II e III, as bandas em 1260 e 1374 cm^{-1} foram apresentadas, e 1586, 1026 e 981 cm^{-1} , para os sacarídeos (estrutura β -1-4). A banda de absorção em 1058 cm^{-1} é referente a presença das ligações C-O cíclicas. As bandas de absorção foram relatadas de forma semelhante na literatura (BONARDD et al., 2016; MOUSSOUT et al., 2016; PEREIRA JR. et al., 2015).

No caso do sorbitol, as bandas apresentaram absorção máxima de 872, 1000, 1046, 1088 e 1415 cm^{-1} . As bandas em 1046 e a 1084 cm^{-1} foram atribuídas a vibrações de estiramento em C-OH. As bandas entre 870 e 1415 cm^{-1} Surgiram devido às vibrações de flexão no plano e fora do plano de ligações O-H, respectivamente (QUINQUENET et al., 1988).

Através da comparação entre os perfis apresentados pela QTS e pelo sorbitol para a espectroscopia no IV do filme controle, pode-se afirmar a interação destes componentes na formação da matriz polimérica, uma vez que o espectro do filme controle apresenta as mesmas bandas de absorção que ambos os componentes, ainda que, alguma delas sejam apresentadas mais sucintamente ou pouco deslocada de acordo com a interação ocorrida.

No espectro IV do filme controle em relação aos seus constituintes (Figura 9), a banda de estiramento O-H está presente em 3282 cm^{-1} , e de C-H está presente em 2934 cm^{-1} . Há uma banda de estiramento em 1240 cm^{-1} indicativo de C-N, típica de amins secundárias, que é atribuída à cadeia polimérica da QTS. O espectro IV também mostra uma banda de estiramento C-N (amida I) típica a 1645 cm^{-1} , além da deformação de C-O do grupamento hidroxila em 1017 cm^{-1} . Estas bandas são deslocadas em comparação com as suas homólogas puras na QTS e no PVA, indicando associação polimérica através de ligação de hidrogénio (BONILLA et al., 2014).

Figura 9 – Espectroscopia no Infravermelho dos polímeros QTS, PVA e Sorbitol

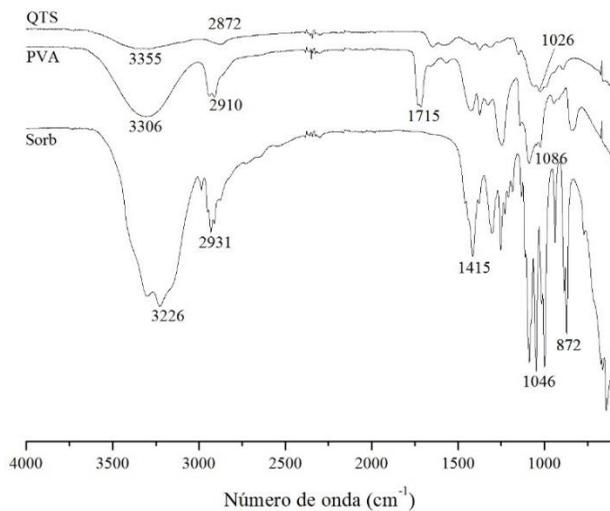
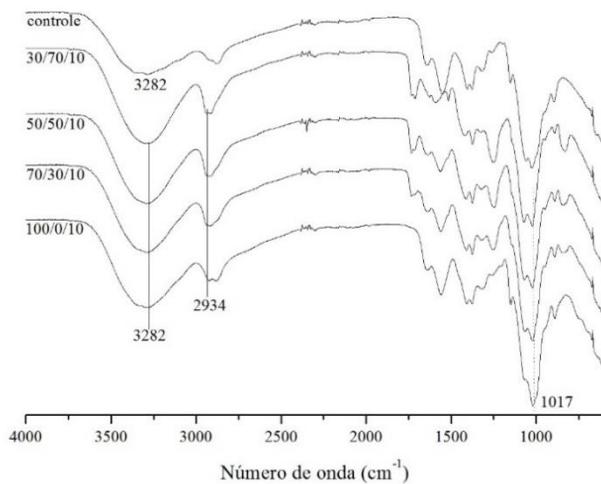


Figura 10 – Espectroscopia no Infravermelho para os filmes indicadores de pH



Os espectros no IV dos filmes indicadores de pH apresentaram mesmo perfil para as bandas de absorção apresentadas. Os indicadores de pH apresentaram bandas características da presença de compostos aromáticos, como as antocianinas, que sofreram interação com a matriz polimérica, confirmando sua presença nos filmes exceto formulação controle (sem adição e antocianinas). As mudanças presentes na região de 1500 a 1600 cm^{-1} sugerem um aumento da intensidade das bandas nesta região, o que comprova a incorporação das antocianinas na matriz polimérica (PEREIRA JR. et al., 2015).

3.9 Análises térmicas

A análise de termogravimetria (TG) é uma técnica útil na avaliação da estabilidade térmica de filmes poliméricos por meio da perda de peso em função da temperatura (MARTINS; CERQUEIRA; VICENTE, 2012). E assim, determinar os limites de temperatura para aplicação dos filmes (YOSHIDA et al., 2014). As curvas de TG obtidas para os filmes indicadores de pH são apresentados nas Figuras 11, 12 e na Tabela 8.

As curvas de TG referentes aos polímeros (Figura 11) apresentam eventos isolados de perda de massa de acordo com a sua composição. Conforme apresentado nas figuras, os filmes tiveram comportamento semelhante aos polímeros de origem, expondo apenas um evento na perda de massa. As curvas de TG apresentaram somente um estágio para degradação térmica dos filmes. As temperaturas necessárias para iniciar a degradação térmica são semelhantes aos dados encontrados na literatura (YOSHIDA et al., 2014).

A Tabela 8 apresenta os dados de temperatura de degradação térmica para os componentes dos filmes apresentados nas curvas de TG a seguir.

Em geral, a degradação orgânica inicia em 287,41 e ocorre até 312,30 $^{\circ}\text{C}$ nos filmes. Acima destas temperaturas, inicia-se a decomposição estrutural de matrizes poliméricas.

Os filmes de QTS e PVA apresentaram comportamento semelhante entre si (Figura 12). Em geral os filmes apresentaram degradação térmica em temperatura inferior a necessária para os polímeros *in bulk*. O filme 100/0/10 apresentou menor temperatura (287,41 $^{\circ}\text{C}$) necessária para iniciar a degradação da matriz polimérica.

Figura 11 – Curvas termogravimétricas dos polímeros quitosana, PVA e sorbitol utilizados na obtenção dos biofilmes

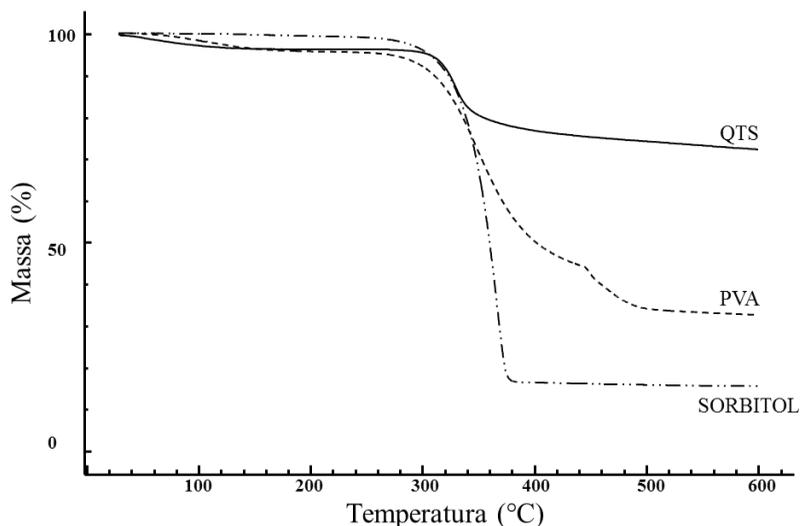


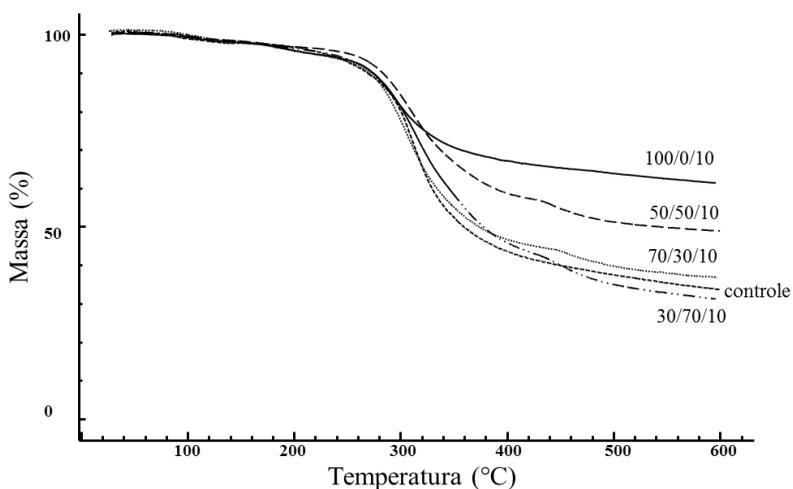
Tabela 8 - Parâmetros das transições térmicas dos biofilmes indicadores de pH

	Mid Point	Onset	Endset	Massa (mg)	Massa (%)
30/70/10	312,30	281,35	349,77	-1,94	-46,72
50/50/10	307,28	280,07	340,61	-1,59	-34,39
100/0/0	310,48	291,68	334,95	-1,15	-44,76
70/30/10	301,04	277,8	327,69	-1,22	-32,77
100/0/10	287,41	265,24	314,89	-0,97	-22,87
QTS	325,82	315,46	338,93	-1,03	-17,2
PVA	346,04	318,45	381,54	-4,36	-48,15
Sorbitol	355,19	339,44	372,98	-5,7	-82,63

Maior perda de massa foi observada nas formulações com maior teor de PVA. O PVA e sorbitol expuseram perda de massa elevada em relação a QTS, assim, a presença destes componentes tem relação com a diminuição da massa nas blendas dos filmes. Em contrapartida, a presença do PVA elevou a temperatura necessária para degradação térmica dos filmes.

A presença de antocianinas na composição dos filmes também promove a diminuição da temperatura de degradação, assim observado por Yoshida et al. (2014).

Figura 12 – Curvas termogravimétricas dos biofilmes indicadores de pH



A partir da análise de termogravimetria, o filme 70/30/10 apresentou menor perda de massa, comparado as demais formulações contendo sorbitol. Portanto, é considerado como a formulação ideal para os fins de aplicação desejados. Ainda, apresenta elevada estabilidade térmica (301,04 °C), com relação a formulação 100/0/10 (sem PVA), indicativo de que a interação entre os componentes na proporção estudada foi benéfica.

A partir das curvas de DSC é possível observar a interação presente em uma matriz polimérica, através de deslocamentos de picos de fusão, cristalização ou demais transições térmicas. Ainda, é um método amplamente utilizado por necessitar de pouca amostra e prover resultados rápidos na caracterização de sistemas multicomponentes como os filmes aqui estudados (GIORDANO; NOVAL; MOYANO, 2001).

A Figura 13 apresenta as curvas de DSC dos polímeros QTS e PVA e do sorbitol utilizados na obtenção dos filmes indicadores de pH. As endogramas obtidas sugerem que todos os filmes sofreram algum tipo

de interação na matriz polimérica do filme, de acordo com a sua composição, uma vez que apresentaram comportamento distinto (T_g , T_f) dos endogramas para os polímeros utilizados.

A temperatura de transição vítrea (T_g) dos filmes foi considerada como o ponto médio da transição vítrea. Assim, a QTS apresentou evento endotérmico na região de 50 °C, com temperatura de fusão acima de 120 °C. Tais eventos endotérmicos podem ser atribuídos a região de transição vítrea da QTS (SANTOS et al., 2003). O PVA expressou comportamento endotérmico na região de 86,80 °C e com temperatura de fusão superior a 120 °C. O sorbitol apresentou temperatura de fusão em 75,51 °C.

A caracterização da T_g de polímeros é de difícil visualização por DSC, uma vez que o evento depende do teor de água presente na amostra (HATAKEYAMA; QUINN, 1999). Ainda, resultados para eventos endotérmicos em polímeros semelhantes aos estudados são relatados em maiores temperaturas.

Figura 13 – Curvas de DSC dos polímeros quitosana (QTS), poli(álcool vinílico) (PVA) e sorbitol (sorb) utilizados na obtenção dos filmes indicadores de pH

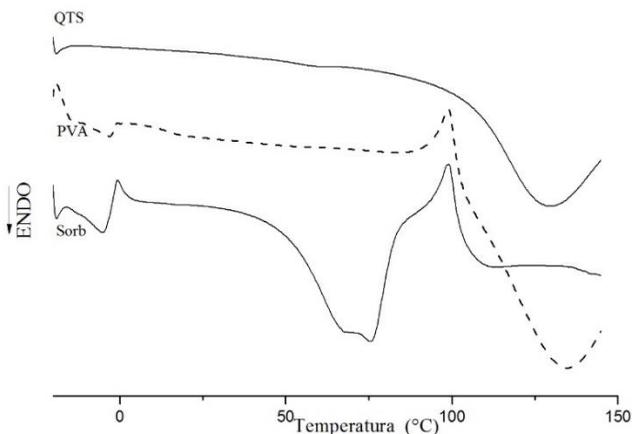
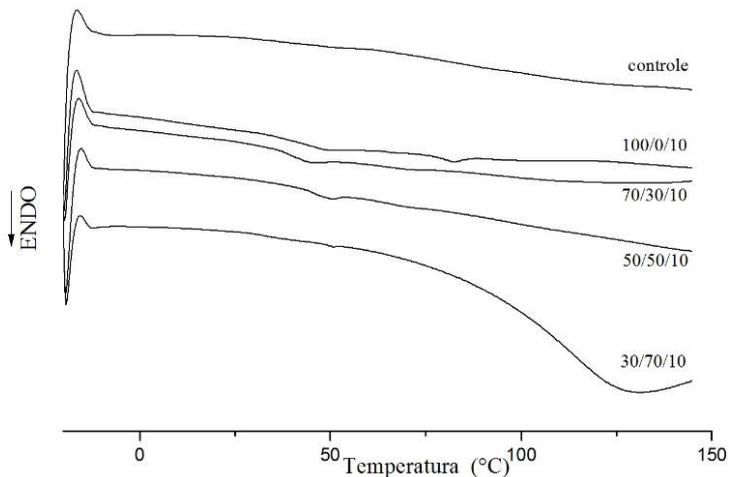


Figura 14 – Curvas de DSC dos biofilmes indicadores de pH



3.10 Eficiência da cor e pH

Os filmes indicadores de pH apresentaram alteração visível da cor quando em contato com as soluções de diferentes pH. A variação da cor foi reversível e dependente do pH. Em geral, a cor dos filmes variou do vermelho ao amarelo do pH 1,0 ao 12,0. A mudança de cor dos filmes ocorreu do vermelho vivo em pH 1,0, para rosa em pH 2,0 e 3,0. Em pH 4,0, os filmes começam a apresentar coloração tendendo ao roxo, que é notavelmente expresso em pH 5,0 e 6,0. Em pH 7,0 os filmes indicadores de pH apresentaram coloração azulada, que perdeu intensidade em pH 8,0 e se apresentou amarelo-esverdeada em pH superior a 9,0. A Figura 15 ilustra a variação da cor com o pH.

A variação da cor expressa pelos filmes pode, então, ser atribuída a presença das antocianinas na matriz filmogênica (KENNEDY; WATERHOUSE, 2000). Graças a estrutura química das ANT, elas são capazes de mudar a cor em decorrência do pH. Em condições de pH entre 1,0 e 3,0 as ANT existem predominantemente na forma do cátion

flavílico, que conforme mencionado, é responsável pela coloração roxo e vermelha dos filmes. Em pH 2,0 e 4,0 geralmente é expressa a cor azul devido a formação da base quinoidal. A medida em que o pH é aumentado, próximo a valores de 5,0 e 6,0 ocorre diminuição na intensidade da cor pela formação da pseudobase carbinol e de chalconas. Já em pH 7,0, a presença da cor roxa é referente a formação da anidrobases quinoidal. Em condições de pH básico, acima de 8,0, são formadas chalconas pela abertura do anel pirol principal, promovendo a formação de cor amarela (YOSHIDA et al., 2014).

Conforme, mencionado, a cor de cada filme no pH 7,0 foi utilizada como padrão na determinação do parâmetro ΔE . As características de cor dos filmes são expressas pelos parâmetros L^* , a^* e b^* na Tabela 9 e 10.

O parâmetro L^* apresenta valores elevados ($L^* > 60$) em todos os filmes, uma vez que os filmes tendem mais ao transparente do que ao preto. A formulação 30/70/10 apresentou menores valores de L^* para todos as condições de pH avaliados. Os filmes sofreram aumento em L^* quando em pH extremos, tanto ácido quanto básico. Pereira Jr. et al. (2015) encontrou comportamento contrário ao observado para o parâmetro em questão.

De acordo com a escala CIELab, o parâmetro a^* representa as cores que variam do verde ao vermelho. Os filmes expressaram valores positivos para a^* quando em pH ácido, o que corrobora com a coloração vermelha observada nos filmes. A cor vermelha é atribuída a presença do cátion *flavilium*, de formação característica de antocianinas em meio ácido (TERCI; ROSSI, 2002). A medida que o pH se torna alcalino a^* apresenta valores negativos ou muito próximo de zero.

Em contrapartida a cor vermelha-roxo expressa por a^* , o parâmetro b^* representa as cores entre o amarelo e o azul. Valores para $b^* > 0$ foram observados no filme controle. Os demais filmes sofreram aumento deste parâmetro em condições de pH básico (pH > 9,0), representando a expressão da cor amarela nos filmes indicadores de pH.

A partir dos dados de cor a^* e b^* pode-se determinar o valor que corresponde a cor propriamente dita que é expressada pelos filmes. A relação que estabelece a intensidade ou saturação da cor expressa por uma amostra é conhecida como Chroma (C^*). O Hue (H°) classifica a amostra com relação ao ângulo de matiz expresso pela cor (CHOURBERT; BACCAUNAUD, 2006). Assim, para determinação da cor dos filmes, se fez necessária a análise das coordenadas C^* e H° , uma vez que estes

excluem os interferentes relacionados a luminosidade (L^*) que tem pouca variação nos filmes estudados e não oferecem informações quanto a variação do pH.

Os parâmetros C^* e H° no filme controle não sofreram mudanças consideráveis no pH testado. O resultado era esperado, tendo em vista que esta formulação não contém pigmentos que sofram mudança de cor com a ação do pH. O filme controle sofreu solubilização completa quando em contato com as soluções de pH 1,0 e 2,0. A solubilização se deve a presença da QTS como único constituinte da matriz filmogênica, graças a afinidade (presença de cargas) do polímero ao pH ácido.

Os valores para a variação total da cor (ΔE) nos filmes indicadores de pH foram mais elevados em valores de pH extremos, o que justifica a mudança de cor observada visualmente. O comportamento de expressão da cor dos filmes indicadores de pH está de acordo com estudos semelhantes (YOSHIDA et al., 2014; PEREIRA JR. et al., 2015). O filme controle não apresentou variação no ΔE .

No filme 100/0/10 a maior variação da cor foi observada em pH 1,0 ($\Delta E = 30,96$) e 12,0 ($\Delta E = 25,41$). A variação da tonalidade foi maior para a cor vermelha do que para o amarelo. Da mesma forma, o filme 70/30/10 apresentou os máximos de variação em pH extremos. Porém, tom vermelho observado no pH 1,0 tem menor variação do que o amarelo (em relação ao pH 7,0). Já a formulação 50/50/10 teve ΔE distintos durante a interação com diferentes pH, sendo os seus valores máximos de variação em pH 2 ($\Delta E = 21,93$) e pH 10 ($\Delta E = 21,56$). O filme 30/70/10 apresentou melhor perfil de variação da cor, bem como da mudança de tonalidade com o pH, porém foi observada migração exagerada do pigmento para a solução tampão. Tendo em vista que tal característica pode afetar sua aplicação o filme 30/70/10 não foi utilizado para teste posteriores.

A partir das fotografias realizadas durante o estudo, pode-se observar a mudança de coloração dos filmes a de adição às soluções de pH e o momento de medição da cor. As antocianinas são pigmentos sensíveis a degradação térmica e a presença de luz quando em pH elevado. Uma vez que o experimento foi conduzido durante 24 horas sob temperatura ambiente (25 ± 2 °C) e em presença de luz, os filmes contendo pigmentos sofreram degradação de acordo com o pH.

Tabela 9 – Parâmetros L^* , a^* e b^* do filme controle em diferentes condições de pH

pH	Controle		
	L^*	a^*	b^*
1	-	-	-
2	-	-	-
3	$89,42 \pm 0,44$	$0,16 \pm 0,01$	$3,00 \pm 0,11$
4	$90,05 \pm 46,52$	$0,31 \pm 0,16$	$3,38 \pm 1,74$
5	$89,48 \pm 1,31$	$0,23 \pm 0,06$	$3,38 \pm 0,41$
6	$89,86 \pm 46,43$	$0,31 \pm 0,16$	$3,28 \pm 1,70$
7	$89,87 \pm 0,55$	$0,02 \pm 0,01$	$3,29 \pm 0,32$
8	$90,43 \pm 0,81$	$0,16 \pm 0,06$	$3,25 \pm 0,32$
9	$90,43 \pm 2,51$	$0,17 \pm 0,12$	$3,45 \pm 0,61$
10	$90,31 \pm 0,40$	$-0,11 \pm 0,04$	$3,81 \pm 0,07$
11	$98,62 \pm 0,63$	$-0,16 \pm 0,05$	$3,85 \pm 0,42$
12	$89,41 \pm 0,63$	$0,01 \pm 0,01$	$3,58 \pm 0,19$

Tabela 10 – Parâmetros L^* , a^* e b^* dos filmes indicadores de pH 100/0/10 e 70/30/10 em diferentes condições de pH

pH	100/0/10			70/30/10		
	L^*	a^*	b^*	L^*	a^*	b^*
1	80,21 ± 4,67	5,91 ± 1,52	3,69 ± 0,97	84,10 ± 1,79	8,12 ± 0,20	3,80 ± 0,35
2	69,75 ± 1,50	14,90 ± 0,40	2,86 ± 0,04	83,44 ± 0,11	8,74 ± 0,35	4,23 ± 0,03
3	76,50 ± 2,88	15,48 ± 0,83	5,40 ± 1,21	77,91 ± 4,15	5,75 ± 0,81	4,71 ± 0,43
4	75,54 ± 4,73	13,96 ± 2,81	4,36 ± 0,80	78,13 ± 2,60	8,58 ± 1,47	10,21 ± 1,15
5	62,74 ± 2,06	12,89 ± 1,03	2,26 ± 0,03	77,33 ± 3,03	6,03 ± 1,05	11,20 ± 0,83
6	62,94 ± 3,29	5,75 ± 1,45	1,35 ± 3,58	65,18 ± 3,10	2,90 ± 1,36	9,78 ± 0,83
7	61,74 ± 3,56	-1,29 ± 0,65	-8,45 ± 0,88	64,41 ± 1,99	-6,21 ± 0,73	-0,52 ± 1,42
8	62,49 ± 2,61	3,95 ± 5,19	-2,31 ± 0,19	64,36 ± 1,19	-3,13 ± 1,43	4,14 ± 1,38
9	74,60 ± 4,22	1,89 ± 0,26	2,76 ± 1,03	74,37 ± 1,21	-1,85 ± 0,58	10,83 ± 1,00
10	53,33 ± 4,17	4,42 ± 1,03	-2,39 ± 0,93	67,49 ± 1,81	1,17 ± 0,49	25,22 ± 1,37
11	67,06 ± 14,00	4,16 ± 1,38	8,84 ± 0,91	77,87 ± 1,49	1,14 ± 0,28	19,68 ± 1,55
12	70,46 ± 9,26	5,67 ± 1,81	15,40 ± 10,11	83,26 ± 1,01	2,27 ± 0,37	16,26 ± 1,59

Tabela 11 – Parâmetros L^* , a^* e b^* dos filmes indicadores de pH 50/50/10 e 30/70/10 em diferentes condições de pH

pH	50/50/10			30/70/10		
	L^*	a^*	b^*	L^*	a^*	b^*
1	76,03 ± 3,78	9,65 ± 1,65	4,27 ± 0,84	63,47 ± 5,33	26,77 ± 1,32	4,11 ± 0,58
2	84,10 ± 1,70	6,65 ± 0,40	4,58 ± 0,10	63,12 ± 2,95	26,34 ± 8,36	4,83 ± 2,04
3	74,34 ± 5,18	12,23 ± 4,16	8,38 ± 2,08	67,76 ± 5,48	19,74 ± 9,11	4,12 ± 1,86
4	73,88 ± 1,99	11,20 ± 0,84	12,04 ± 0,58	75,45 ± 2,17	10,06 ± 1,43	8,56 ± 1,03
5	73,52 ± 3,06	8,10 ± 1,47	12,02 ± 1,24	72,06 ± 3,51	6,72 ± 1,66	7,82 ± 0,90
6	67,09 ± 4,15	4,86 ± 0,80	11,70 ± 1,17	53,71 ± 27,73	6,19 ± 3,31	7,76 ± 4,02
7	63,21 ± 1,91	0,59 ± 0,25	6,79 ± 1,00	40,65 ± 8,63	3,16 ± 1,70	3,35 ± 1,00
8	77,57 ± 5,06	2,14 ± 1,36	6,61 ± 1,62	68,07 ± 8,04	2,56 ± 0,54	6,96 ± 0,68
9	78,92 ± 0,73	1,66 ± 0,57	9,61 ± 1,56	66,79 ± 4,71	3,20 ± 1,25	9,20 ± 2,49
10	70,19 ± 0,63	4,45 ± 1,11	26,98 ± 3,06	71,94 ± 4,90	4,58 ± 1,37	21,71 ± 6,24
11	78,43 ± 4,46	2,78 ± 1,16	19,30 ± 0,97	73,69 ± 7,06	3,44 ± 0,88	23,15 ± 1,63
12	78,93 ± 5,82	3,73 ± 2,50	19,67 ± 5,01	76,80 ± 1,53	3,95 ± 0,54	20,79 ± 1,00

O espectro de cores apresentado pelos filmes indicadores de pH está de acordo com o observado em estudos anteriores (PEREIRA JR. et al., 2015; YOSHIDA et al., 2014; WALLACH, 1996). Assim, os filmes estudados apresentam boa qualidade na expressão da cor quando submetidos a diferentes pH. Ainda, Wallach (1996) considera que o comportamento expresso pelos filmes é mais eficaz na determinação do pH do que sistemas a base de reações enzimáticas. Foi observado que a mudança na cor do filme pode ser invertida pela re-acidificação das soluções a pH ácido, quando estes ainda não atingiram pH elevado (BROUILLARD, 1982; CASTAÑEDA-OVANDO et al., 2009).

Tabela 12 – Coordenadas polares (C^* e H°) e variação total da cor (ΔE) dos filmes submetidos a faixa de pH entre 1,0 e 12,0

pH	controle			100/0/10			70/30/10			50/50/10			30/70/10		
	C^*	H°	ΔE	C^*	H°	ΔE	C^*	H°	ΔE	C^*	H°	ΔE	C^*	H°	ΔE
1	-	-	-	5,83	30,96	22,75	8,54	20,55	23,18	9,84	23,96	15,93	26,30	8,74	32,54
2	-	-	-	9,48	18,43	19,72	8,54	26,56	22,48	7,21	33,69	21,93	26,30	8,74	32,54
3	3,00	90	0,55	15,81	18,43	25,49	6,40	38,66	17,04	14,42	33,69	16,40	19,41	11,88	31,40
4	3,39	90	0,35	13,60	17,10	23,15	12,80	51,34	19,47	16,27	47,48	16,03	12,80	38,65	36,04
5	3,24	90	0,45	12,16	9,46	16,43	12,53	61,38	19,17	14,42	56,30	14,14	9,21	49,39	32,38
6	3,29	90	0,29	15,09	11,31	10,58	9,22	77,47	10,53	11,70	70,01	7,54	9,21	49,39	13,92
7	3,29	90	-	3,06	262,87	-	6,00	180	-	6,00	90,00	-	4,24	45,00	-
8	3,26	90	0,58	3,60	326,31	7,28	5,00	126,86	5,60	6,32	71,56	14,14	6,32	71,56	28,17
9	3,46	90	0,60	2,23	63,43	16,52	10,05	95,71	17,13	9,05	83,65	15,32	9,48	71,56	26,68
10	3,81	90	0,68	4,47	333,43	11,18	25,02	87,71	25,93	26,30	81,25	21,56	21,37	79,21	35,86
11	3,85	90	0,63	8,94	63,43	17,80	19,03	86,99	25,77	19,10	83,99	19,23	23,19	82,56	38,58
12	3,58	90	0,55	15,81	71,55	25,41	16,12	82,87	27,21	19,23	81,02	20,07	20,22	81,46	39,81

Figura 15 – Filmes submersos em solução tampão de diferentes pH

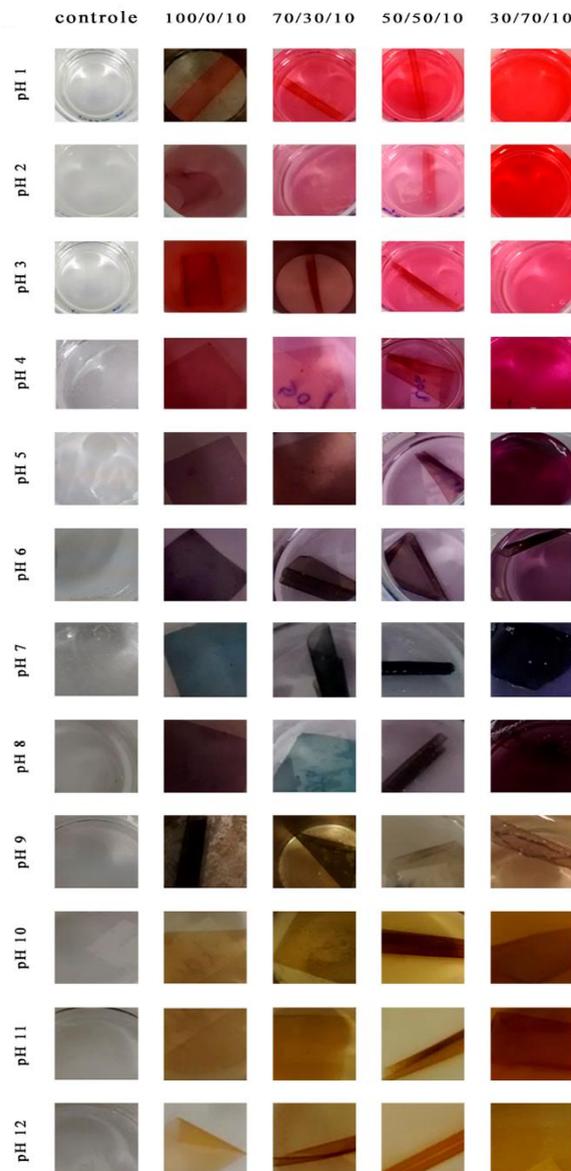
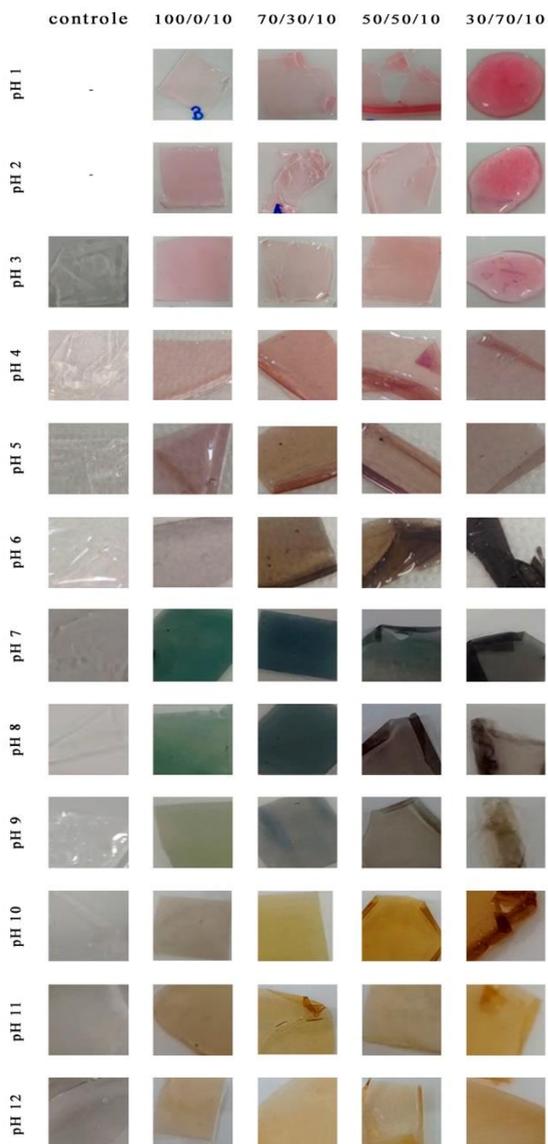


Figura 16 – Filmes após imersão durante 24 horas em solução tampão de diferentes pH



3.11 Eficiência da cor e crescimento microbiano

A deterioração dos alimentos pode ser causada em grande parte pelo desenvolvimento microbiano, o qual promove alterações químicas resultando em alteração de cor, odor, sabor, textura e aspecto dos alimentos. Estas alterações são consequência da atividade metabólica natural dos micro-organismos, que utilizam o alimento como fonte de energia (FRANCO; LANDGRAF, 2008).

Uma das aplicações do filme está relacionada com a possibilidade de observação indireta do grau de desenvolvimento bacteriano de um alimento ou meio de cultivo em função da modificação do pH. Tal contexto é evidenciado com a observação da variação da cor do filme indicador.

Os micro-organismos metabolizam carboidratos a fim de obter energia para seu crescimento. A metabolização pode ocorrer na presença de oxigênio (metabolismo oxidativo) ou na ausência (metabolismo fermentativo). A *E. coli* é uma bactéria capaz de produzir fermentação ácida mista, cujos produtos podem ser ácido lático, acético, succínico e fórmico. Durante esta fermentação há acúmulo de ácido e o pH pode atingir valores inferiores a 6 (FRANCO E LANDGRAF, 2008).

Ao contrário do que ocorre na deterioração de carboidratos, durante a degradação de substâncias proteicas observa-se uma elevação do pH. Geralmente, os micro-organismos utilizam apenas os peptídios e substâncias nitrogenadas não protéicas, uma vez que as proteínas são grandes demais para atravessarem a membrana plasmática. Podem ocorrer reações de desaminação redutora e oxidativa, descarboxilação, decomposição de radical do aminoácido, gerando diversos produtos metabólicos entre eles amônia, aminas e ureia (FRANCO E LANDGRAF, 2008).

Durante o ensaio realizado, a medida em que houve crescimento bacteriano, ocorreu mudança no pH devido ao metabolismo da bactéria não foi observada a presença do período de adaptação ao meio de inoculação (fase lag) devido a ativação da cepa seguida de inoculação em meios de cultivo nutricionalmente complexos que permitiram sua rápida adaptação, com elevada disponibilidade de nutrientes e incubação em sua temperatura ótima de crescimento. O experimento foi finalizado ao observar tendência de crescimento estacionário.

No tempo zero, os filmes apresentaram características de cor semelhante ao padrão, pela ação do pH. Os resultados referentes à

variação da cor em decorrência do crescimento bacteriano são exibidos na Tabela 13.

Tabela 13 - Crescimento microbiano, variação do pH e cor no filme controle e indicador de pH nos caldos nutriente (CN), carne (CA) e (VM/ VP) Vermelho de Metila/ Vogel Proskauer

Tempo (horas)	CN (UFC/mL)	pH	C*	H°	ΔE
0	1,8x10 ³	6,36	6,32	198,43	-
2	1,5x10 ⁴	6,45	6,40	141,34	6,40
4	1,6x10 ⁵	6,33	7,28	105,94	9,84
6	4,3x10 ⁵	6,39	10,19	101,30	14,96
24	3,6x10 ⁹	6,70	3,00	90,00	9,27
Tempo (horas)	CA (UFC/mL)	pH	C*	H°	ΔE
0	1,6x10 ³	5,57	17,26	79,99	-
2	1,2x10 ³	6,28	25,31	80,90	8,12
4	1,1x10 ³	5,45	24,68	68,62	18,11
6	2,1x10 ⁷	5,48	30,80	76,86	16,30
24	1,0x10 ⁸	5,25	21,47	62,24	11,57
Tempo (horas)	VM/ VP (UFC/mL)	pH	C*	H°	ΔE
0	1,4x10 ³	6,90	11,66	210,96	-
2	1,5x10 ³	6,81	4,00	180,00	8,54
4	8,5x10 ⁴	6,79	3,60	146,30	11,74
6	2,1x10 ⁶	6,78	6,70	116,56	15,55
24	5,7x10 ⁸	5,22	24,73	75,96	38,01

A medida em que a *E.coli* se desenvolveu ocorreu alteração do pH nos meios de cultura. Os valores de pH tiveram flutuações enquanto checados durante as 24 de análise. A ocorrência se deve a adaptação do microrganismo ao meio pela produção de metabólitos. O crescimento e a variação do pH nos caldos contendo o filme indicador de pH e nos caldos contendo o filme controle ocorreram de forma semelhante, de acordo com o meio.

A inoculação no CN demonstrou que o crescimento microbiano favoreceu o aumento do pH. Assim, o filme indicador de pH adquiriu cor característica de sistemas com pH básico, que pode ser observado pela variação do H° no T0 para o T24. Neste caldo, a maior variação na cor do filme foi expressa no T6. Uma vez que o CN é composto de extrato de carne (3g) e peptona (5g). A deterioração causada no CN é decorrente da

degradação proteica, que pela formação de compostos nitrogenados e amônia tende a elevar o pH do meio (FRANCO; LANDGRAF, 2008).

Já os caldos CA e VM/ VP sofreram diminuição do pH a medida em que ocorreu o crescimento da *E. coli*. O filme no CA apresentou elevado ΔE , embora tenha expressado a cor em tons próximos (H° entre 62,24 e 80,90). O comportamento ideal para a mudança da cor foi observado no filme do caldo VM/ VP, apresentando variação da cor mais elevada (ΔE 38,01) gradativa (H° de 210,96 para 75,96) a medida em que o pH diminuiu.

O caldo VM/ VP, apresenta em sua composição peptona (7g) e glicose (5g), em pH 6,90. O CA foi elaborado com base na composição do VM/ VP, portanto tem em sua composição o extrato de carne e a glicose. Nestes meios foi observada a diminuição do pH, indicativo do metabolismo da glicose pela formação de ácidos (FRANCO; LANDGRAF, 2008).

O filme controle não apresentou modificação na cor durante o período testado. Em geral, o CN apresentou pouca variação da cor em comparação com os demais, porém todos os meios de culturas se demonstraram adequados para avaliação da eficiência do filme indicador de pH.

O mesmo filme (70/30/10) submetido a meios de cultura distintos apresentou variação da cor de acordo com o metabolismo da bactéria no meio analisado. O filme também teve eficaz mudança de cor mesmo em pequenas mudanças nas condições de pH, corroborando com os resultados dos parâmetros da cor (Tabela 4). Assim, o filme indicador de pH é considerado aplicável em diversas matrizes alimentares, uma vez que permite a mudança considerável de coloração quando a deterioração do alimento acarreta na acidificação ou basificação do meio.

3.12 Ativação do filme indicador de pH

Os filmes 70/30/10 + EC25/25, 70/30/10 + EC35/15 e 70/30/10 + EC50/0 apresentaram tons próximo ao vermelho ($H^\circ < 15$) e se classificaram com maior ΔE do que os filmes obtidos do EH. As diferenças na cor apresentadas pela adição dos extratos EC e EH aos filmes são apresentadas na Figura 17 e seus parâmetros expressos nas Tabelas 14 e 15.

Figura 17 – Expressão da cor dos filmes com extratos de antocianinas



Tabela 14 – Parâmetros L^* , a^* e b^* para os filmes obtidos a partir do extrato de antocianina

	L^*	a^*	b^*
70/30/10 + EC25/25	60,93	57,65	14,44
70/30/10 + EC35/15	54,97	55,32	15,23
70/30/10 + EC50/0	59,67	57,35	11,77
70/30/10 + EH25/25	66,89	44,10	3,10
70/30/10 + EH35/15	81,54	9,63	1,34
70/30/10 + EH50/0	76,59	17,81	6,35
controle	92,68	0,04	3,30
Azul Bromotimol	68,27	2,81	56,17
70/30/10	36,97	2,78	-14,34

Tabela 15 – Coordenadas C^* e H° e variação total da cor dos filmes obtidos a partir dos extratos de antocianina EC e EH

Filme	C^*	H°	ΔE
70/30/10 + EC25/25	58,69	13,79	66,28
70/30/10 + EC35/15	57,00	15,25	67,91
70/30/10 + EC50/0	58,05	10,92	66,34
70/30/10 + EH25/25	44,00	3,00	51,10
70/30/10 + EH35/15	9,05	6,34	14,35
70/30/10 + EH50/0	17,00	6,00	23,53

Para determinação da eficiência dos filmes indicadores de pH, foram escolhidas as formulações 70EC25/25, 70EC35/15 e 70EC50/0 dos filmes contendo os extratos, caracterizadas como as mais promissoras para variação da cor.

O pH inicial do pescado foi de 6,40, que sofreu aumento após 5 dias, chegando em valor final de 7,43. O pH do pescado naturalmente se apresenta próximo a neutralidade o que favorece a atuação da microbiota deteriorante. Assim, os filmes testados sofreram variação na tonalidade da cor com o acréscimo do pH. Inicialmente se apresentavam sob a coloração vermelha ($H^\circ \approx 15$) que no final do experimento se caracterizou como amarelo tendendo ao verde ($H^\circ > 90$). A intensidade da cor ($C^* \approx 60$) se manteve nos filmes 70EC25/25, 70EC35/15 e 70EC50/0.

O filme 70/30/10 contendo as antocianinas comerciais apresentou menor variação na tonalidade e menor ΔE dentre os filmes testados. A formulação contendo o corante azul de bromotimol como indicador de pH demonstrou comportamento satisfatório de mudança de cor. O filme controle, mais uma vez, não se demonstrou efetivo na variação da cor em decorrência da deterioração do pescado.

Tabela 16 – Coordenadas C^* e H° e variação total da cor dos filmes em ativação em matriz alimentar

	70/30/10 + EC25/25			70/30/10 + EC35/15			70/30/10 + EC50/0		
	C^*	H°	ΔE	C^*	H°	ΔE	C^*	H°	ΔE
DIA 1	58,69	13,79	-	57,00	15,25	-	58,05	10,92	-
DIA 2	57,00	15,25	3,74	46,17	17,65	14,89	57,00	15,25	4,58
DIA 5	35,00	90,00	60,82	29,61	101,68	62,87	8,60	144,46	64,00

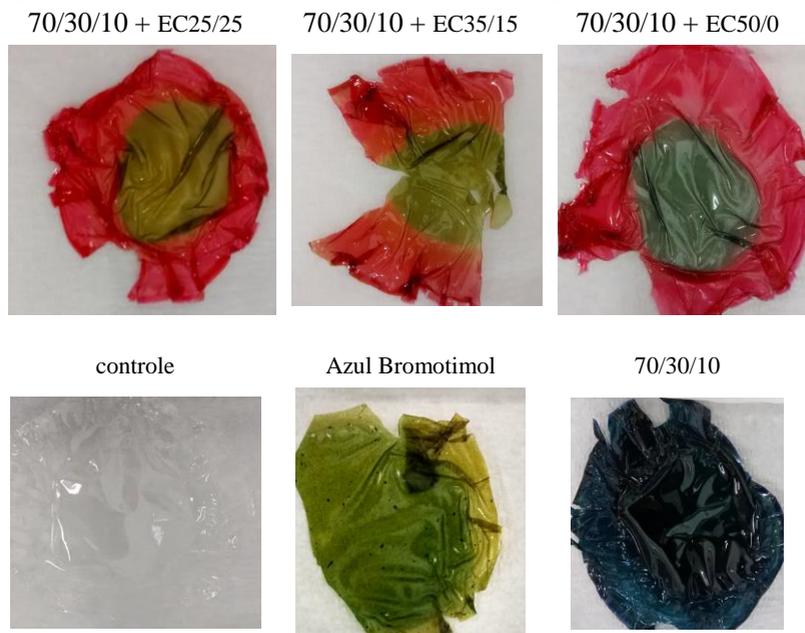
	Azul Bromotimol			70/30/10			controle		
	C^*	H°	ΔE	C^*	H°	ΔE	C^*	H°	ΔE
DIA 1	56,03	87,95	-	14,14	278,13	-	3,00	90,00	-
DIA 2	50,15	94,57	11,66	6,00	270,00	13,74	3,00	90,00	3,00
DIA 5	32,28	106,18	35,70	3,60	213,69	17,02	3,00	90,00	3,00

Os filmes contendo as micropartículas do extrato EC são efetivos na determinação do grau de deterioração de alimentos perecíveis. Ainda, pouca variação no pH é necessária para desencadear a ativação e expressão da cor nos filmes.

Com base nos resultados obtidos para a aplicação do filme 70/30/10 tanto no pescado quanto no crescimento microbiano (Figura 18), a mudança de cor apresentada classifica o filme como potencial aplicação

na indústria alimentar. Os valores para ΔE e a variação no H° para ambas as análises sugerem efetividade na determinação indireta da deterioração de alimentos perecíveis.

Figura 18 – Ativação dos filmes em matriz alimentar após 5 dias



Da mesma forma, os filmes obtidos a partir do EC expuseram comportamento ideal na mudança de cor durante a deterioração do pescado. As antocianinas empregadas permitiram a visualização facilitada da mudança de cor, fazendo com que os filmes tenham potencial aplicação na segurança alimentar.

Assim, caso estes alimentos sejam submetidos a condições de temperatura que favoreça o crescimento de micro-organismos, um sistema de embalagem contendo os filmes 70/30/10, 70/30/10+EC25/25, 70/30/10+EC35/15 e o 70/30/10+EC50/0 será capaz de determinar a deterioração por meio de mudança visual na cor da embalagem.

CONCLUSÃO

Os filmes com maior teor de QTS se apresentaram mais resistentes, porém mais rígidos. As formulações contendo maior proporção de PVA tiveram maior alongação. O ângulo de contato formado pelo filme 70/30/10 em água, foi maior do que os demais filmes testados, indicando maior hidrofobicidade por esta formulação. Os filmes contendo antocianinas sofreram influência do pH nos parâmetros de cor, conforme esperado. A formulação 70/30/10 teve melhor variação da cor em detrimento da mudança do pH. A interação entre os polímeros e a adição de ANT nos filmes foram confirmadas por espectroscopia no IV e por DSC. A mudança da cor ocorreu nos filmes testados de acordo com a mudança nas condições de pH dos ensaios microbiológico e na matriz do pescado. Os resultados mostraram que os filmes indicadores de pH testados apresentam sensibilidade a mudança do pH. Assim, quando em um sistema de embalagem inteligente, são eficazes na determinação indireta da deterioração de um alimento perecível. Ainda, os extratos de antocianinas apresentaram maior expressão da cor quando obtidos a partir do extrato concentrado. A aplicação dos extratos de antocianinas do repolho roxo nos filmes de quitosana e PVA testados tiveram melhor expressão da cor frente a determinação da deterioração no pescado do que os filmes contendo extrato de antocianinas comercial.

REFERÊNCIAS

ABDELAAL, M. Y., ABDEL-RAZIK, E. A., ABDEL-BARY, E. M., EL-SHERBINY, I. M. Chitosan-based interpolymeric pH-responsive hydrogels for in vitro drug release. **Journal of applied polymer science**, v. 103, n. 5, p. 2864-2874, 2007.

AKHTAR, M. J., JACQUOT, M., JASNIEWSKI, J., JACQUOT, C., IMRAN, M., JAMSHIDIAN, M., DESOBRY, S. Antioxidant capacity and light-aging study of HPMC films functionalized with natural plant extract. **Carbohydrate polymers**, v. 89, n. 4, p. 1150-1158, 2012.

ARGIN-SOYSAL, SANEM; KOFINAS, PETER; LO, Y. MARTIN. Effect of complexation conditions on xanthan–chitosan polyelectrolyte complex gels. **Food hydrocolloids**, v. 23, n. 1, p. 202-209, 2009.

ARVANITOYANNIS, I.; KOLOKURIS, I.; NAKAYAMA, A.; YAMAMOTO, N.; AIBA, S. Physico-chemical studies of chitosan-poly(vinylalcohol) blends plasticized with sorbitol and sucrose. **Carbohydrate Polymers**, v. 34, p. 9 -19, 1997.

BARRETO, PEDRO LUIZ MANIQUE. Propriedades físico-químicas de soluções formadoras e de filmes de caseinato de sódio plastificados como sorbitol. 2003.

BERCEA, M., BIBIRE, E. L., MORARIU, S., TEODORESCU, M., CARJA, G. pH influence on rheological and structural properties of chitosan/poly (vinyl alcohol)/layered double hydroxide composites. **European Polymer Journal**, v. 70, p. 147-156, 2015.

BONARDD, S., SCHMIDT, M., SAAVEDRA-TORRES, M., LEIVA, A., RADIC, D., SALDÍAS, C. Thermal and morphological behavior of chitosan/PEO blends containing gold nanoparticles. Experimental and theoretical studies. **Carbohydrate polymers**, v. 144, p. 315-329, 2016.

BONILLA, J., FORTUNATI, E., ATARÉS, L., CHIRALT, A., KENNY, J. M. Physical, structural and antimicrobial properties of poly vinyl alcohol–chitosan biodegradable films. **Food Hydrocolloids**, v. 35, p. 463-470, 2014.

BORIWANWATTANARAK, P.; INGKANINAN, K.; KHORANA, N.; VIYOCH, J. Development of curcuminoids hydrogel patch using chitosan from various sources as controlled-release matrix. **International journal of cosmetic science**, v. 30, n. 3, p. 205-218, 2008.

BRINE, Charles J. et al. Advances in chitin and chitosan. **Elsevier Applied Science**, 1992.

BROUILLARD, R. Chemical structure of anthocyanins. **Academic Press: New York**, 1982.

BROUILLARD, R. The in vivo expression of anthocyanin colour in plants. **Phytochemistry**, v. 22, n. 6, p. 311-23, 1983.

BROUILLARD, R.; DANGLES, O. Anthocyanin molecular interactions: the first step in the formation of new pigments during wine aging. **Food Chemistry**, v. 51, n. 4, p. 365-371, 1994.

CANER, C.; VERGANO, P. J.; WILES, J. L. Chitosan film mechanical and permeation properties as affected by acid, plasticizer, and storage. **Journal of food science**, v. 63, n. 6, p. 1049-1053, 1998.

CARVALHO, SABRINA MATOS. Incorporação de nanopartículas lipídicas sólidas contendo alfa-tocoferol em filmes de álcool polivinílico. 2013. Tese de Doutorado. Universidade Federal de Santa Catarina.

CASTANEDA-OVANDO, A., DE LOURDES PACHECO-HERNÁNDEZ, M., PÁEZ-HERNÁNDEZ, M. E., RODRÍGUEZ, J. A., GALÁN-VIDAL, C. A. Chemical studies of anthocyanins: A review. **Food chemistry**, v. 113, n. 4, p. 859-871, 2009.

DAMODARAN, Srinivasan; PARKIN, Kirk L.; FENNEMA, Owen R. Química de alimentos de Fennema. Artmed, 2010.

DYRBY, M.; WESTERGARD, N.; STAPELFELDT, H. Light and heat sensitivity of red cabbage extract in soft drink models systems. **Food Chemistry**, v. 72, p. 431-437, 2001.

EL-HEFIAN, ESAM A.; NASEF, MOHAMED MAHMOUD; YAHAYA, ABDUL HAMID. Preparation and characterization of chitosan/poly (vinyl alcohol) blended films: mechanical, thermal and surface investigations. **Journal of Chemistry**, v. 8, n. 1, p. 91-96, 2011.

FRANCO, BERNADETTE DORA GOMBOSSY DE MELO; LANDGRAF, MARIZA. Microbiologia dos alimentos. In: Microbiologia dos alimentos. Atheneu, 2003.

GIORDANO, F.; NOVAK, C.; MOYANO, J. R. Thermal analysis of cyclodextrins and their inclusion compounds. **Thermochemica Acta**, v. 380, n. 2, p. 123-151, 2001.

GÓMEZ-ESTACA, J., GÓMEZ-GUILLÉN, M. C., FERNÁNDEZ-MARTÍN, F., MONTERO, P. Effects of gelatin origin, bovine-hide and tuna-skin, on the properties of compound gelatin–chitosan films. **Food Hydrocolloids**, v. 25, n. 6, p. 1461-1469, 2011.

GONÇALVES, ALEX AUGUSTO. Tecnologia do pescado: ciência, tecnologia, inovação e legislação. São Paulo: Atheneu, 2011.

HATAKEYAMA, T.; QUINN, F. X. Fundamentals and applications to polymer science. Thermal Analysis, 1994.

HOSSEINI, M. H.; RAZAVI, S. H.; MOUSAVI, M. A. Antimicrobial, physical and mechanical properties of chitosan-based films incorporated with thyme, clove and cinnamon essential oils. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 33, n. 6, p. 727-743, 2009.

HOU, Z., ZHANG, M., LIU, B., YAN, Q., YUAN, F., XU, D., GAO, Y. Effect of chitosan molecular weight on the stability and rheological properties of β -carotene emulsions stabilized by soybean soluble polysaccharides. **Food Hydrocolloids**, v. 26, n. 1, p. 205-211, 2012.

HRAZDINA, G.; IREDALE, H.; MATTICK, L. R. Anthocyanin composition of Brassica oleracea cv. Red Danish. **Phytochemistry**, v. 16, n. 2, p. 297-299, 1977.

JACKMAN, R.L. SMITH, J.L. Anthocyanins and betalains. In: Hendry, G.A.F. and Houghton, J.D. **Natural Food Colorants**. London: Blackie Academic, pp. 183-241, 1992.

JIANG, Y.; LI, J.; JIANG, W. Effects of chitosan coating on shelf life of cold-stored litchi fruit at ambient temperature. **LWT - Food Sci Technol**. v. 38, p. 757-761, 2005.

KAYAL, S.; RAMANUJAN, R. V. Doxorubicin loaded PVA coated iron oxide nanoparticles for targeted drug delivery. **Materials Science and Engineering: C**, v. 30, n. 3, p. 484-490, 2010.

KENNEDY, JAMES A.; WATERHOUSE, ANDREW L. Analysis of pigmented high-molecular-mass grape phenolics using ion-pair, normal-phase high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 866, n. 1, p. 25-34, 2000.

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

LEVI, M. A. B., SCARMINIO, I. S., POPPI, R. J., TREVISAN, M. G. Three-way chemometric method study and UV-Vis absorbance for the study of simultaneous degradation of anthocyanins in flowers of the *Hibiscus rosa-sinensis* species. **Talanta**, v. 62, n. 2, p. 299-305, 2004.

LEWANDOWSKA, Katarzyna. Influence of molecular weight on structure and rheological properties of microcrystalline chitosan mixtures. **International journal of biological macromolecules**, v. 79, p. 583-586, 2015.

MARTINEZ, A.; CHORNET, E.; RODRIGUE, D. Steady-shear rheology of concentrated chitosan solutions. **Journal of Texture studies**, v. 35, n. 1, p. 53-74, 2004.

MATHUR, N. K.; NARANG, C. K. – **J. Chem. Educ.**, 67 (11), p.938 (1990).

MORETTO, E.; FETT, R. Manual de aditivos para indústrias de alimentos. 2ª Edição, 1988.

MOUSSOUT, H., AHLAFI, H., AAZZA, M., BOURAKHOUADAR, M. Kinetics and mechanism of the thermal degradation of biopolymers chitin and chitosan using thermogravimetric analysis. **Polymer Degradation and Stability**, v. 130, p. 1-9, 2016.

MUZZARELLI, C., TOSI, G., FRANCESCANGELI, O., MUZZARELLI, R. A. Alkaline chitosan solutions. **Carbohydrate research**, v. 338, n. 21, p. 2247-2255, 2003.

NEAMTU, I., CHIRIAC, A. P., NITA, L. E., BERCEA, M., STOLERIU, A. Investigation of poly (aspartic acid)/vinyl polymer interpolymer complex. **Journal of optoelectronics and advanced materials**, v. 9, n. 4, p. 981-984, 2007.

TANGPASUTHADOL, Varawut; PONGCHAISIRIKUL, Noppong; HOVEN, Vipavee P. Surface modification of chitosan films.: Effects of hydrophobicity on protein adsorption. **Carbohydrate Research**, v. 338, n. 9, p. 937-942, 2003.

NORONHA, C. M.; DE CARVALHO, S. M.; LINO, R. C.; BARRETO, P. L. M. Characterization of antioxidant methylcellulose film incorporated with α -tocopherol nanocapsules. **Food Chemistry**, v. 159, p. 529–535, 2014.

PARK, S.; ZHAO, Y. Incorporation of a high concentration of mineral or vitamin into chitosan-based films. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 1933-1939, 2004.

PARPARITA, Elena; CHEABURU, Catalina Natalia; VASILE, CORNELIA. Morphological, thermal and rheological characterization of polyvinyl alcohol/chitosan blends. **Cellulose Chem. Technol**, v. 46, p. 571-581, 2012.

PEREIRA, VALDIR ANICETO; DE ARRUDA, IZA NATÁLIA QUEIROZ; STEFANI, RICARDO. Active chitosan/PVA films with anthocyanins from Brassica oleraceae (Red Cabbage) as time–

temperature indicators for application in intelligent food packaging. **Food Hydrocolloids**, v. 43, p. 180-188, 2015.

PINOTTI, A., GARCÍA, M. A., MARTINO, M. N., ZARITZKY, N. E. Study on microstructure and physical properties of composite films based on chitosan and methylcellulose. **Food Hydrocolloids**, v. 21, n. 1, p. 66-72, 2007.

QUINQUENET, S., OLLIVON, M., GRABIELLE-MADELMONT, C., SERPELLONI, M. Polimorphism of hydrated sorbitol. **Thermochimica acta**, v. 125, p. 125-140, 1988.

ROSA, CLEONICE GONÇALVES DA. Síntese e caracterização de nanopartículas de zeína carregadas com óleos essenciais para aplicação em filmes nanocompósitos de poli (óxido etileno). 2016.

ROTTA, J., OZÓRIO, R. Á., KEHRWALD, A. M., DE OLIVEIRA BARRA, G. M., AMBONI, R. D. D. M. C., BARRETO, P. L. M. Parameters of color, transparency, water solubility, wettability and surface free energy of chitosan/hydroxypropylmethylcellulose (HPMC) films plasticized with sorbitol. **Materials Science and Engineering: C**, v. 29, n. 2, p. 619-623, 2009.

SALMIERI, STÉPHANE; LACROIX, MONIQUE. Physicochemical properties of alginate/polycaprolactone-based films containing essential oils. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 26, p. 10205-10214, 2006.

SANTOS, J. E., DA SOARES, J., DOCKAL, E. R., FILHO, S. P. C., CAVALHEIRO, É. T. Caracterização de quitosanas comerciais de diferentes origens. **Polimeros Ciencia e Tecnologia**, v. 13, n. 4, p. 242-249, 2003.

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

TERCI, DANIELA BROTTLO LOPES; ROSSI, ADRIANA VITORINO. Natural pH indicators: using paper or solution?. *Química Nova*, v. 25, n. 4, p. 684-688, 2002.

WANG, XIAOHUAN; SUN, RUZHONG; WANG, CHUANYI. pH dependence and thermodynamics of Hg (II) adsorption onto chitosan-poly (vinyl alcohol) hydrogel adsorbent. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 441, p. 51-58, 2014.

WROLSTAD, R. E. Anthocyanin pigments—Bioactivity and coloring properties. **Journal of Food Science**, v. 69, n. 5, p. C419-C425, 2004.

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

YOSHIDA, CRISTIANA MP; OLIVEIRA JUNIOR, ENIO NAZARÉ; FRANCO, TELMA TEIXEIRA. Chitosan tailor-made films: the effects of additives on barrier and mechanical properties. **Packaging Technology and Science**, v. 22, n. 3, p. 161-170, 2009.

YOSHIDA, C. M., MACIEL, V. B. V., MENDONÇA, M. E. D., FRANCO, T. T. Chitosan biobased and intelligent films: Monitoring pH variations. **LWT-Food Science and Technology**, v. 55, n. 1, p. 83-89, 2014.

ZHOU, H. Y., JIANG, L. J., CAO, P. P., LI, J. B., CHEN, X. G. Glycerophosphate-based chitosan thermosensitive hydrogels and their biomedical applications. **Carbohydrate polymers**, v. 117, p. 524-536, 2015.

ZHUANG, P. Y., LI, Y. L., FAN, L., LIN, J., HU, Q. L. Modification of chitosan membrane with poly (vinyl alcohol) and biocompatibility evaluation. **International journal of biological macromolecules**, v. 50, n. 3, p. 658-663, 2012.