



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CAMPUS BLUMENAU
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NANOCIÊNCIA, PROCESSOS E
MATERIAIS AVANÇADOS

Amanda Fernandes Bambinetti

Preparação de filmes de Etil(hidroxietil) celulose (EHEC) contendo antocianinas
derivadas de extrato de amoras para aplicação em embalagens inteligentes para
alimentos

Blumenau
2025

Amanda Fernandes Bambinetti

Preparação de filmes de etil hidroxietil celulose (EHEC) contendo antocianinas derivadas de extrato de amoras para aplicação em embalagens inteligentes para alimentos

Dissertação submetida ao Programa de Pós graduação em Nanociência, Processos e Materiais Avançados da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) como requisito parcial para obtenção do título de mestre.

Orientadora: Prof. Patrícia Bulegon Brondani

Co-orientador: Prof. Ismael Casagrande Bellettini

Blumenau

2025

BAMBINETTI, AMANDA FERNANDES

Preparação de filmes de Etil(hidroxietil) celulose (EHEC) contendo antocianinas derivadas de extrato de amoras para aplicação em embalagens inteligentes para alimentos / AMANDA FERNANDES BAMBINETTI ; orientadora, Patrícia Bulegon Brondani, coorientador, Ismael Casagrande Bellettini, 2025.

69 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Campus Blumenau, Programa de Pós-Graduação em Nanociência, Processos e Materiais Avançados, Blumenau, 2025.

Inclui referências.

1. Nanociência, Processos e Materiais Avançados. 2. Filmes poliméricos. 3. Antocianinas. 4. Embalagem inteligente. I. Brondani, Patrícia Bulegon . II. Bellettini, Ismael Casagrande . III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Nanociência, Processos e Materiais Avançados. IV. Título.

Amanda Fernandes Bambinetti

Preparação de filmes de Etil(hidroxietil) celulose (EHEC) contendo antocianinas derivadas de extrato de amoras para aplicação em embalagens inteligentes para alimentos

O presente trabalho em nível de mestrado foi avaliado e aprovado por banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof.(a) Dr.(a) Lidiane Meier
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof.(a) Dr.(a) Claudia Merlini
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Dr. Rogério Gariani
Universidade Estadual de Santa Catarina

Certificamos que esta é a versão original e final do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de Mestre em Nanociência, Processos e Materiais Avançados.



Documento assinado digitalmente
Daniela Brondani
Data: 07/11/2025 09:18:07-0300
CPF: ***.803.190-**
Verifique as assinaturas em <https://v.ufsc.br>

Coordenação do Programa de Pós-Graduação



Documento assinado digitalmente
Patrícia Bulegon Brondani
Data: 07/11/2025 09:11:31-0300
CPF: ***.102.500-**
Verifique as assinaturas em <https://v.ufsc.br>

Prof.(a) Dr.(a) Patrícia Bulegon Brondani
Orientadora

Blumenau, 2025

RESUMO

Embalagens inteligentes têm se tornado foco de vários estudos, devido à sua vasta aplicabilidade no setor de alimentos, facilitando a compra e a verificação da qualidade do produto antes de ser consumido. Essas características podem ser obtidas por meio da utilização de filmes poliméricos atóxicos, não solúveis em água, contendo indicadores de frescor, pH ou temperatura. Nesse sentido, embalagens formadas por filmes poliméricos contendo antocianinas podem ser uma opção interessante. Antocianinas são compostos presentes em frutas, verduras e vegetais, que possuem um poder de alteração de coloração em diferentes pHs, além de possuírem propriedades antioxidantes e antimicrobianas. No entanto, após extraídas, as antocianinas apresentam baixa estabilidade, podendo essa ser aumentada, por exemplo, pela esterificação de um ou mais de seus grupamentos hidroxila. O objetivo do presente estudo foi realizar a esterificação das antocianinas derivadas de extrato de amoras diretamente em filmes de etil-hidroxietil celulose (EHEC) bio-oxidados, a fim de utilizá-los no desenvolvimento de embalagens inteligentes para alimentos. A ligação covalente das antocianinas em filmes não é comum, apesar de poder ajudar na estabilidade e durabilidade do filme. Inicialmente, foi preparado um extrato de amoras através da sonicação das frutas congeladas em uma mistura de etanol e HCl (80:20). O extrato foi analisado por espectroscopia de UV-VIS em diferentes valores de pH e, o teor de antocianinas totais foi de 0,42 mg por mL de extrato. A segunda etapa foi a produção de filmes de EHEC insolúveis em água através da otimização do processo de reticulação, que levou à produção de um filme ótimo através da reação em água utilizando o agente reticulante glioxal (10% m/m) em 4 h de reação a 80°C. Para que fosse possível realizar a ligação covalente das antocianinas, o filme de EHEC foi bio-oxidado utilizando a enzima lacase (*Pleurotus ostreatus*) e o mediador TEMPO (2,2,6,6-tetrametilpiperidina-1-oxil). O tempo de oxidação padronizado foi de 2 horas, em sistema oxigenado à temperatura ambiente. Após a bio-oxidação, o extrato contendo antocianinas foi reagido com o filme para formação de ligações éster. A reação foi conduzida a 25 °C, na presença ou ausência de agentes copigmentantes (ácido cafeico, ácido ascórbico e anidrido maleico). O filme com melhor desempenho foi obtido após 2 horas de reação, na presença de ácido ascórbico como agente. As caracterizações do filme, realizadas por espectroscopia UV-Vis e FTIR, confirmaram o sucesso do processo, evidenciando a presença das antocianinas no filme mesmo após diversas lavagens, além de demonstrar que o material é capaz de sofrer variações de cor em função do pH. Os filmes produzidos se mantiveram estáveis por 90 dias. Por fim, a análise de monitoramento de degradação do alimento mostrou que o filme desenvolvido possui potencial para ser utilizado em embalagens alimentícias, oferecendo uma alternativa sustentável para o controle da qualidade do produto ao longo do tempo.

Palavras-chave: Embalagens inteligentes; Antocianinas; Indicador de pH; etil-hidroxietil celulose; Bio-oxidação.

ABSTRACT

Intelligent packaging has garnered attention in numerous studies due to its wide-ranging potential in the food industry, facilitating product purchase and quality verification before consumption. These features can be achieved using non-toxic, water-insoluble polymer films embedded with freshness, pH, or temperature indicators. In this context, packaging made from polymer films containing anthocyanins may be a promising option. Anthocyanins are compounds found in fruits, vegetables, and plants, which can change color at different pH levels. However, after extraction, anthocyanins tend to be unstable; however, this instability can be improved, for example, by esterifying one or more hydroxyl groups. This study aimed to covalently attach anthocyanins derived from blackberry extract to biooxidized ethyl-hydroxyethyl cellulose (EHEC) films for the development of smart food packaging. Covalent bonding of anthocyanins in films is rare but could enhance the stability and durability of the material. First, a blackberry extract containing anthocyanins was prepared by sonication of frozen fruits in a mixture of ethanol and HCl (80:20). UV-VIS analysis at different pH values revealed a total anthocyanin content of 0.42 mg/mL in the extract. Next, water-insoluble EHEC films were produced through optimized crosslinking, resulting in an optimal film by reacting the water-solubilized EHEC polymer with glyoxal (10% m/m) for 4 hours at 80°C. To enable covalent bonding with anthocyanins, the EHEC film was biooxidized using the enzyme laccase (*Pleurotus ostreatus*) and the mediator TEMPO (2,2,6,6-tetramethylpiperidine-1-oxyl). The optimal oxidation time was 2 hours in an oxygenated system at room temperature. After biooxidation, the anthocyanin-containing extract was reacted with the film to form ester bonds. This reaction was conducted at room temperature (25°C) with or without additives, including caffeic acid, ascorbic acid, and maleic anhydride. The best results were obtained after 2 hours at room temperature, using ascorbic acid. UV and FTIR analysis of the film confirmed the successful incorporation and stability of anthocyanins, showing the material's capacity to change color in response to pH. Finally, food degradation monitoring demonstrated that the developed film has potential for use in food packaging, offering a sustainable alternative to maintain product quality over time.

Keywords: Smart packaging; Anthocyanins; pH indicator, ethyl-hydroxyethyl cellulose, bio-oxidation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Amoras Pretas.....	15
Figura 2 - Estrutura Química das antocianinas.....	16
Figura 3 - Estruturas químicas das antocianinas e suas colorações	17
Figura 4 - Coloração das antocianinas em diferentes ambientes de pH	17
Figura 5 - Ripesense	20
Figura 6 - Estrutura química da etil hidroxietil celulose (EHEC)	22
Figura 7 - Estruturas químicas do glutaraldeído e do glioxal	23
Figura 8 - Mecanismo de oxidação de compostos catalisados por lacase/TEMPO/O ₂	29
Figura 9 - Etapas da metodologia.....	30
Figura 10 – Processo de extração.....	38
Figura 11 – Espectro de absorbância do extrato de amoras em diferentes pHs.	39
Figura 12 - Glioxal atuando como agente reticulante nos filmes a base de EHEC...41	
Figura 13 - Esquema de reticulação do EHEC com os agentes reticulantes	42
Figura 14 - Esquema de oxidação dos filmes.....	44
Figura 15 - Espectros de FTIR para avaliação dos filmes bio-oxidados e não oxidados. (A) - Amostra de filme de EHEC reticulado com Glioxal, sem o processo de biooxidação. (B)- Amostra de filme de EHEC reticulado com Glioxal, bio-oxidado por 1 hora. (C) - Amostra de filme de EHEC reticulado com Glioxal, bio-oxidado por 2 h. (D) - Amostra de filme de EHEC reticulado com Glioxal, bio-oxidado por 3 h.....	44
Figura 16 - Filmes e banho após o tingimento com azul de metileno. (A) - Filme de EHEC reticulado com Glioxal, sem oxidação, após o tingimento do corante azul de metileno. (B) - Filme de EHEC reticulado com Glioxal, bio-oxidado por 1 h, após o tingimento do corante azul de metileno. (C) - Filme de EHEC reticulado com Glioxal, bio-oxidado por 2 h, após o tingimento do corante azul de metileno. (D) - Filme de EHEC reticulado com Glioxal, bio-oxidado por 3 h, após o tingimento do corante azul de metileno.....	46
Figura 17 - Espectros de UV-VIS dos filmes poliméricos para avaliação do melhor filme na incorporação do corante azul de metileno. (A) - Filme de EHEC reticulado com Glioxal, sem oxidação, após o tingimento do corante azul de metileno. (B) - Filme de EHEC reticulado com Glioxal, bio-oxidado por 1 h, após o tingimento do corante azul de metileno. (C) - Filme de EHEC reticulado com Glioxal, bio-oxidado por 2 h,	

após o tingimento do corante azul de metileno. (D) - Filme de EHEC reticulado com Glicol, bio-oxidado por 3 h, após o tingimento do corante azul de metileno.....	47
Figura 18 - Espectros de UV-VIS dos filmes para avaliação da efetivação da biooxidação. (A) - Filme de EHEC reticulado com glicol, bio-oxidado com enzima, após a incorporação de antocianinas e lavagem de 30 min com água. (B) - Filme de EHEC reticulado com glicol, após a incorporação de antocianinas e lavagem de 30 min com água.....	48
Figura 19 - Teste de lavagem do filme bio-oxidado e incorporado com antocianinas a fim de avaliar as antocianinas excedentes. (a)Teste de lavagem com; (b) Água residual da lavagem com água; (c)Filme após a lavagem com água.....	49
Figura 20 - Teste de lavagem do filme bio-oxidado e incorporado com antocianinas a fim de avaliar as antocianinas excedentes em etanol. (a)Teste de lavagem com etanol; (b) Água residual da lavagem com etanol; (c)Filme após a lavagem com etanol.	50
Figura 21 - Estrutura dos copigmentantes.....	51
Figura 22 - Filmes copigmentados com antocianinas.....	52
Figura 23 - Espectro de UV-VIS das amostras dos filmes com os diferentes agentes copigmentantes. (A) - Amostra de filme de EHEC incorporado com antocianinas, sem agente copigmentante. (B) - Amostra de filme de EHEC incorporado com antocianinas, com ácido cafeico. (C) - Amostra de filme de EHEC incorporado com antocianinas, com anidrido maleico. (D) - Amostra de filme de EHEC incorporado com antocianinas, com ácido ascórbico.....	53
Figura 24 – Análise de TGA	54
Figura 25 - Teste de avaliação de coloração em diferentes valores de pH	56
Figura 26 - Monitoramento da deterioração do camarão por 7 dias	58
Figura 27 - Espectro de absorbância do filmes conforme a deterioração do camarão	59
Figura 28 - Espectro de UV-Vis dos filmes após 2 meses. (A1) - Amostra de filme bio-oxidado e incorporado com antocianinas, copigmentado com ácido ascórbico, antes do armazenamento. (A2) Amostra de filme bio-oxidado e incorporado com antocianinas, copigmentado com ácido ascórbico, após dois meses. (B1) Amostra de filme não oxidado e incorporado com antocianinas, copigmentado com ácido ascórbico, antes do armazenamento. (B2) Amostra de filme não oxidado e incorporado com antocianinas, copigmentado com ácido ascórbico	60

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

DTG	Derivada Termogravimétrica
EHEC	Etil hidroxietil celulose
HEC	Hidroxietil celulose
FDS	Ficha de dados de segurança
FTIR-ATR	Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier por reflectância total atenuada
PVA	Acetato de Polivinila
RDC	Resolução de diretoria Colegiada
TLO	Tempo/Lacase/O ₂
TEMPO	2,2,6,6-tetramethylpiperidine-1-oxyl
TGA	Análise Termogravimétrica
UV-Vis	Espectroscopia no ultravioleta visível

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Reagentes e equipamentos	31
Tabela 2 - Reagentes e equipamentos	31
Tabela 3 – Valores encontrados de antocininas totais na literatura	40
Tabela 4 - Composição dos filmes de EHEC	41
Tabela 5 – Resultados de perda de massa e massa residual para os filmes a partir das curvas de TGA.....	55

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	12
2.	OBJETIVOS.....	14
2.1	Objetivos específicos	14
3.	REVISÃO DA LITERATURA.....	15
3.1	Antocianinas.....	15
3.2	Embalagens de alimentos	18
3.3	Polímeros renováveis e embalagens alimentícias	21
3.4	Incorporação de antocianinas em embalagens inteligentes: estabilidade, aplicações e métodos de modificação	23
3.5	Modificação de superfícies: estratégias enzimáticas e tecnológicas para aprimoramento de materiais	26
4	METODOLOGIA	31
4.1	MATERIAIS E REAGENTES.....	31
4.2	PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS	32
4.2.1	Preparação do filme de EHEC.....	32
4.2.2	Reação de oxidação do filme de EHEC	32
4.2.3	Preparação de extração das antocianinas.....	33
4.2.4	Determinação das antocianinas totais.....	33
4.2.5	Avaliação de coloração do extrato	34
4.2.6	Incorporação de antocianinas ao filme de EHEC bio-oxidado.....	34
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	37
5.1.	Extração e análise do extrato	37
5.1.1.	Determinação do teor de antocianinas totais	39
5.2	Obtenção do filme polimérico	40
5.3	Reação de biooxidação	43
5.4	Incorporação das antocianinas no filme polimérico	48
5.5	Termo estabilidade - Análise de TGA e DTG.....	54
5.6	Avaliação de cor	56
5.7	Monitoramento da deterioração de alimentos	57
5.8	Estudo da durabilidade e persistência da cor no filme.....	59
	CONSIDERAÇÕES FINAIS	62
	REFERÊNCIAS.....	64

1. INTRODUÇÃO

As embalagens são peças primordiais na indústria de alimentos; elas desempenham um papel fundamental graças às suas múltiplas funções. Além de acomodar o produto e trazer informações de identificação e composição, a embalagem é necessária para a conservação do alimento, mantendo a qualidade e a segurança, atuando como barreira contra fatores responsáveis pela deterioração química, física e microbiológica. Além disso, elas podem apresentar tecnologias inovadoras, a fim de alertar o consumidor sobre a qualidade no momento da compra, sendo chamadas de embalagens inteligentes (Jorge, 2013; Oladzadabbasabadi *et al.*, 2022). Essas embalagens consistem em um indicador acoplado à embalagem, o qual busca captar e fornecer informações do alimento embalado (Jiang et al., 2020).

O indicador tem a função de converter a informação recebida para o consumidor em tempo real. Diversos tipos de indicadores podem ser acoplados a uma embalagem, por exemplo, indicador de pH, indicador de tempo-temperatura ou indicador de vazamento (Kalpana et al, 2019). Um indicador de pH colorimétrico funciona por alteração de coloração em diferentes ambientes de pH. É utilizado para verificação da qualidade do alimento dentro da embalagem (Kalpana et al, 2019), pois, geralmente, alimentos em processo de deterioração sofrem uma alteração de pH. Diante disto, o indicador apresenta uma variação de coloração conforme o alimento vai deteriorando (Jiang et al, 2020).

Uma alternativa que pode ser incorporada na embalagem como um sensor de pH, devido a sua variação de coloração, são as antocianinas. Antocianinas são compostos naturais e não tóxicos que compõem frutas e vegetais, principalmente aqueles de coloração vermelha ou arroxeada (Chen et al, 2007). Alguns exemplos onde é possível encontrar as antocianinas são, hibiscus (Peralta et al, 2019), cenoura negra (Tirtashi et al, 2019), framboesa (Chen et al, 2007) e mirtilo (Luchese, 2017).

Estudos apresentam o desenvolvimento de filmes poliméricos incorporando antocianinas. No entanto, nesses estudos é comum apenas a realização de uma mistura física com o polímero, em que a antocianina é misturada à solução polimérica, sendo assim, a incorporação ocorre por interação intermolecular (Zhang, et al. 2019; Luchese et al, 2017; Jiang 2020). Esse fato limita a utilização dos filmes produzidos, principalmente devido ao fato de as antocianinas possuírem baixa estabilidade após sua extração. Fatores externos, como luz e temperatura, influenciam sua estabilidade

e, conseqüentemente, impactam seu principal diferencial: a alteração de coloração (Enaru et al, 2021).

Estudos demonstram que a acilação de um ou mais grupos hidroxila das antocianinas pode melhorar significativamente sua estabilidade, reduzindo a degradação precoce e prolongando sua funcionalidade como indicador de pH (Fei et al., 2021; Luo et al., 2022). Esse método tem sido estudado como uma estratégia eficaz para aumentar a estabilidade das antocianinas, pois promove modificações estruturais importantes, como o aumento da polaridade, do tamanho molecular e a alteração da conformação espacial dessas moléculas (Lin et al., 2023). Na literatura, diversos estudos investigaram a acilação do extrato de frutas e vegetais ricos em antocianinas para avaliar sua eficácia na estabilização desses compostos (Yang et al, 2021; Kong et al., 2023). No entanto, esses estudos se concentraram exclusivamente no extrato, sem explorar sua aplicação direta em materiais sólidos. Um exemplo relevante é o estudo conduzido por Fei (2021), no qual a acilação do extrato de mirtilo roxo com anidrido maleico resultou em um aumento da intensidade da coloração e um reforço significativo na sua estabilidade.

No entanto, uma possibilidade seria a esterificação das antocianinas diretamente em uma matriz polimérica sólida. Polímeros atóxicos e bons formadores de filmes poderiam se ligar covalentemente às antocianinas, estabilizando-as e gerando material duradouro. Para que seja possível a formação de uma ligação éster diretamente no filme polimérico, o polímero deve ser oxidado, gerando grupamentos COOH em sua estrutura. Estes grupamentos podem reagir com os grupamentos OH das antocianinas, formando ésteres. Nesse contexto, a biooxidação superficial de matrizes poliméricas surge como uma alternativa inovadora para modificar as propriedades dos materiais e otimizar sua funcionalidade. Esse processo, realizado por meio de metodologias biocatalisadas, como a utilização de enzimas oxidoredutases, permite a introdução seletiva de grupos carboxila na superfície dos polímeros sem comprometer sua integridade estrutural. Além de tornar os materiais mais reativos e compatíveis com outros compostos, a biooxidação reduz a necessidade de reagentes químicos agressivos, tornando a modificação mais sustentável (Chen et al, 2022; Quartinello et al., 2019; Nemani et al, 2018; Huang et al, 2023).

Diante desse cenário, uma abordagem promissora consiste na ligação covalente das antocianinas a um filme polimérico utilizado em embalagens. Essa

estratégia visa não apenas melhorar a estabilidade das antocianinas na matriz polimérica, mas também garantir maior durabilidade e eficiência na detecção do pH, permitindo um monitoramento mais preciso do frescor dos alimentos e contribuindo para a redução do desperdício alimentar.

2. OBJETIVOS

Este trabalho teve como objetivo geral a preparação de filmes poliméricos à base de etil-hidroxietilcelulose (EHEC) bio-oxidada com laccase, funcionalizados com antocianinas extraídas de amoras-pretas por meio de ligação covalente, visando sua aplicação em embalagens inteligentes para alimentos.

2.1 Objetivos específicos

- Extrair e identificar o teor de antocianinas totais nos extratos de amoras;
- Avaliar o efeito de diferentes agentes reticulantes na formação de filmes poliméricos de EHEC;
- Modificar a superfície dos filmes de EHEC através da reação de oxidação mediada por enzima lacase (*Pleurotus ostreatus*);
- Realizar a funcionalização das antocianinas através da reação na superfície da matriz polimérica;
- Estudar o fenômeno de copigmentação utilizando diferentes compostos orgânicos (ácido ascórbico, anidrido maleico e ácido cítrico);
- Caracterizar os filmes poliméricos incorporados com antocianinas por espectrometria na região de UV-Vis, infravermelho (FTIR) e análise térmica (TGA);
- Estudar as propriedades dos filmes produzidos quanto sua resposta a alteração do pH, reversibilidade da resposta e estabilidade;
- Encontrar a melhor metodologia para a criação de uma etiqueta inteligente para aplicação em embalagens de alimentos;
- Realizar análise de monitoramento da coloração do filme em aplicação com embalagem de camarão.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Antocianinas

As antocianinas são corantes naturais com excelentes propriedades antioxidantes, antimicrobianas e sensíveis ao pH (Yong; Liu, 2020). Estão presentes na natureza em frutas e vegetais de cores fortes, com diversas evidências de benefícios à saúde (Singh et al, 2022). Um exemplo de fruta rica em antocianinas são as amoras pretas (Figura 4), provenientes de um arbusto perene *Rubus Ulmifolius schott*, da família *Roseaceae*. São frutas de coloração roxa a pretas, distribuídas na Ásia, Norte da África e Europa (Silva et al, 2019). Alguns estudos evidenciaram que esses frutos possuem propriedades antioxidantes devido ao alto teor de antocianinas (D'Agostino et al, 2021).

Figura 1 – Amoras Pretas



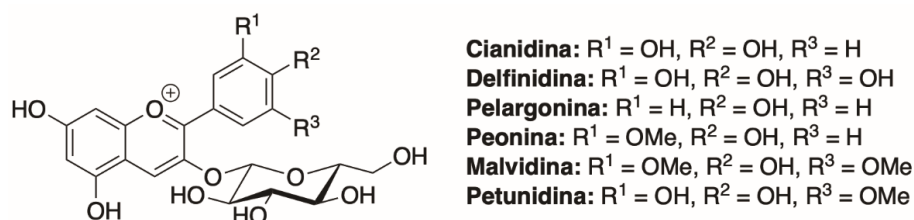
Fonte: Embrapa, 2015.

As antocianinas são a forma glicosada das antocianidinas. Cianidina, pelargonidina, delphinidina, peonidina, petunidina, malvidina são alguns exemplos de antocianidinas mais comuns presentes na natureza. As cianidinas são encontradas predominantemente na natureza em frutas de cores vermelhas ou roxas, como por exemplo, amoras e framboesas, devido a sua forma de pigmento avermelhado. Pelargonidina também aparece como um pigmento avermelhado, porém gera nas flores uma coloração alaranjada e nas frutas uma coloração avermelhada. Delphinidina apresenta uma coloração próxima a um azul avermelhado, gerando nas flores a cor azul. Petunidina é encontrada em groselhas e flores roxas por ser uma antocianina metilada solúvel em água, geralmente na coloração vermelho escuro ou roxo. A

peonidina também é uma antocianina metilada, porém apresentasse na cor vermelho magenta muito encontrada em uvas. Malvinidina é uma antocianina O-metilada que determina a cor azul nas flores e é o principal pigmento dos vinhos tintos. Apesar de cada antocianidina ter as suas peculiaridades, no geral, as cianidinas, pelargonidina e delphinidinas são frequentemente encontradas em frutas, enquanto as peonidinas, petunidinas e malvidinas são encontradas em flores (Enaru et al, 2021; Khoo et al, 2017).

Já as antocianinas, encontradas são: cianidinas-3-glicosídeo, delphinidin-3-glicosídeo, peonidina-3-glicosídeo, pelargonidina-3-glicosídeo, petunidina-3-glicosídeo, cianidina-3-galactosídeo (Karaaslan-Ayhan; Yaman, 2021) (Figura 5).

Figura 2 - Estrutura Química das antocianinas



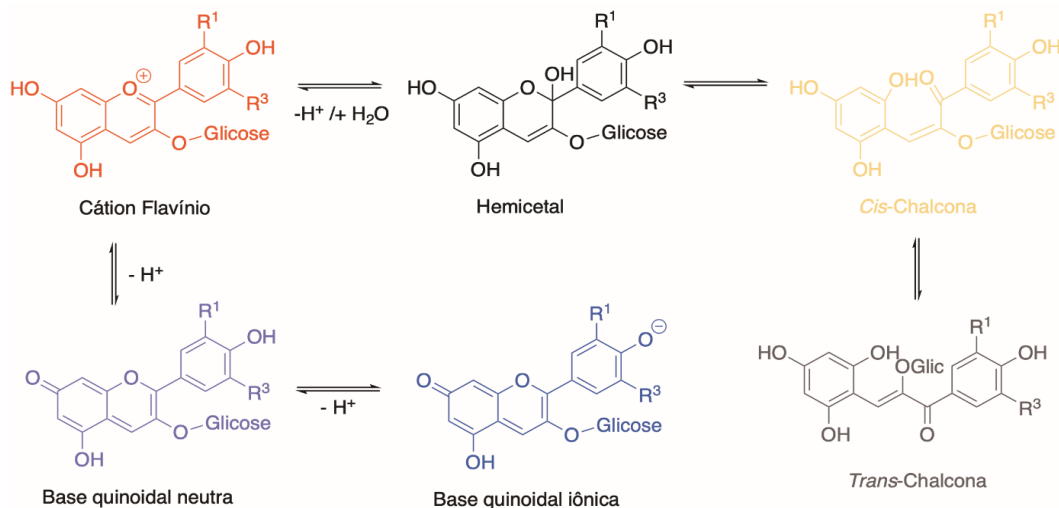
Fonte: A autora

Para as citadas amoras pretas, por exemplo, D'Agostino (2021) demonstrou através de uma análise por tempo de retenção que as respectivas quantidades de antocianinas presentes são 2,14 mg/g cianidina- O-di-hexosídeo, 14,69 mg/g cianidina-3-O-glucosídeo, 2,234 mg/g pelargonidina-3-O-glucosídeo, 2,62 mg/g cianidina-3-O-xilosídeo e 2,04 mg/g cianidina-3-O-glucosídeo.

A aplicação de antocianinas em embalagens de alimentos como a função de indicador de pH, tem sido estudada, pois é inofensiva ao meio ambiente e apresenta uma segurança para os seres humanos. Podem apresentar diversas estruturas químicas conforme mudança de pH resultando em uma alteração de coloração (Oladzadabbasabadi et al, 2022). A Figura 5 apresenta diferentes estruturas químicas de antocianinas com a variação do pH do meio. Num contexto geral, a coloração das antocianinas varia de um vermelho/rosa para um azul/verde conforme o aumento de pH, a depender da fonte de extração. Em condições ácidas (pH 1,0), formam-se estruturas de cor intensa devido a presença do cátion flavínio (geralmente vermelho e rosa intensos); em pH 4,5, formam-se estruturas mais claras de tons variáveis devido ao predomínio das chalconas; e em condições básicas (pH > 7), forma-se a estrutura

quinoidal, que possui coloração intensa (azul e verde escuro, por exemplo) (Yong, Liu, 2020).

Figura 3 - Estruturas químicas das antocianinas e suas colorações



Fonte: Adaptado de Yong, 2020.

Conforme comentado, a coloração das antocianinas em diferentes valores de pH pode variar conforme a fonte da qual é extraída. A Figura 6 apresenta algumas variações de coloração, em diferentes pHs, obtidas em diferentes fontes.

Figura 4 - Coloração das antocianinas em diferentes ambientes de pH

Source of anthocyanins	pH ~2	pH ~3	pH ~4	pH ~5	pH ~6	pH ~7	pH ~8	pH ~9	pH ~10	pH ~11	pH ~12	Referenc e
Rose (<i>Rosa rugosa</i>)												Kang et al. (2020)
Iranian borage (<i>Echium amoenum</i>)												Mohamma dalinejad et al. (2020)
Jambolan (<i>Syzygium cumini</i>)												Merz et al. (2020)
Purple sweet potato (<i>Ipomoea batatas</i>)												Chen et al. (2020)
Manchurian cherry (<i>Prunus maackii</i>)												Sun et al. (2020)
Red cabbage (<i>Brassica oleracea</i> var. capitata f. rubra)												Liu et al. (2021)
Saffron petal (<i>Crocus sativus</i>)												Alizadehi-Sani et al. (2021)
Barberry (<i>Berberis vulgaris</i>)												Sani et al. (2021)
Mulberry (<i>Morus nigra</i>)												Yang et al. (2021)
Roselle (<i>Hibiscus sabdariffa</i> L.)												Liu et al. (2021)
Centaurea arvensis												Forghani et al. (2022)

Fonte: Oladzadabbasabadi et al, 2022

As antocianinas podem ser extraídas utilizando um método convencional, a partir de um solvente extrator e assistida por banho ultrassom. As vantagens de utilizar o método assistido por ultrassom são devidas à sua cavitação acústica, que causa um movimento molecular entre o solvente e a amostra, oferecendo uma alta eficiência, baixa temperatura, consumo do solvente e tempo reduzido (CHEN et al., 2007).

Chen e colaboradores (2007), por exemplo, extraíram antocianinas (provenientes de framboesas) utilizando banho de ultrassom, que resultou em um procedimento mais eficiente, devido à ruptura da estrutura do tecido da fruta pela movimentação ultrassônica, facilitando o acesso do solvente. Desta forma, as antocianinas podem ser extraídas de forma simples e rápida.

No entanto, apesar das excelentes propriedades, a instabilidade das antocianinas limita sua aplicação. Possuem uma vulnerabilidade a fatores externos, como alta temperatura, luz, ambientes ácidos e alcalinos. Alguns autores demonstram que a acilação das antocianinas desempenha uma melhoria na estabilidade e na sua solubilidade em solventes orgânicos (LUO et al, 2022). Ainda, segundo Fei (2021) a estabilidade das antocianinas diminui conforme o aumento do número de grupos hidroxila na porção glicosídica das antocianidinas e aumenta com o aumento do grau de metilação, por exemplo.

3.2 Embalagens De Alimentos

Segundo as Resoluções de Diretoria Colegiada - RDC 91/2001 e RDC nº 88/2016 (BRASIL, 2001), considera-se embalagem para alimentos o artigo que está em contato direto com o alimento, destinado a contê-lo, desde a sua fabricação, até a sua entrega ao consumidor, com a finalidade de protegê-lo de agentes externos, alterações, contaminações e adulterações.

As embalagens são elementos fundamentais na preservação dos alimentos durante toda sua vida útil. São elas que garantem que todo o processo empregado para a produção de um determinado alimento seja respeitado e mantido até a sua comercialização, preservando os produtos até chegar no consumidor final (De-Mello Robert et al, 2018). Durante a distribuição dos alimentos, a qualidade destes pode ser alterada por meio da deterioração biológica, química ou física. Sendo assim, as embalagens são utilizadas como uma barreira física entre o alimento e o ambiente para garantir a qualidade dos alimentos, prolongar sua vida útil, manter a qualidade,

integridade e segurança (Wang et al, 2019; De-Mello Robert et al, 2018; Kalpana et al, 2019).

As embalagens inteligentes possuem um diferencial quando comparadas com embalagens convencionais, pois apresentam em sua composição a ideia de transmitir, relatar ou notificar ao consumidor em tempo real informações sobre a qualidade em que o alimento se encontra dentro da embalagem (Balbinot-Alfaro et al., 2019; Jiang et al., 2020; Kalpana et al., 2019).

Os materiais utilizados nas embalagens inteligentes são aqueles que monitoram o estado do alimento e que repassam essa informação para o consumidor de uma forma de fácil visualização, como alteração de cor, não afetando diretamente o alimento (Tirtashi et al, 2019). Isso é realizado através da presença de uma substância que sofre alteração química, geralmente, ocasionando modificação de cor, causada pela atividade microbiana e/ou química do alimento (Tirtashi et al, 2019). Essa transmissão de informações ocorre por meio de indicadores acoplados à embalagem (Balbinot-Alfaro et al, 2019). Os parâmetros monitorados podem ser, tempo-temperatura, indicadores de vazamento, indicador de pH ou frescor (Kalpana et al, 2019).

O RipeSense (Figura 3) é um exemplo comercial de etiqueta acoplada a embalagem que utiliza um indicador colorimétrico para informar ao consumidor se a fruta está pronta para consumo ou se pode ser utilizada para produção de sucos. Foi elaborado pelo grupo Jenkins da Nova Zelândia e funciona de forma que a mudança de coloração na etiqueta, ocorre devido a liberação de etileno durante o amadurecimento da fruta ao longo do tempo. Tem sido estudado em diversas frutas, porém, as que melhor responderam ao uso foram as peras (Helmy et al., 2016; Sarantopoulos; Cofcewicz, 2015).

Figura 5 - Ripesense



Fonte: RipeSense

As embalagens inteligentes com indicador de pH acoplado podem fornecer informações em tempo real sobre o frescor e a qualidade do alimento para o consumidor no momento da compra ou antes do seu consumo, através de uma variação de coloração (Liu et al, 2022).

Apesar de não haver exemplos comerciais, a mudança de coloração de filmes indicadores de pH, é um método visual e simples para detectar mudanças na qualidade dos produtos alimentícios, uma vez que os valores de pH dos alimentos mudam durante os processos de deterioração e amadurecimento (Luchese et al, 2017). Os filmes indicadores utilizados nessas embalagens são compostos de dois componentes importantes, são eles, uma base sólida e um corante, que são sensíveis à mudança de pH (Jiang et al, 2020).

Alguns corantes sintéticos, como o azul de bromofenol e o vermelho de clorofenol, são sensíveis ao pH e, por isso, podem ser empregados na produção de indicadores de pH. No entanto, esses compostos não são adequados para aplicações em contato direto com alimentos, pois apresentam toxicidade significativa e baixo perfil de biodegradabilidade (Choi et al., 2017; Alfaro-Balbinot et al., 2019). Além dos riscos à saúde humana, o descarte inadequado desses corantes pode causar impactos ambientais, afetando organismos aquáticos e ecossistemas (Oladzadabbasabadi et al., 2022).

Dessa forma, a substituição de corantes sintéticos por alternativas naturais, como as antocianinas, torna-se uma abordagem mais segura e sustentável, alinhada

à crescente demanda por materiais biodegradáveis e compatíveis com o uso alimentar.

Sendo assim, corantes naturais têm sido um objeto de estudo em potencial na detecção de pH em embalagens para alimentos e, inclusive, quando comparados aos corantes sintéticos, apresentam baixa toxicidade e uma facilidade de preparação, obtidos em fontes renováveis. Dentre os pigmentos naturais presentes na natureza, destacam-se as antocianinas, com um grande potencial no desenvolvimento de indicadores em embalagens inteligentes (Choi et al., 2017; Alfaro-Balbinot et al., 2019).

3.3 Polímeros Renováveis e Embalagens Alimentícias

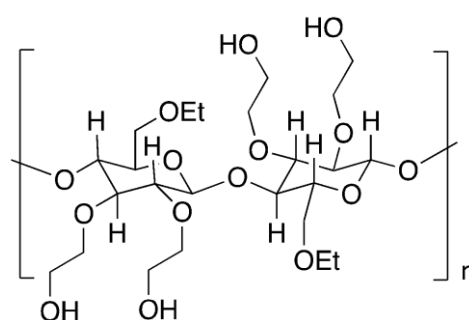
Polímeros de fontes renováveis estão sendo utilizados cada vez mais na busca por alternativas sustentáveis para filmes em embalagens de alimentos. Esses polímeros, geralmente, possuem algumas propriedades atrativas para os fabricantes, como o baixo custo de fabricação (Lyytikainen et al, 2021). Além disso, esses materiais têm sido o principal foco de estudo no desenvolvimento de embalagens de alimentos. Esses materiais, apresentam características benéficas ao meio ambiente, facilitando o descarte das embalagens (Luchese et al, 2017).

Segundo Liu (2019), devido ao aumento da poluição ambiental causada por embalagens poliméricas, diversas pesquisas levaram em consideração o desenvolvimento de filmes biodegradáveis para uso em embalagens. Muitos biopolímeros naturais, incluindo proteínas (por exemplo, caseína, glúten, gelatina, soja e proteínas de soro de leite) e polissacarídeos (por exemplo, amido, carragenana, alginato, ágar, pectina, quitosana, celulose e seus derivados) foram selecionados para desenvolver filmes de embalagem biodegradáveis.

A estrutura da celulose, por exemplo, pode ser quimicamente modificada através de grupos hidroxila, gerando uma melhoria na solubilidade e nas propriedades reológicas e resistivas de barreira nos filmes. Um polímero derivado da modificação da celulose é a etil hidroxietil celulose (EHEC). A EHEC é o resultado da modificação da celulose visando aumentar sua viscosidade devido ao seu comportamento auto associativo através de suas regiões hidrofóbicas. A principal diferença estrutural entre a celulose e a EHEC está na presença dos grupos funcionais etila e hidroxietila, que conferem à EHEC propriedades diferenciadas e ampliam suas possibilidades de

aplicação e sua reatividade (Lyytikainen et al, 2021; (Wali et. al. 2024). A EHEC é um polissacarídeo anfifílico, não iônico, que tem sido estudado em combinações com surfactantes iônicos (Calejo et al, 2012; Agrawal et al, 2020). Devido a sua viscosidade apropriada e seu baixo custo, já é utilizada na indústria como espessante em cosméticos e formulações farmacêuticas (Wali et. al. 2024). Esse polímero, embora pouco explorado em outras aplicações, já apareceu em destaque devido ao seu perfil reológico apropriado para ser utilizado em materiais biocompatíveis (Eckelt et al. 2022).

Figura 6 - Estrutura química da Etil Hidroxietil Celulose (EHEC)



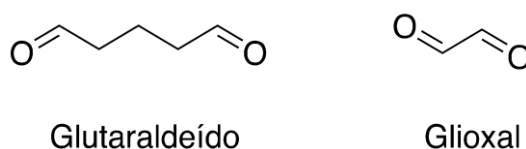
Fonte: A autora

Além das propriedades citadas, o EHEC, geralmente, forma filmes eficientes. Como caráter de inovação, estudo e avaliação, a utilização da EHEC em embalagens inteligentes de alimentos mostra-se como uma possibilidade de aplicação, inclusive por apresentar biocompatibilidade e baixa toxicidade (Calejo et al., 2019; HEDIN et al., 2009).

Para que a EHEC leve a efetiva formação de um filme, deve-se realizar a reticulação. O processo de reticulação visa utilizar um agente reticulante com o objetivo de melhorar a estabilidade, resistência mecânica e formar um filme mais resistente ao calor, à umidade e a outros agentes físicos. Aldeídos têm se mostrado como uma boa opção na reticulação com polímeros para utilização em embalagens de alimentos. Geralmente, a reticulação com aldeídos é formada a partir dos grupos nucleofílicos da superfície da matriz formando ligações covalentes com o grupamento aldeído que é eletrofílico (Bhattacharya; Rawlins; Ray, 2009; Berger *et al*, 2004; Gonsalves *et al*, 2011; Hernández-muñoz; Villalobos; Chiralt, 2004; Kharaghani et al, 2020; Zhang; Zhu; Edgren, 2009).

Dois aldeídos são comumente utilizados como agentes reticulantes: glutaraldeído e glioxal, ambos aldeídos bifuncionais. O glutaraldeído (Figura 8) é um agente reticulante que pode interagir com grupos amina ou grupos hidroxila nos polímeros, gerando uma melhor estabilidade de filme e resistência à temperatura e ao pH (Doustdar et al., 2022; Kharaghani et al., 2020; Zhang, Zhu e Edgren, 2009). O glioxal, também é um agente reticulante, que tem se mostrado muito efetivo na reticulação com polímeros. Apresenta uma baixa toxicidade e grande volatilidade (Colombi et al, 2024; Hernández-muñoz et al, 2004; Swamy et al 2022).

Figura 7 - Estruturas químicas do glutaraldeído e do glioxal



Fonte: A autora

3.4 Incorporação de antocianinas em embalagens inteligentes: estabilidade, aplicações e métodos de modificação

Conforme comentado anteriormente, as antocianinas são conhecidas por sua capacidade de alterar a coloração em diferentes valores de pH. Sendo assim, elas podem ser aplicadas em matrizes poliméricas, possibilitando sua aplicação em embalagens inteligentes de alimentos. Diversos estudos recentes apresentam diferentes métodos de incorporação das antocianinas em bases poliméricas, como, por exemplo, filmes à base de amido, carragenana e gelatina (Wang et al., 2019; Luchese et al., 2017; Liu et al., 2019).

Um exemplo é o estudo conduzido por Kalpana e colaboradores (2019) que desenvolveram um indicador de pH com amido derivado de batata e antocianinas extraídas do pó de batata-doce roxa. Esse material foi testado na indicação da deterioração da carne suína. A carne suína fresca possui pH aproximado de 6,28 e o ponto final de deterioração possui pH de 7,42. O material indicador desenvolvido mostrou uma mudança visível na coloração de vermelho para verde apresentando potencial de aplicabilidade.

Tirtashi (2019) e Zhang (2019) também desenvolveram filmes poliméricos incorporados com antocianinas para aplicação em embalagens inteligentes. Tirtashi (2019) desenvolveu um filme indicador específico para aplicação em embalagens de leite, utilizando antocianinas extraídas da cenoura, sendo que o processo de extração das antocianinas resultou em um teor total de 10,5 mg/100 mL. A matriz polimérica do filme foi composta por celulose e quitosana. O extrato foi então incorporado durante a preparação do filme por meio de uma mistura reacional com a solução polimérica, garantindo sua dispersão homogênea na matriz e, assim, obtendo a formação do filme após a secagem. O filme resultou em uma alteração de coloração de rosa (pH 2,0) para roxo/azul (pH 7-8) e, por fim, cinza (pH 11,0). A aplicação deste filme ao leite fresco e ao leite estragado se deu além das alterações físico-químicas e microbianas, mas da análise visual da alteração de coloração de azul para lilás em 24 h e na cor violeta após 48 h, informando claramente a deterioração do leite. Zhang (2019), em vez de utilizar antocianinas derivadas de frutas, preparou um extrato da planta Roselle utilizando uma solução extratora de HCl com etanol. A matriz polimérica do filme foi composta por hidrogéis de amido, PVA e quitosana. O extrato de Roselle foi incorporado à solução polimérica e, posteriormente, submetido à secagem para a formação do filme. O objetivo do estudo foi desenvolver um filme indicador para monitoramento do frescor da carne de porco. A variação de coloração foi perceptível, mudando de rosa para cinza-azulado, além de ser quantificada por espectrofotometria.

Pode-se verificar diante destes dois exemplos que a preparação dos filmes consistiu em uma interação de contato das antocianinas com a matriz polimérica, desta forma, realizando uma ligação intermolecular. No entanto, devido às antocianinas apresentarem instabilidade quando expostas à luz, ao calor e ao oxigênio, uma alternativa que vem sendo estudada é a realização da ligação covalente das antocianinas à matriz polimérica, que poderia, ao que tudo indica, melhorar sua estabilidade e garantir uma incorporação mais eficaz (Qian et al., 2017, p.01; Luo et al., 2022, p. 02). A literatura não apresenta estudos diretos em que materiais poliméricos contendo antocianinas como indicadores em embalagens de alimentos inteligentes sejam covalentemente ligados à estrutura polimérica, mas traz alguns exemplos de acilação do próprio extrato de antocianinas anteriormente à aplicação em matrizes poliméricas. A acilação é um processo químico que desempenha um papel na modificação estrutural e funcional das antocianinas. Esse processo reduz a

polaridade dessas moléculas, ao mesmo tempo em que aumenta seu tamanho molecular e altera suas estruturas espaciais. Como resultado, há mudanças significativas na reatividade química e na estabilidade das antocianinas, tornando-as mais resistentes a condições ambientais. A acilação enzimática é uma alternativa mais eficiente e seletiva. Esse método opera sob condições de reação brandas e apresenta alta regioseletividade, tornando-se a abordagem preferida para a produção de flavonoides acilados. Na natureza, a acilação dos flavonoides é catalisada por aciltransferases vegetais, enzimas responsáveis por transferir grupos acila para as moléculas-alvo (Zhang et al, 2021; Yang et al, 2023). Por exemplo, o estudo desenvolvido por Fei e colaboradores (2021) consistiu na acilação de antocianinas derivadas do extrato de mirtilos utilizando o anidrido maleico. Através de uma análise de cor em diferentes dias, as antocianinas aciladas apresentaram uma estabilidade muito maior quando comparada às antocianinas não aciladas. Sendo que em 5 dias as antocianinas aciladas degradaram aproximadamente 27% enquanto as não aciladas aproximadamente 51%, totalizando mais que o dobro de perda de coloração.

Ainda dentro do escopo de estudos sobre a estabilidade das antocianinas, a literatura traz vários trabalhos sobre a copigmentação. A copigmentação de antocianinas é um fenômeno químico estudado devido ao seu papel na intensificação e estabilização das cores em alimentos e outros materiais naturais. As antocianinas, conforme visto anteriormente são responsáveis por tons de vermelho, roxo e azul em frutas e vegetais, porém apresentam uma instabilidade as variações de luz, oxigênio e temperatura, o que frequentemente leva à degradação de sua cor original. A copigmentação surge como uma alternativa para esse problema, ajudando a preservar e realçar a coloração desses compostos em diferentes condições ambientais (Cai, 2022).

Diferentes ácidos podem ser utilizados no processo de copigmentação de antocianinas em matrizes poliméricas, desempenhando um papel fundamental na estabilidade e na manutenção da coloração desses compostos naturais. O ácido ascórbico é amplamente empregado nesse contexto, atuando como agente antioxidante e auxiliando na proteção das antocianinas contra a degradação oxidativa. Além disso, estudos indicam que sua aplicação pode contribuir para o aumento da estabilidade das antocianinas sob determinadas condições (Barbosa et al., 2021, p. 02; Qian et al., 2017, p. 03). Outros compostos também demonstram eficácia na

copigmentação das antocianinas. O anidrido maleico, por exemplo, pode atuar na modificação química da matriz polimérica, promovendo interações que favorecem a preservação da coloração e a estabilidade estrutural das antocianinas ao longo do tempo (Fei et al, 2021). Já o ácido cafeico, um composto fenólico com reconhecida atividade antioxidante, pode potencializar a proteção das antocianinas contra variações ambientais, reduzindo sua degradação e mantendo sua funcionalidade óptica por períodos mais prolongados (Qian et al., 2017, p. 03; Kong et al, 2023). Assim, a escolha do agente copigmentante desempenha um papel essencial no desempenho da matriz polimérica incorporada com antocianinas, sendo necessário avaliar as interações específicas de cada ácido para otimizar a estabilidade e a aplicação desses filmes em diferentes condições.

3.5 Modificação de superfícies: estratégias enzimáticas e tecnológicas para aprimoramento de materiais

A modificação de superfícies é uma estratégia utilizada para aprimorar as propriedades de diferentes materiais, incluindo matrizes poliméricas, têxteis e metálicas, com o objetivo de otimizar ou melhorar seu desempenho em diversas aplicações. Técnicas como tratamentos químicos, físicos e biotecnológicos têm sido exploradas para modificar a estrutura superficial dos materiais, proporcionando melhorias específicas conforme a necessidade da aplicação. Polímeros com superfícies modificadas têm sido empregados em diversas áreas, incluindo microfluídica, têxteis, alimentícias, aplicações biomédicas, eletrônicos, tratamento de água e indústrias de energia (Nemani et al, 2018; Huang et al, 2023). No contexto de embalagens de alimentos, Huang (2023) investigou técnicas de modificação superficial para aprimorar as barreiras contra vapor de água e oxigênio em matrizes poliméricas, destacando o impacto dessas alterações no desempenho dos filmes. Entre as estratégias analisadas, destaca-se a aplicação de óxidos, metais e carbono por meio da técnica de *coating*, que consiste no revestimento da superfície para conferir propriedades específicas ao material. Além disso, a incorporação de nanoplaquetas impermeáveis, como grafeno e seus derivados, nitreto de boro e outros compostos, em filmes poliméricos de nanocompósitos tem sido explorada como uma alternativa eficaz para aumentar a barreira aos gases, ao mesmo tempo em que

melhora as propriedades mecânicas e a resistência química dos filmes (Huang et al, 2023; Zhang et al, 2022).

Uma outra metodologia de modificação superficial foi proposta por Aracri e colaboradores (2011), que realizaram a modificação da superfície de um substrato de polpa de sisal por meio de um procedimento de oxidação dos grupos hidroxila utilizando a enzima lacase e o mediador TEMPO. Esse processo resultou em uma melhoria significativa na hidrofobicidade do tecido, destacando-se como uma abordagem ecológica e sustentável. De maneira semelhante, no estudo de Chen e colaboradores (2022), foi aplicada uma metodologia de oxidação superficial utilizando lacase e TEMPO, mas em um substrato polimérico, a celulose. Nesse trabalho, nanofibras de celulose com alto teor de carboxilas foram desenvolvidas a partir da oxidação Tempo/Lacase/O₂ (TLO) em solução tampão de acetato de sódio a pH 4,5, partindo de polpa kraft.

As metodologias biocatalizadas oferecem inúmeras vantagens, como menor dano à estrutura original do material, redução do uso de produtos químicos agressivos, redução do consumo de energia e dos custos de produção. Entre as enzimas, particularmente as oxidoredutases – têm chamado a atenção para a oxidação da celulose e de seus derivados, como forma de facilitar a sua funcionalização gerando grupos carboxila na superfície. (Quartinello et al., 2019). Entre as oxidoredutases, enzimas que são muito utilizadas industrialmente são as laccases. As lacases são enzimas pertencentes à classe das oxirredutases, capazes de catalisar a oxidação de uma ampla gama de substratos orgânicos, incluindo polímeros. Essas enzimas operam de forma eficiente em condições ambientais suaves, como temperatura ambiente e pH neutro, reduzindo a necessidade de reagentes químicos agressivos e minimizando a geração de resíduos tóxicos. Diversos substratos, como álcoois, açúcares, celulose e grupos aromáticos podem ser oxidados por lacases em combinação com mediadores químicos. As lacases são altamente específicas, o que permite uma oxidação controlada e direcionada, resultando na introdução seletiva de grupos COOH sem comprometer a integridade estrutural do polímero, além disso, são consideradas ambientalmente amigáveis, econômica e segura (Aracri, et al 2011, p.1; Jaulovec et al, 2015, p. 2; Yu et al, 2016, p1; Gu et al, 2021, p. 2).

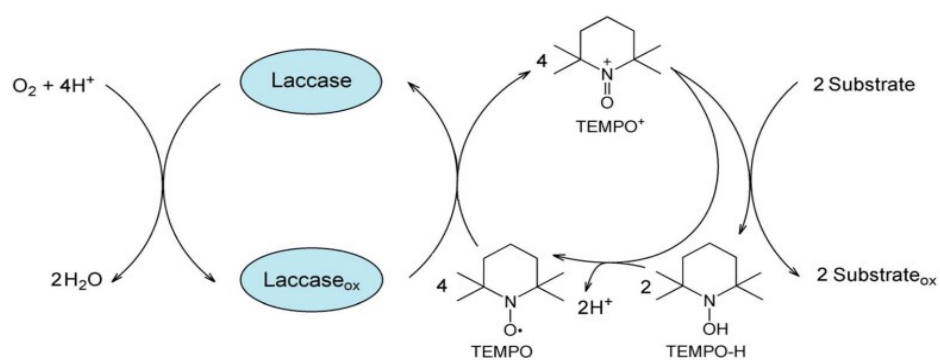
A reação de oxidação catalisada por lacases envolve a transferência de elétrons do substrato (no caso, o polímero) para o oxigênio molecular, que é reduzido

a água. O mecanismo inicia-se com a ligação do substrato ao sítio ativo da enzima, onde ocorre a remoção de elétrons e prótons, resultando na formação de radicais livres. Esses radicais, por sua vez, reagem com o oxigênio para formar grupos carboxílicos. A especificidade das lacases permite que a oxidação ocorra principalmente em posições suscetíveis da cadeia polimérica, garantindo uma modificação homogênea e controlada (Aracri, et al 2011, p.1; Deng et al, 2022; Jaulovec et al, 2015, p. 2; Dong et al, 2021; Chen et al, 2022).

Entretanto, ainda há desafios a serem superados no uso de aplicações da lacase. Muitos substratos não fenólicos não conseguem se ligar diretamente à lacase. Além disso, o potencial redox da enzima, que varia entre 420-780 mV, é relativamente baixo, o que limita sua capacidade de oxidar compostos fenólicos de alto potencial ou outros compostos não fenólicos complexos, desta forma a adição de pequenos compostos moleculares, conhecidos como mediadores, surgem com o intuito de facilitar a oxidação entre a lacase e os substratos, ampliando significativamente o alcance de sua aplicação (Gu et al, 2021 p.02; Deng et al, 2022).

O mediador TEMPO (2,2,6,6-tetrametilpiperidina-1-oxil) desempenha um papel importante na ampliação da eficiência oxidativa da lacase, especialmente na oxidação de substratos que não podem ser diretamente catalisados pela enzima. É um mediador baseado em nitroxila, conhecido por sua estabilidade e eficiência em reações de oxidação. Ele é particularmente eficaz na oxidação de grupos hidroxila primários em substratos, transformando-os em aldeídos ou ácidos carboxílicos. Essa propriedade é valiosa na funcionalização de materiais, como na modificação de superfícies de celulose, ampliando sua aplicabilidade em materiais sustentáveis e biocompatíveis (Gu et al, 2021 p.02; Deng et al, 2022; Jaulovec et al, 2015, p. 2; Yu, et al, 2016. p.1; Hordieieva, 2023).

Figura 8 - Mecanismo de oxidação de compostos catalisados por laccase/TEMPO/O₂



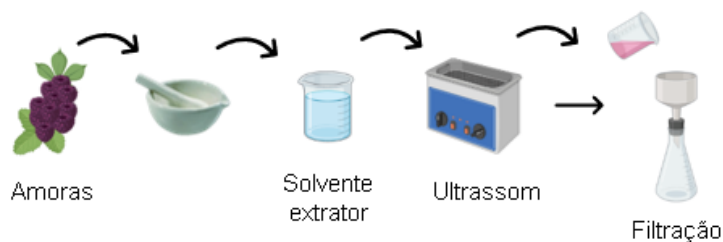
Fonte: Hordieieva, 2023.

4. METODOLOGIA

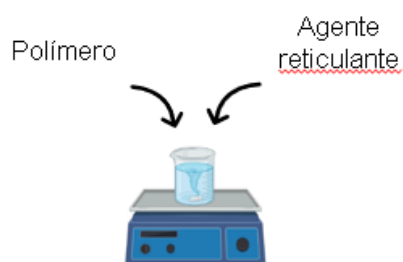
A metodologia para obtenção dos filmes foi dividida em quatro grandes etapas, conforme pode ser observado na Figura 09:

Figura 9 - Etapas da metodologia

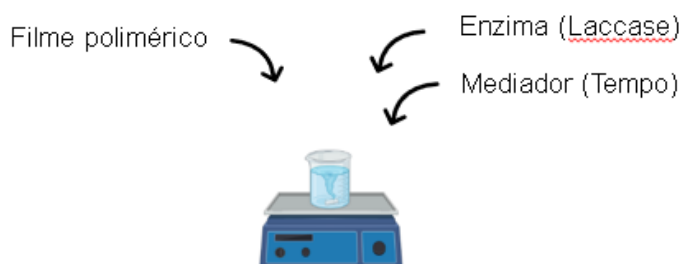
1 Extração das antocianinas



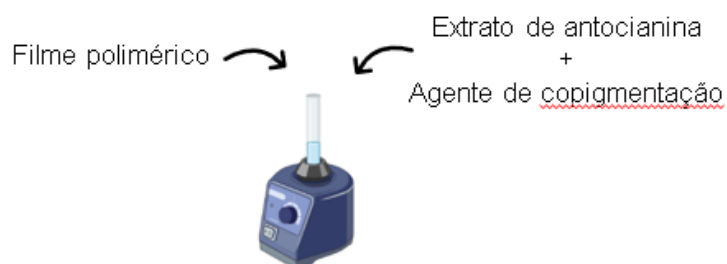
2 Preparação do filme



3 Modificação da superfície - Oxidação do filme polimérico



4 Incorporação da antocianina no filme



Fonte: A autora

4.1 Materiais e reagentes

Para o desenvolvimento dos experimentos, foram utilizados materiais e reagentes de grau analítico, selecionados de acordo com sua pureza e compatibilidade com as etapas experimentais. A Tabela 1 apresenta a lista detalhada dos reagentes empregados e a Tabela 2 apresenta a lista de equipamentos.

Tabela 1 - Reagentes e equipamentos

Material	Identificação
Amoras pretas	Adquiridas pela Universidade Federal de Santa Catarina
Ácido ascórbico	99,7%. Sigma Aldrich
Ácido clorídrico	(P.A), Anidrol
Ácido cítrico	Ácido cítrico monohidratado, SigmaAldrich
Acetona	(P.A), Anidrol
Azul de metileno	Azul de metileno, Vetec
Etanol	Álcool etílico absoluto PA, Êxodo Científica
Citrato de sódio	Citrato de sódio dihidratado reagente ACS, Sigma Aldrich
Glutaraldeído (Solução 50%)	Sigma-Aldrich
Gloxal (Solução 40%)	Sigma-Aldrich
etil hidroxietil celulose	(grau de substituição de grupos etil de 0,9 – 1,0 e de 1,9 – 2,2 de grupos óxido de etileno por unidade de anidroglicose), é proveniente da Bermocoll E 230FQ, doada pela Akzo Nobel, Surface Chemistry AB, Suécia
Lacase	<i>Pleurotus ostreatus</i> , liofilizada, atividade $\geq 9,7$ U/mg, SigmaAldrich
Membrana de diálise	MWCO = 14.000 g mol ⁻¹
TEMPO	2,2,6,6tetrametilpiperidina 1oxil (TEMPO), SigmaAldrich

Tabela 2 - Reagentes e equipamentos

Material	Identificação
Analizador TGA	TA Instruments, TGA Q50
Espectrômetro de infravermelho com transformada de Fourier	PerkinElmer Frontier, por reflectância total atenuada (FTIRATR) comprimentos de onda entre 4000 e 450 cm ⁻¹
Espectrofotômetro UV-Vis	Espectrofotômetro UVVis Shimatzu® UVProbe 2.5 na faixa de 800200 nm
Estufa	Estufa de secagem NOVA INSTRUMENTS, modelo NI1513CR

4.2 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

4.2.1 Preparação do filme de EHEC

Inicialmente, 1,5 g da Etil Hidroxietil Celulose (EHEC) adquirida comercialmente foi purificada utilizando uma membrana de diálise ($MWCO = 14.000 \text{ g mol}^{-1}$) durante 7 dias com troca de água destilada duas vezes ao dia. Ao final do sétimo dia, a solução foi colocada em uma placa de Petri e seca em estufa por 48 h a 50°C , obtendo-se o polímero EHEC purificado (Nandi, 2014, p.01).

A preparação do filme polimérico foi realizada baseando-se na metodologia de Zhang (2019). Em um balão de fundo redondo, pesou-se 1g de EHEC purificada em 30 mL de água deionizada. O polímero foi agitado por 24 h em temperatura ambiente até completa solubilização. Depois, a solução foi aquecida em banho-maria de glicerina até 80°C . Foram testados dois aldeídos como agentes de reticulação (glutaraldeído e glioxal), em diferentes proporções (10-30%, m/v). A quantidade do agente de reticulação utilizada foi calculada em relação a massa do polímero. A reação foi mantida à temperatura constante a 80°C por 4 h, e após a solução ficou em agitação até a temperatura ambiente (25°C). A mesma foi retirada e colocada em uma placa de Petri e deixada secar por 48 h em estufa a 50°C .

4.2.2 Reação de oxidação do filme de EHEC

A oxidação do filme polimérico já reticulado, foi baseado nas metodologias presentes no estudo de Hossain et al. (2009), Jaušovec, Vogrinčič e Kokol (2015) e Chen et al (2022).

As amostras do filme polimérico foram cortadas em tamanho aproximado de 2cm x 2cm, com massa de 50 mg por amostra. Foram adicionadas em um bequer de 100 mL contendo 16 mL de solução tampão acético (pH 5,0)/etanol (80:20), 1,6 mL de solução 5 mmol/L de TEMPO e 3 mg de lacase. A lacase utilizada foi isolada de *Pleurotus ostreatus*. A solução foi colocada no agitador orbital a temperatura ambiente e com rotação de 100 rpm, sob oxigenação constante, em uma adaptação do estudo de Aracri, Vidal e Ragauskas (2011) e Chen et al. (2022). Foi realizada a reação de oxidação em 1, 2, 3 h para avaliação.

4.2.3 Preparação de extração das antocianinas

A extração das antocianinas derivadas das amoras, foi realizada baseando-se no método de Chen (2007). As amoras foram selecionadas e congeladas. Retirou-se do congelador, e foram deixadas em exposição ao ar atmosférico por 15 min. Com auxílio de um gral e pistilo, aproximadamente 60 g de amoras foram maceradas, até a formação de uma polpa. Colocou-se a polpa em um béquer de 500 mL com uma solução de 240 mL de HCl/etanol 15:85. Colocou-se a mistura no banho de ultrassom por 90 min, e 45°C. O extrato foi filtrado a vácuo até que toda a polpa fosse separada do líquido, após ser armazenado em freezer a -20 °C por 15 dias para precipitação dos açúcares presentes. O precipitado foi removido com o auxílio de uma pipeta de Pasteur e submetido à centrifugação de 10 min a 130 rpm para eliminar completamente os açúcares. Esse processo foi repetido duas vezes para assegurar a eficácia da remoção dos açúcares.

4.2.4 Determinação das antocianinas totais

A determinação das antocianinas totais foi realizada utilizando os métodos propostos por Luchese (2017) e Singh (2022), utilizando as equações 1 e 2.

Uma alíquota de 200 µL do extrato concentrado foi adicionada a uma cubeta de quartzo, completando o volume de 800 µL com água. Foi realizada a leitura no espectrofotômetro UV-VIS na faixa de 400 a 700 nm.

$$A = (A_{\lambda 520} - A_{\lambda 700})_{pH\ 1.0} - (A_{\lambda 520} - A_{\lambda 700})_{pH\ 4,5} \quad \text{Equação 1}$$

$$AntT = \frac{A \times PM \times fd \times 1000}{\epsilon \times 1} \quad \text{Equação 2}$$

- AntT é a concentração de antocianinas totais expressas em mg de antocianinas / 100 g de amostra
- A é o valor da absorbância do extrato lida no comprimento de onda estabelecido;

- PM é a massa molar da antocianina em estudo (449,2 g/mol);
- fd fator de diluição;
- ϵ é o coeficiente de extinção molar da antocianina em estudo no comprimento de onda estabelecido (26,900 L mol⁻¹ cm⁻¹).

4.2.5 Avaliação de coloração do extrato

A variação de coloração em diferentes valores de pH é uma característica distintiva das antocianinas; desta forma, após a extração e precipitação dos açúcares, o extrato foi analisado em diferentes pHs por espectroscopia de UV-VIS (Shimadzu, modelo 1800), na faixa de 400 a 700 nm. Para isso, separaram-se 14 tubos de microcentrifuga contendo 200 µL de antocianinas e 800 µL de água deionizada. Então, o pH foi ajustado de 1,0 até 14,0 utilizando solução de NaOH 0,1 mol/L, 1 mol/L ou 6 mol/L.

4.2.6 Incorporação de antocianinas ao filme de EHEC bio-oxidado

A incorporação de antocianinas ao filme polimérico foi realizada com base em uma adaptação da metodologia descrita por Zulkifli (2014), visando à formação de ligações covalentes entre as antocianinas e os grupos funcionais do filme. Adicionalmente, o processo de copigmentação foi implementado para aumentar a estabilidade das antocianinas, melhorando suas propriedades químicas e cromáticas.

Em um béquer, foram adicionados 10 mL do extrato das amoras, equivalentes a aproximadamente $4,6 \times 10^{-3}$ mmol de antocianinas totais. Quando os agentes de copigmentação selecionados foram adicionados, adicionaram-se 10 mg dos mesmos junto à solução contendo antocianinas e a mistura foi agitada em agitador orbital por 30 min, à temperatura ambiente e a 120 rpm. Após os filmes poliméricos oxidados (50 mg) foram colocados no béquer, que foi mantido sob agitação orbital por 90 min a 140 rpm e à temperatura ambiente. O filme modificado foi retirado do béquer e submetido a um processo de lavagem em um outro béquer, por 2 h utilizando 15 mL de água. Depois, os filmes foram retirados e colocados em uma placa Petri para secagem à temperatura ambiente.

Com os filmes já secos, foram conduzidos dois testes de lavagem após a sua incorporação. No primeiro teste, empregou-se água deionizada para remover as antocianinas excedentes. O filme foi submerso em um frasco contendo 10 mL de água deionizada durante 30 min, sendo repetido este procedimento por cinco vezes consecutivas, seguido pela substituição da água deionizada após cada ciclo de lavagem. Em um segundo teste, o mesmo procedimento foi repetido utilizando etanol, com o intuito de avaliar a incorporação efetiva.

Para avaliar o grau de oxidação, a fim de otimizar o tempo de oxidação, foi realizado um ensaio de tingimento com corante azul de metileno. O corante interage com os grupos COOH presentes na superfície do filme possibilitando a sua quantificação através da coloração gerada por espectroscopia de UV-Vis.

A solução do corante azul de metileno foi preparada na proporção 1:100 em pH 7,0. Em um béquer foram adicionados 50 mg do filme oxidado (nos diferentes tempos de oxidação), 100 μ L da solução 1:100 do corante e 50 mL de água desilustrada. A mistura foi colocada sob agitação no shaker a 150 rpm, por 30 min à 30 °C. Após o processo, foram separados os filmes tingidos e analisados no espectrofotômetro UV-Vis, medindo qual filme apresentou a maior coloração de corante em termos de absorbância (Jordanov et al., 2019).

Algumas análises foram realizadas a fim de caracterizar o filme em sua forma final, com o intuito de avaliar as suas propriedades térmicas, suas características e funcionalidades. A análise de espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) foi realizada em uma faixa de número de onda de 500 a 4000 cm^{-1} . Essa análise será realizada para verificar a presença de antocianinas no filme preparado de EHEC (Tirtashi et al, 2019).

A análise por espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier por reflectância total atenuada (FTIR-ATR) foi realizada usando um espectrômetro de infravermelho equipado com acessório de ATR (Attenuated Total Reflectance), operando na faixa de 4000 a 400 cm^{-1} .

Para analisar as propriedades térmicas dos filmes poliméricos, foi realizada uma análise termogravimétrica submetendo os filmes ao aquecimento de 25 °C a 700 °C a uma taxa de aquecimento de 10 °C/min com fluxo de nitrogênio de 20 mL/min (Sani et al., 2022).

Para a avaliação da coloração do filme em diferentes pH's, foi avaliada através de uma análise em diferentes valores de pH. Uma amostra do filme foi colocada em

diferentes pH's (1,0 – 14,0) para avaliar as diferentes colorações do filme conforme aumento de pH (Sani et al, 2022).

4.2.7 Do filme de EHEC incorporado com antocianinas

4.2.7.1 Monitoramento da coloração dos filmes em decorrência da deterioração em alimentos

O monitoramento do filme indicador foi realizado com base no estudo de Ezati e Rhim (2020), utilizando o camarão como alimento modelo. O objetivo do estudo foi avaliar a eficácia do filme na detecção da deterioração do camarão armazenado em condições típicas da casa do consumidor, especificamente na geladeira a 4°C, durante um período de seis dias. Para a experimentação, dois camarões de aproximadamente 30 g foram colocados em cada placa de Petri, as quais foram tampadas, e na tampa o filme indicador de 1 cm x 1 cm foi acoplado ao meio da placa; desta forma, a liberação de toxinas dos camarões conseguia reagir com o filme indicador.

O filme, incorporado com antocianinas, foi monitorado quanto às mudanças de cor ao longo desse período, com o objetivo de avaliar a deterioração do camarão. Durante os seis dias de monitoramento, e uma vez ao dia, observou-se uma mudança gradual na coloração do filme, que variou de tons rosados claros para amarelos ou esverdeados. Essas alterações indicaram de forma visual e direta o avanço da degradação do alimento, correlacionando a alteração da cor do filme com a perda de frescor do camarão.

Esse tipo de monitoramento permite não apenas um acompanhamento qualitativo da frescura do produto, mas também oferece uma solução prática e acessível para embalagens inteligentes, que podem ser utilizadas para a detecção de deterioração de alimentos em casa, proporcionando uma maneira simples e eficaz de garantir a qualidade dos alimentos consumidos.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Extração e análise do extrato

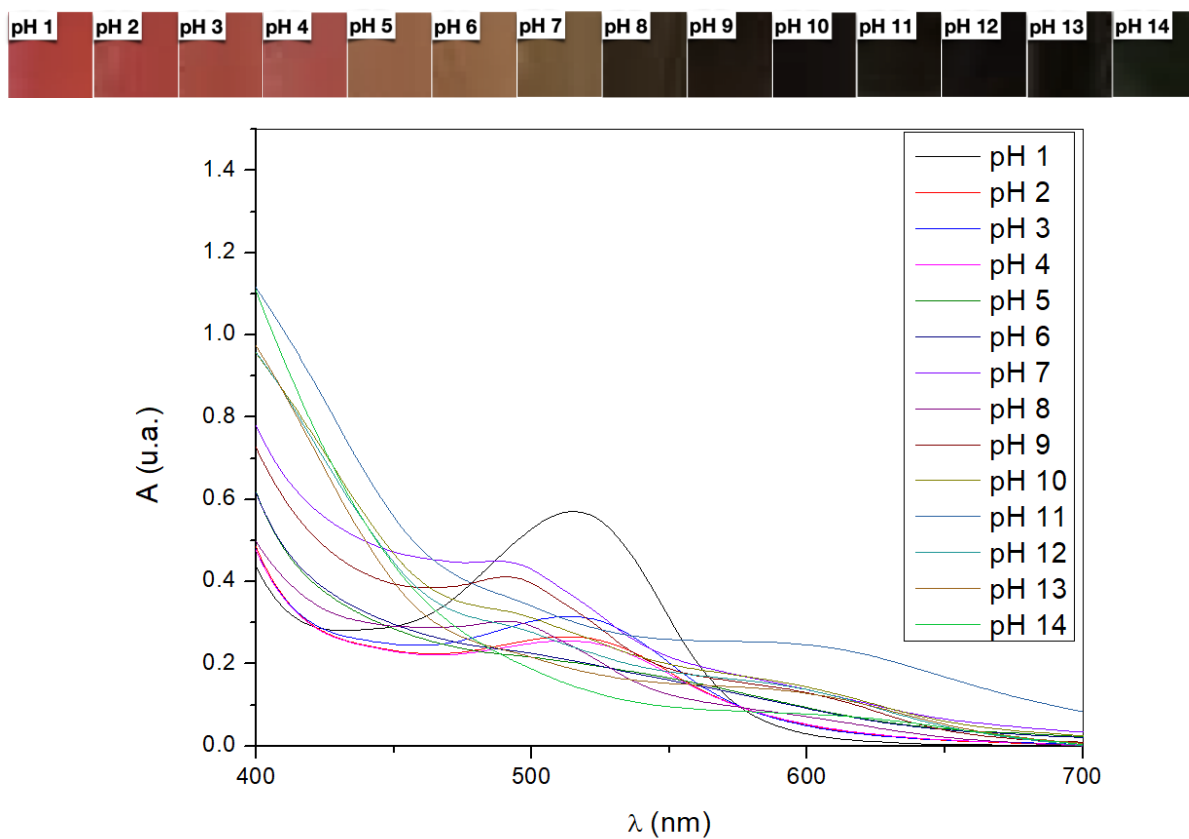
A extração da antocianina das amoras foi realizada utilizando as frutas congeladas e maceradas submetidas a meio ácido (HCl) e etanol na proporção 80:20 e a banho ultrassônico por 90 min à temperatura de 30 °C. A extração foi realizada seguindo a metodologia de Chen (2007) e, foi bem-sucedida, tendo como resultante um extrato de coloração rosa com odor característico. Na literatura é comum a purificação dos extratos por cromatografia em coluna utilizando resinas catiônicas, como descrito por Chen et al. (2007) e Choi et al. (2017), a fim de remover interferentes e concentrar as antocianinas. No entanto, essa técnica implica perdas significativas de rendimento, o que pode comprometer a viabilidade do processo em escala. Desta forma, após o processo de extração, o extrato foi deixado a -20 °C por 15 dias para precipitação dos açúcares residuais, sendo estes os que poderiam interferir, pois podem agir como nucleófilos competidores. Depois foi centrifugado para a separação do sobrenadante contendo as antocianinas que foram utilizadas nas próximas etapas.

Figura 10 – Processo de extração

Fonte: A autora

Para a análise de variação de cor do extrato em diferentes pHs, uma alíquota do extrato foi retirada e a essa alíquota foi adicionada solução de pH apropriado. Foi possível identificar o deslocamento da banda de máxima absorção de acordo com o pH aplicado, conforme a Figura 11. Observa-se uma diminuição da banda conforme o pH vai aumentando de 1,0 a 4,0 em correlação com as cores apresentadas. Em pHs de 2,0 – 4,0, a estrutura predominante começa a ser a base quinoidal. A partir do pH 5,0, o comprimento de onda aos poucos se desloca para aproximadamente 496 nm, tendo seu máximo de absorbância em pH 7,0, conforme a estrutura do cátion flavínio se transforma em uma espécie menos conjugada, as chalconas. A partir do pH 8,0 começa o aparecimento de uma banda de maior comprimento de onda, em aproximadamente 600 nm, que pode ser correlacionada com a estrutura quinoidal básica de coloração mais escura (Luchese et al, 2018; Liu;Fu;Nian, 2014).

Figura 11 – Espectro de absorvância do extrato de amoras em diferentes pHs.



Fonte: A autora

5.1.1. Determinação do teor de antocianinas totais

Para determinação do teor de antocianinas totais presentes, realizou-se a análise do extrato em pH 1,0 e pH 4,5 através de espectroscopia de UV-VIS utilizando o método de Luchese (2017) e Singh (2022). Verificou-se que a banda de máxima absorção obtida foi em aproximadamente 530 nm, em pH 1,0, o que indica a presença majoritária da antocianina cianidina-3-glicosídeo no extrato (Singh et al, 2022). A quantidade de antocianinas totais encontrada por 100 g de amostra foi de 32,6 mg. Baseada na massa de amostra utilizada (130 g) e no volume de solvente extrator utilizado (100 mL), encontrou-se a relação aproximada de 0,42 mg de antocianinas totais por mL de extrato.

O valor encontrado de antocianinas totais compara-se com os valores encontrados na literatura, conforme tabela abaixo:

Tabela 3 – Valores encontrados de antocianinas totais na literatura

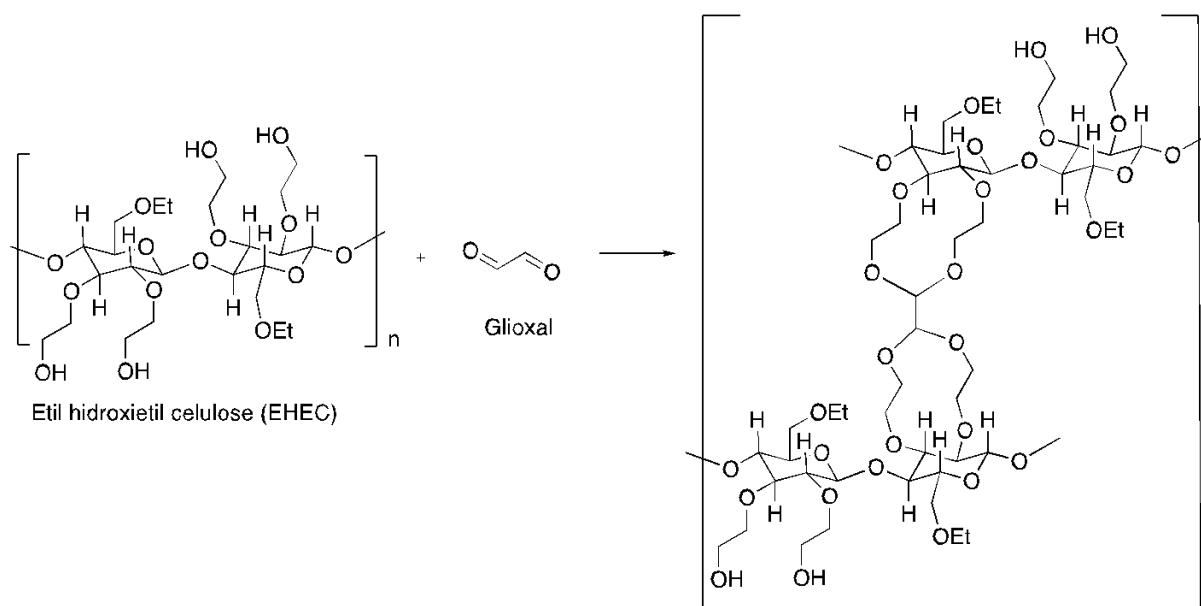
Literatura	Quantidade	Fonte das antocianinas
Tirtashi (2019)	10mg/100 mL de extrato	Cenouras pretas
Luchese (2017)	31 mg/100 mL de extrato	Blueberries
Goodarzi (2020)	10 mg/100 mL de extrato	Cenouras
Fei (2021)	23,10 mg/100 mL de extrato	Blueberries

Fonte: A autora

5.2 Obtenção do filme polimérico

O processo de preparação do filme polimérico envolveu a reticulação do polímero EHEC com um agente reticulante, o qual induz a formação de uma rede entre as cadeias poliméricas. Esse procedimento resulta em um filme que é insolúvel em água, tornando-o ideal para aplicações em embalagens de alimentos (Calejo et al., 2019; Hedin et al., 2009).

Entre os agentes reticulantes químicos, destacam-se o glicolal e o glutaraldeído. Esses compostos dialdeídos são capazes de estabelecer ligações covalentes entre as cadeias poliméricas do EHEC (Colombi et al., 2024; Zhang et al., 2006). A Figura 12 mostra a reticulação do glicolal com o polímero EHEC, através de uma reação química onde o glicolal, um dialdeído simples com a fórmula química OCH(O)CHO , reage com grupos hidroxila ($-\text{OH}$) presentes nas cadeias do polímero. A formação dessas ligações cruzadas altera a estrutura molecular do EHEC, transformando-o de uma estrutura linear ou ramificada em uma estrutura reticulada tridimensional (Colombi et al., 2024; Doustdar et al., 2022; Kharaghani et al., 2020; Zhang; Zhu; Edgren, 2009).

Figura 12 - Glioxal atuando como agente reticulante nos filmes a base de EHEC

Fonte: A autora

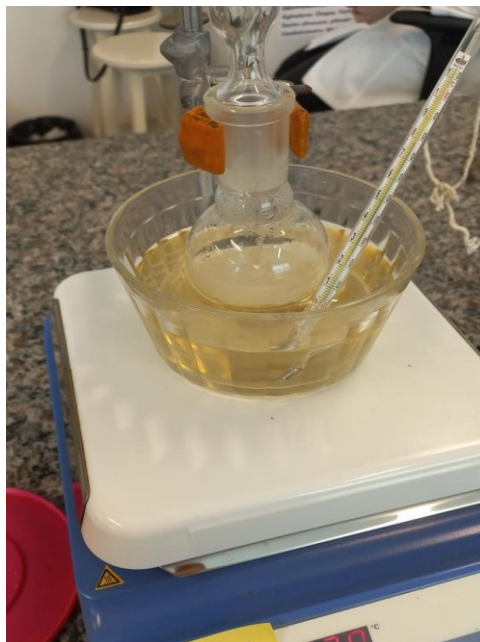
O procedimento para a preparação dos filmes poliméricos envolveu a utilização dos dois agentes reticulantes citados para os testes iniciais. Diferentes quantidades foram avaliadas nas mesmas proporções para os dois agentes conforme especificado na Tabela 2. O polímero foi solubilizado e aquecido a 80 °C por 4 h para a realização da reação com o agente reticulante (Gonsalves et al., 2011; Hernández-Muñoz; Villalobos; Chiralt, 2004). A Figura 13 demonstra o esquema montado do polímero solubilizado em um balão de reação para a reticulação com os agentes reticulantes.

Tabela 4 - Composição dos filmes de EHEC

Identificação	Composição do filme de EHEC		
	EHEC (mg)	% Glutaraldeído	% Glioxal
EHEC10GA	500	10	-
EHEC20GA	500	20	-
EHEC30GA	500	30	-
EHEC10GX	500	-	10
EHEC20GX	500	-	20
EHEC30GX	500	-	30

Fonte: A Autora

Figura 13 - Esquema de reticulação do EHEC com os agentes reticulantes



Fonte: A autora

A reticulação da EHEC tem como objetivo a formação de um filme insolúvel em água, visando à sua aplicação em embalagens de alimentos. Como um teste inicial de avaliação do melhor procedimento de reticulação, foram realizados testes de submersão em água. Filmes de 2 cm x 2 cm foram imersos em um béquer contendo 20 mL de água deionizada e deixados em repouso à temperatura ambiente por 5 dias. O filme reticulado com glutaraldeído (inclusive com a maior quantidade), apesar de apresentar uma boa formação inicial, se solubilizou parcialmente em água. Isso ocorreu porque, embora o glutaraldeído seja um agente reticulante eficaz, formando ligações covalentes entre as cadeias poliméricas da EHEC, a quantidade utilizada não foi suficiente para garantir uma estrutura totalmente insolúvel. Esse comportamento sugere que a quantidade do agente reticulante glutaraldeído deveria ser maior, porém, em termos de viabilidade econômica, não seria viável. Em contrapartida, o agente reticulante glicoxal mostrou melhores resultados mesmo utilizando-se apenas 10% em relação à massa da EHEC; o filme se mostrou viável mesmo submerso em água. Além disso, o glicoxal apresenta baixa toxicidade quando comparado ao glutaraldeído. A toxicidade aguda de uma substância é comumente avaliada pelo LD₅₀ (dose letal mediana), que representa a quantidade necessária para causar a morte de 50% dos indivíduos testados, geralmente expressa em mg/kg. Esses valores são obtidos a

partir da Ficha de Dados de Segurança (FDS) dos produtos. No caso do glioxal, o LD_{50} é superior a 2.000 mg/kg, enquanto o do glutaraldeído é inferior a 200 mg/kg. Quanto maior o valor de LD_{50} , menor a toxicidade da substância, pois isso indica que são necessárias doses muito mais altas para causar efeitos letais (Associação Brasileira de Normas Técnicas, 2023; Hernández-muñoz; Villalobos; Chiralt, 2004; Zhang et al., 2006). Dessa forma, o glioxal se apresenta como uma alternativa significativamente menos tóxica quando comparado ao glutaraldeído, o que torna uma opção positiva para a aplicação em embalagens para alimentos.

Diante do exposto, optou-se por prosseguir com o desenvolvimento do filme utilizando o 10% de glioxal como agente reticulante.

5.3 Reação de biooxidação

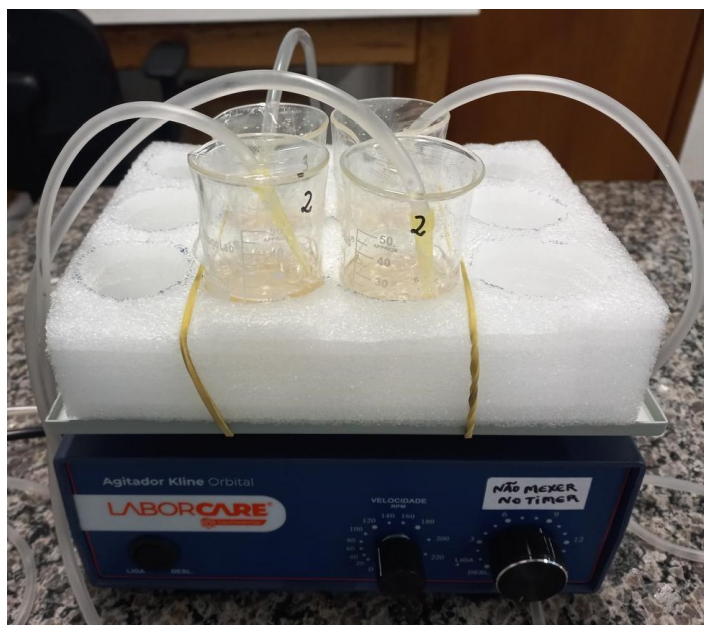
A modificação de superfícies de filmes poliméricos por meio de reações de oxidação se destaca como uma estratégia eficaz para melhorar propriedades físicas e químicas. A reação de oxidação altera os grupos funcionais da camada externa do material, transformando grupos CH_2OH em carboxila ($-COOH$) e/ou carbonila ($-C=O$). Esses grupos são eletrofílicos e podem reagir com compostos contendo grupamentos nucleofílicos de maneira controlada. O grupo carboxila, por exemplo, é amplamente utilizado para melhorar a aderência e a biocompatibilidade, além de facilitar reações de acoplamento covalente com moléculas que contenham grupos nucleofílicos, formando ligações estáveis e duradouras (Korica et al, 2021, p 04; Chen et al, 2022; Deng et al, 2022).

Neste contexto, para que essas modificações ocorram de maneira branda, eficiente e ambientalmente amigável, os métodos de biooxidação, ou seja, a oxidação utilizando enzimas, surgem como alternativas promissoras. As lacases são enzimas capazes de oxidar uma ampla variedade de substratos orgânicos, especialmente na presença de mediadores, conforme já explicado.

Sendo assim, testes de biooxidação utilizando Laccase isolada de *Pleurotus ostreatus* e o mediador TEMPO foram iniciados. A reação de oxidação foi testada em três tempos distintos: 1, 2 e 3 h de agitação, mantendo-se constante a quantidade de enzima e de mediador em relação à massa de filme conforme metodologia aplicada no estudo de Aracri (2010) e Chen (2022). Durante todo o período de reação, o

sistema foi oxigenado. A Figura 14 demonstra o esquema montado para a realização da oxidação do filme.

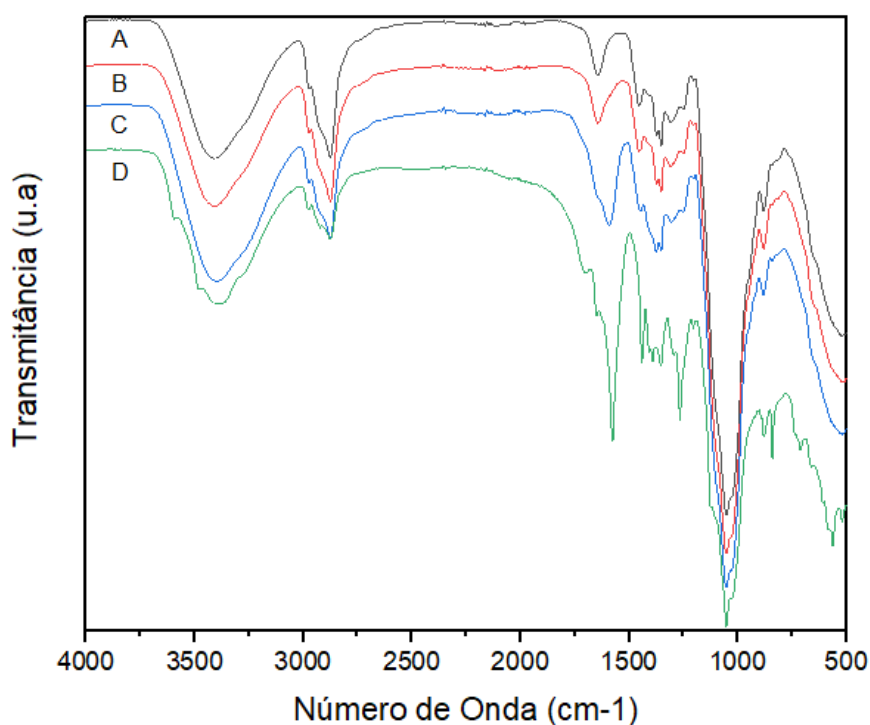
Figura 14 - Esquema de oxidação dos filmes



Fonte: A autora

Após cada período, foram realizadas as análises por espectroscopia no infravermelho (FTIR) para determinar a melhor opção, conforme Figura 15.

Figura 15 - Espectros de FTIR para avaliação dos filmes bio-oxidados e não oxidados. **(A)** - Amostra de filme de EHEC reticulado com Glioxal, sem o processo de biooxidação. **(B)**- Amostra de filme de EHEC reticulado com Glioxal, bio-oxidado por 1 hora. **(C)** - Amostra de filme de EHEC reticulado com Glioxal, bio-oxidado por 2 h. **(D)** - Amostra de filme de EHEC reticulado com Glioxal, bio-oxidado por 3 h.



Fonte: A autora

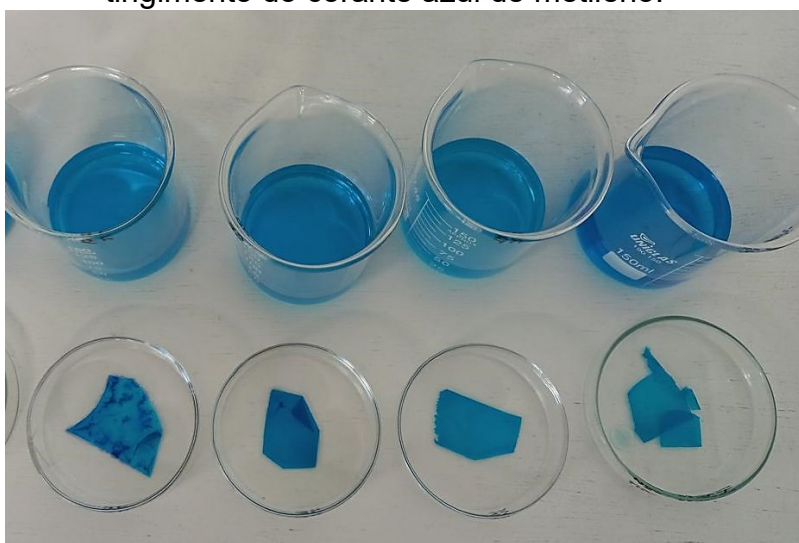
A análise do espectro de FTIR revelou várias bandas características, que fornecem informações sobre os grupos funcionais presentes na amostra. A banda alargada em aproximadamente 3.400 cm^{-1} é atribuída ao estiramento dos grupos hidroxila (OH), indicando a presença de grupos álcool, mesmo na estrutura do EHEC não oxidado. A banda em torno de 2.800 cm^{-1} corresponde ao estiramento das ligações C-H, característico de compostos com grupos alifáticos, e aparece em todas as análises. A região de $1.700\text{--}1.730\text{ cm}^{-1}$ abarca sinais associados ao estiramento da ligação C=O, sugerindo a presença de carbonilas. Observando os espectros dos filmes oxidados em 2 h e 3 h pode-se verificar um alargamento maior nessa região quando comparado ao tempo de 1 hora e ao filme sem a biooxidação, o que pode indicar uma maior oxidação. Além disso, a banda localizada entre $1.100\text{--}1.200\text{ cm}^{-1}$ é atribuída ao estiramento da ligação C-O, indicando a presença de éteres ou álcoois (Dong et al, 2021).

Para fazer uma análise mais precisa e avaliar realmente a eficácia da oxidação, foi também realizado um ensaio de tingimento utilizando o corante azul de metileno. Os filmes poliméricos foram submetidos aos três tempos de biooxidação e tingidos com corante azul de metileno conforme metodologia adaptada de Jordanov

(2019). O azul de metileno, um corante catiônico, interage com os grupos carboxila ($-\text{COOH}$) presentes nas cadeias poliméricas oxidadas. Durante o processo de biooxidação, a lacase modifica a superfície do filme, introduzindo esses grupos funcionais. Essa interação resulta na absorção do corante pelo filme, conferindo-lhe uma coloração característica, maior quanto maior a proporção de grupos COOH (Jordanov et al, 2019).

Após o tingimento, realizou-se a quantificação da concentração de azul de metileno nos filmes por espectrofotometria no UV-vis, com o objetivo de determinar com qual filme o corante interagiu mais. Conforme o esperado, os resultados mostraram que a quantidade de corante presente nos filmes bio-oxidados aumentou com o tempo de oxidação, devido à maior quantidade de grupo COOH em sua superfície. Por outro lado, o filme sem oxidação apresentou menor afinidade pelo corante, resultando em uma coloração menos pronunciada. Este teste não apenas confirma a eficácia da oxidação na modificação da estrutura do filme polimérico, mas também demonstra como a introdução de grupos funcionais pode ser usada para melhorar a interação do filme com corantes e, potencialmente, para outras aplicações, como no desenvolvimento de embalagens inteligentes.

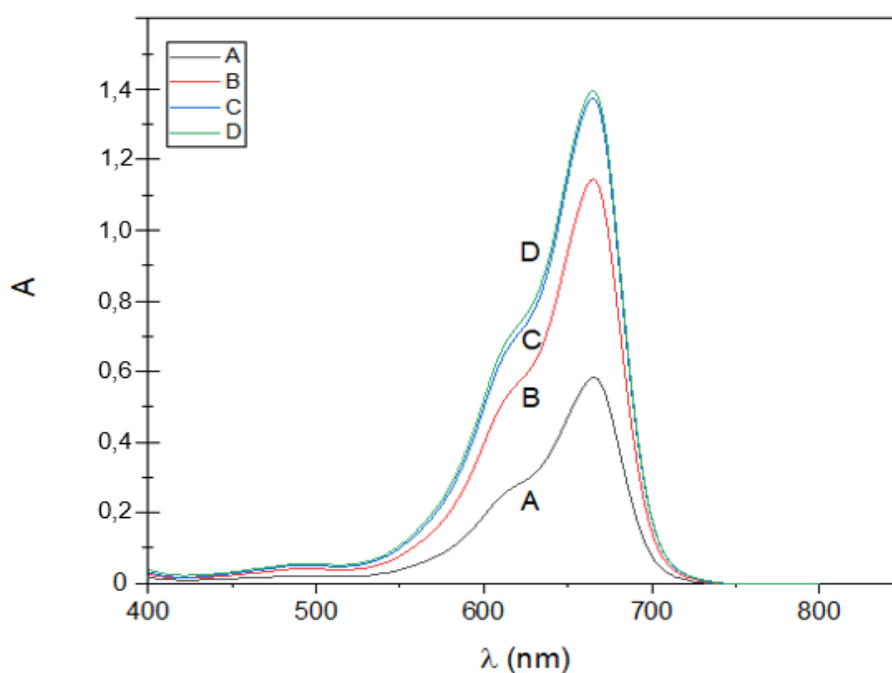
Figura 16 - Filmes e banho após o tingimento com azul de metileno. **(A)** - Filme de EHEC reticulado com Glioal, sem oxidação, após o tingimento do corante azul de metileno. **(B)** - Filme de EHEC reticulado com Glioal, bio-oxidado por 1 h, após o tingimento do corante azul de metileno. **(C)** - Filme de EHEC reticulado com Glioal, bio-oxidado por 2 h, após o tingimento do corante azul de metileno. **(D)** - Filme de EHEC reticulado com Glioal, bio-oxidado por 3 h, após o tingimento do corante azul de metileno.



Fonte: A autora

Os filmes foram analisados através da espectroscopia de UV-VIS conforme a Figura 17.

Figura 17 - Espectros de UV-VIS dos filmes poliméricos para avaliação do melhor filme na incorporação do corante azul de metileno. **(A)** - Filme de EHEC reticulado com Glicoxal, sem oxidação, após o tingimento do corante azul de metileno. **(B)** - Filme de EHEC reticulado com Glicoxal, bio-oxidado por 1 h, após o tingimento do corante azul de metileno. **(C)** - Filme de EHEC reticulado com Glicoxal, bio-oxidado por 2 h, após o tingimento do corante azul de metileno. **(D)** - Filme de EHEC reticulado com Glicoxal, bio-oxidado por 3 h, após o tingimento do corante azul de metileno.



Fonte: A autora

Ao analisar a incorporação do corante azul de metileno no filme não oxidado e nos filmes oxidados, observa-se que a incorporação foi mais eficiente nos filmes oxidados, através da observação da banda em 650 nm (Bibi et al, 2021, p. 05). Entre os diferentes tempos de oxidação, os filmes tratados por 2 h e 3 h apresentaram praticamente a mesma eficiência de tingimento, enquanto o filme oxidado por 1 h demonstrou uma incorporação ligeiramente menor. Isso indica que, após 2 h, o número de grupos oxidados permanece constante e não se justifica deixar a reação de oxidação por mais tempo.

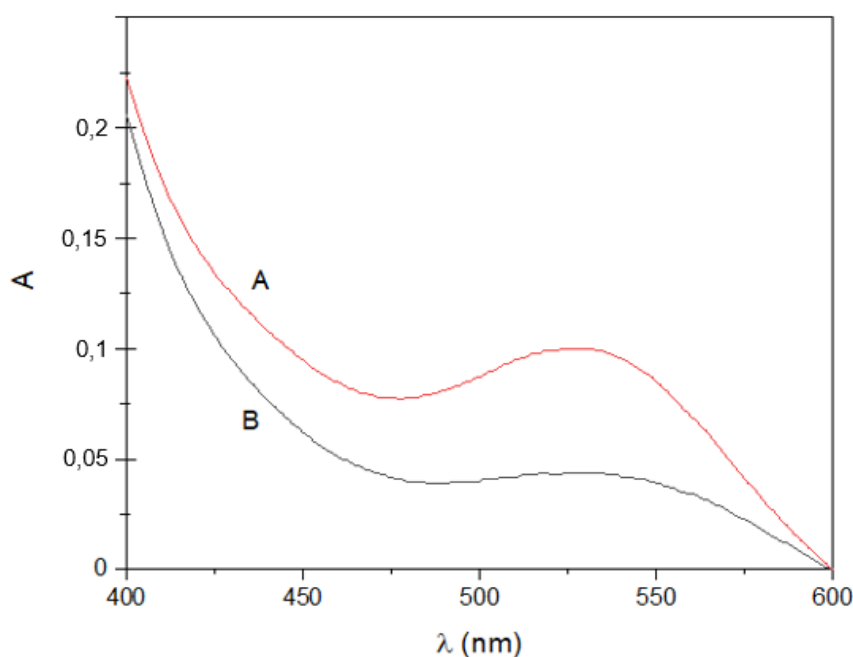
Assim, decidiu-se prosseguir com o filme oxidado por 2 h para o desenvolvimento do projeto.

5.4 Incorporação das antocianinas no filme polimérico

A incorporação de antocianinas ao filme de EHEC bio-oxidado foi conduzida com o objetivo de estabelecer ligações covalentes entre esses compostos bioativos e os grupos funcionais gerados na superfície do filme, por meio da oxidação mediada por laccase. Essa ligação visa promover uma integração estável das antocianinas à matriz polimérica, resultando em uma plataforma funcional sensível a alterações no ambiente.

A metodologia de incorporação foi realizada por meio da mistura entre o extrato e o filme biooxidado agitados a 120 rpm por 2 h, e, paralelamente, a mesma metodologia foi realizada para o filme que não foi submetido à oxidação, a fim de comparar os dois filmes. Após a reação e secagem do filme, o mesmo foi submetido a uma lavagem preliminar de 30 min para remoção das antocianinas excedentes. Para verificação e comprovação de que a oxidação e a incorporação foram efetivas (não apenas visualmente), realizou-se uma análise por espectroscopia UV-Vis dos dois filmes.

Figura 18 - Espectros de UV-VIS dos filmes para avaliação da efetivação da biooxidação. **(A)** - Filme de EHEC reticulado com glioxal, bio-oxidado com enzima, após a incorporação de antocianinas e lavagem de 30 min com água. **(B)**- Filme de EHEC reticulado com glioxal, após a incorporação de antocianinas e lavagem de 30 min com água.

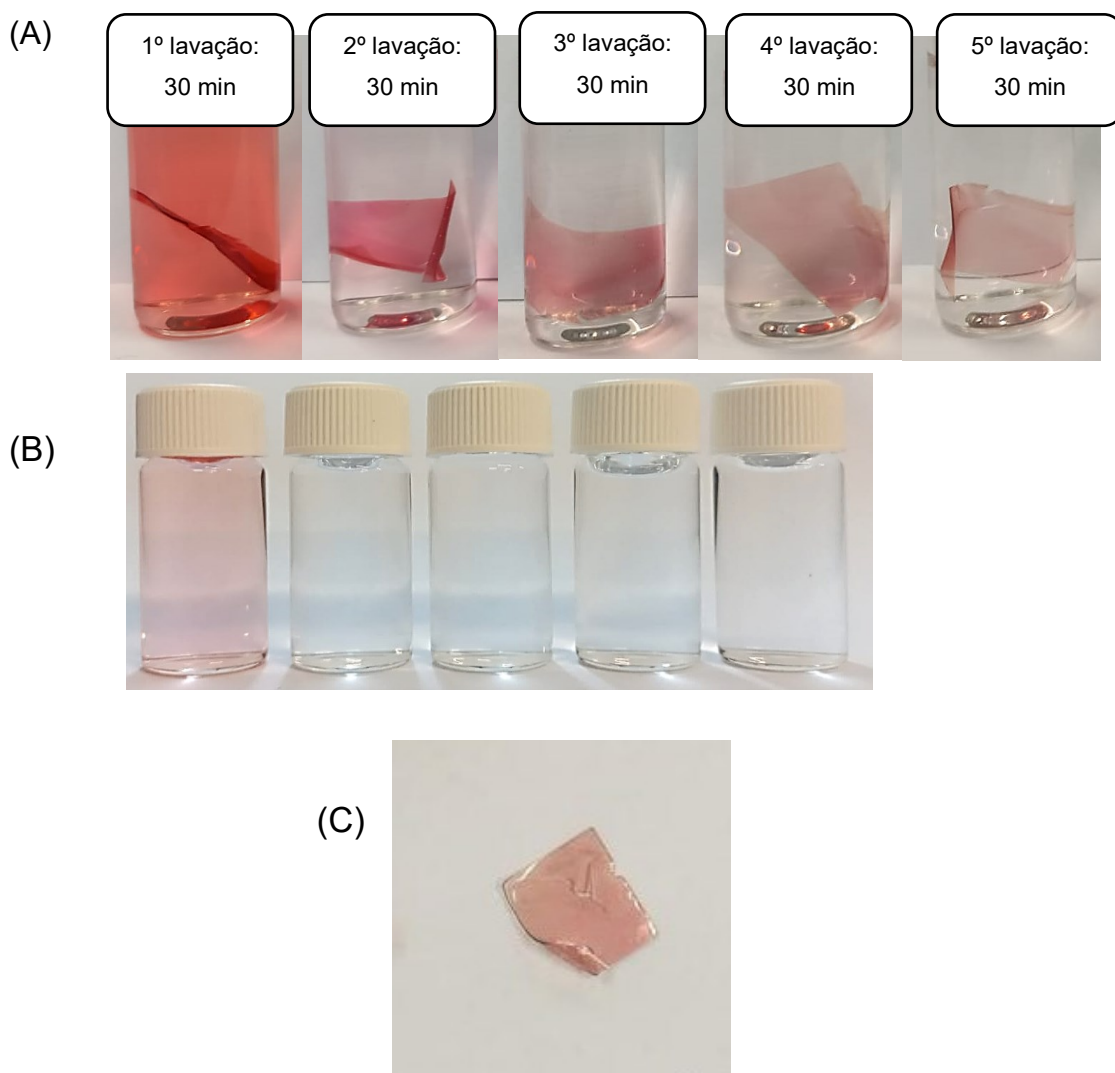


Fonte: A autora

Observa-se que o espectro do filme bio-oxidado e incorporado com antocianinas apresenta uma banda mais intensa em comparação ao filme não oxidado, indicando que a oxidação foi eficaz e resultou em um bom desempenho do processo.

Para o filme bio-oxidado, foi realizada uma otimização do processo de lavagem, a fim de determinar o número de lavagens e avaliar a quantidade de antocianinas excedentes. Esse procedimento teve como objetivo garantir que toda a antocianina apenas depositada fisicamente na superfície do filme fosse retirada para que não houvesse interferência nas análises subsequentes.

Figura 19 - Teste de lavação do filme bio-oxidado e incorporado com antocianinas a fim de avaliar as antocianinas excedentes. (a) Teste de lavação com; (b) Água residual da lavação com água; (c) Filme após a lavação com água.



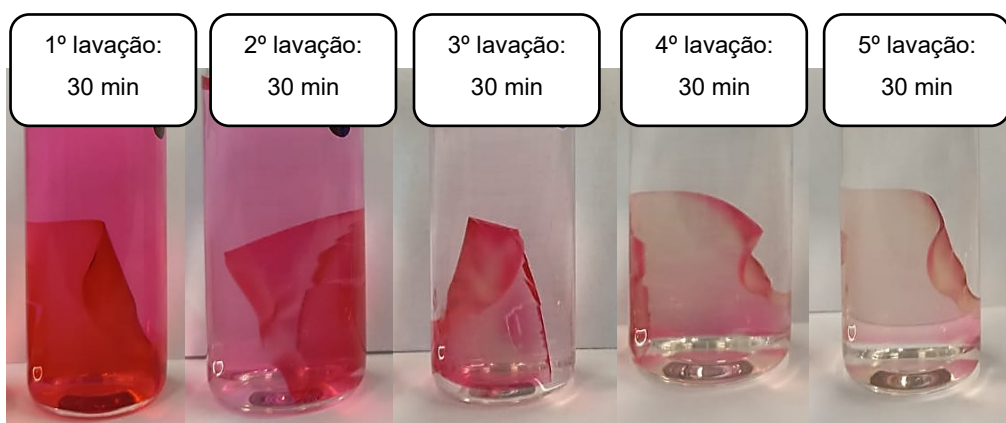
Fonte: A autora

Observou-se visualmente que na segunda lavagem, a quantidade residual de antocianinas na solução foi mínima e que o filme após a terceira lavagem permaneceu na coloração salmão, o que levou à padronização de até 2 lavagens de 30 min para cada filme.

O mesmo processo foi realizado com etanol para verificar a aderência das antocianinas ao filme.

Figura 20 - Teste de lavação do filme bio-oxidado e incorporado com antocianinas a fim de avaliar as antocianinas excedentes em etanol. (a) Teste de lavação com etanol; (b) Água residual da lavação com etanol; (c) Filme após a lavação com etanol.

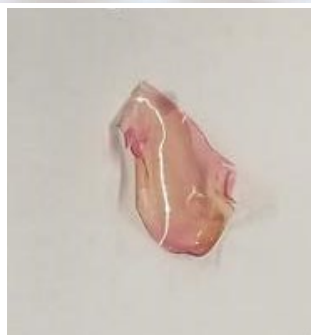
(A)



(B)



(C)



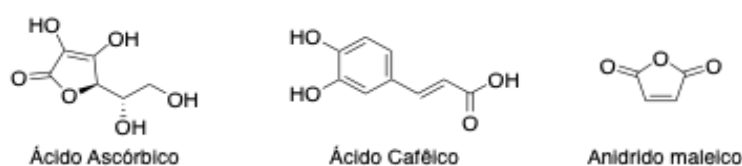
Fonte: A autora

A lavagem do filme com etanol (Figura 20) foi realizada, pois as antocianinas possuem maior solubilidade em etanol do que em água. Assim, esse teste foi feito como indicativo de que ocorreu a ligação covalente das antocianinas à matriz polimérica. Após a lavagem, visualmente verificou-se que a coloração rosada permaneceu até a terceira lavagem (visualização melhor na Figura 20), e a quarta e quinta lavagem o filme permaneceu em uma coloração salmão.

Com o intuito de otimizar e melhorar a estabilidade das antocianinas, realçando suas propriedades cromáticas, foi aplicada uma metodologia de copigmentação. Essa visava não apenas proteger as antocianinas de processos de degradação, como também intensificar a vivacidade de suas cores, ampliando sua eficiência como indicador visual de mudanças químicas associadas à deterioração de alimentos (Cai et al, 2022; Qian et al, 2017). Compostos como ácidos fenólicos, taninos e flavonoides interagem com as antocianinas por meio de ligações hidrogênio, empilhamento π - π e complexação metálica, formando estruturas mais estáveis e resistentes a variações de pH, luz e oxidação (Cai et al, 2022; Qian et al, 2017).

As avaliações dos agentes copigmentantes foram realizadas para identificar o composto mais eficiente em estabilizar as antocianinas na matriz do filme. Três agentes copigmentantes foram testados: ácido ascórbico, ácido cafeico e anidrido maleico.

Figura 21 - Estrutura dos copigmentantes

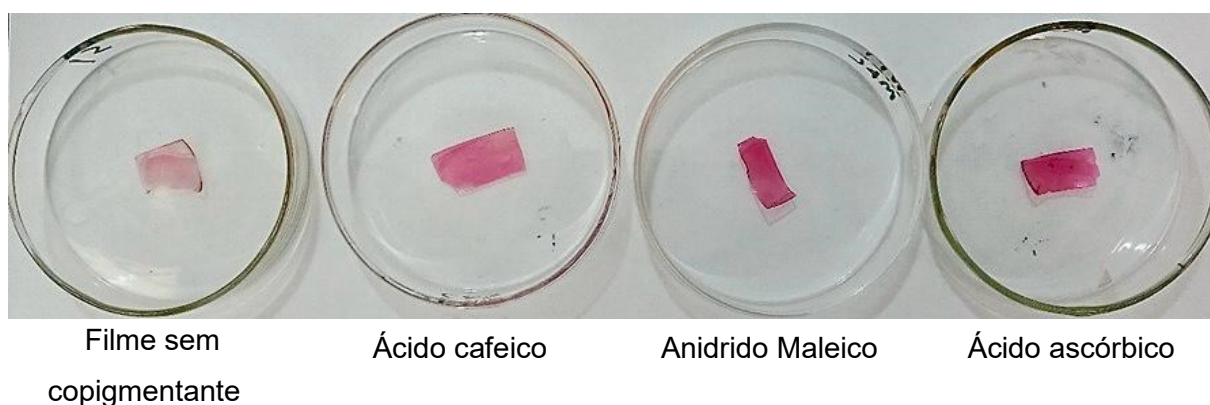


Fonte: A autora

A metodologia consistiu em adicionar o agente copigmentante ao extrato de antocianinas por 30 min antes de incorporar a mistura ao filme biooxidado. Esse tempo de 30 min de pré-incorporação, somado ao tempo total de incorporação do extrato ao filme, resultou em um total de 2 h para a interação entre os copigmentos e as antocianinas. Esse procedimento foi desenvolvido com o objetivo de maximizar a eficiência da incorporação e garantir que as antocianinas e os copigmentos formassem uma combinação estável e funcional na superfície do filme polimérico.

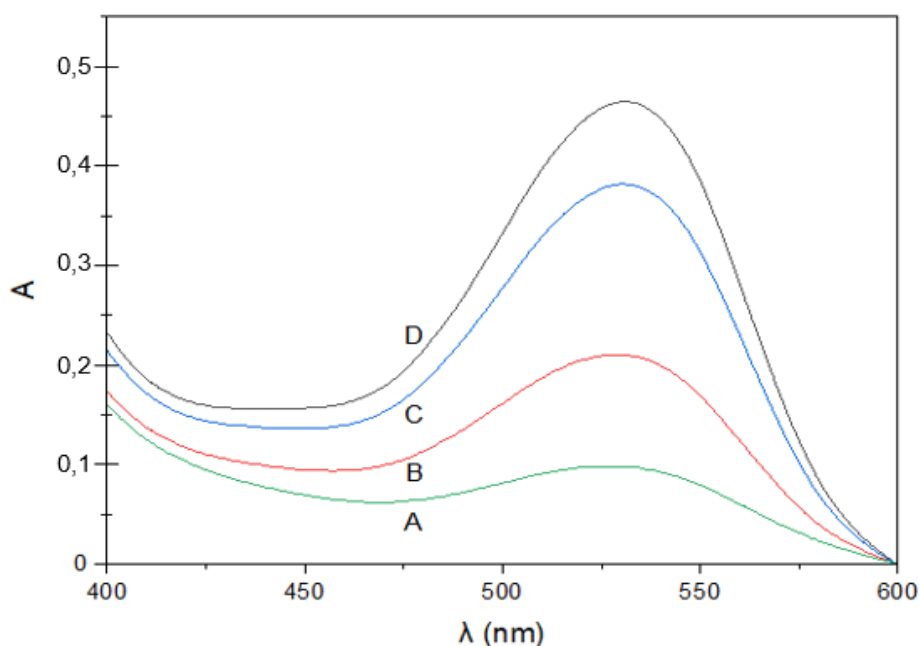
A Figura 22 apresenta os filmes após a incorporação das antocianinas e lavagens. Nota-se que o primeiro filme, sem a adição de copigmentante, apresenta uma coloração significativamente mais clara em comparação aos demais. Por outro lado, a incorporação do ácido ascórbico como copigmentante resultou em uma coloração mais intensa, evidenciando sua influência na estabilidade e no realce da tonalidade do filme.

Figura 22 - Filmes copigmentados com antocianinas



Para uma análise mais criteriosa da intensidade de coloração, realizou-se uma análise por espectroscopia por UV-Vis dos 4 filmes, que estão apresentados na Figura 23.

Figura 23 - Espectro de UV-VIS das amostras dos filmes com os diferentes agentes copigmentantes. **(A)** - Amostra de filme de EHEC incorporado com antocianinas, sem agente copigmentante. **(B)**- Amostra de filme de EHEC incorporado com antocianinas, com ácido cafeico. **(C)**- Amostra de filme de EHEC incorporado com antocianinas, com anidrido maleico. **(D)**- Amostra de filme de EHEC incorporado com antocianinas, com ácido ascórbico.



Fonte: A autora

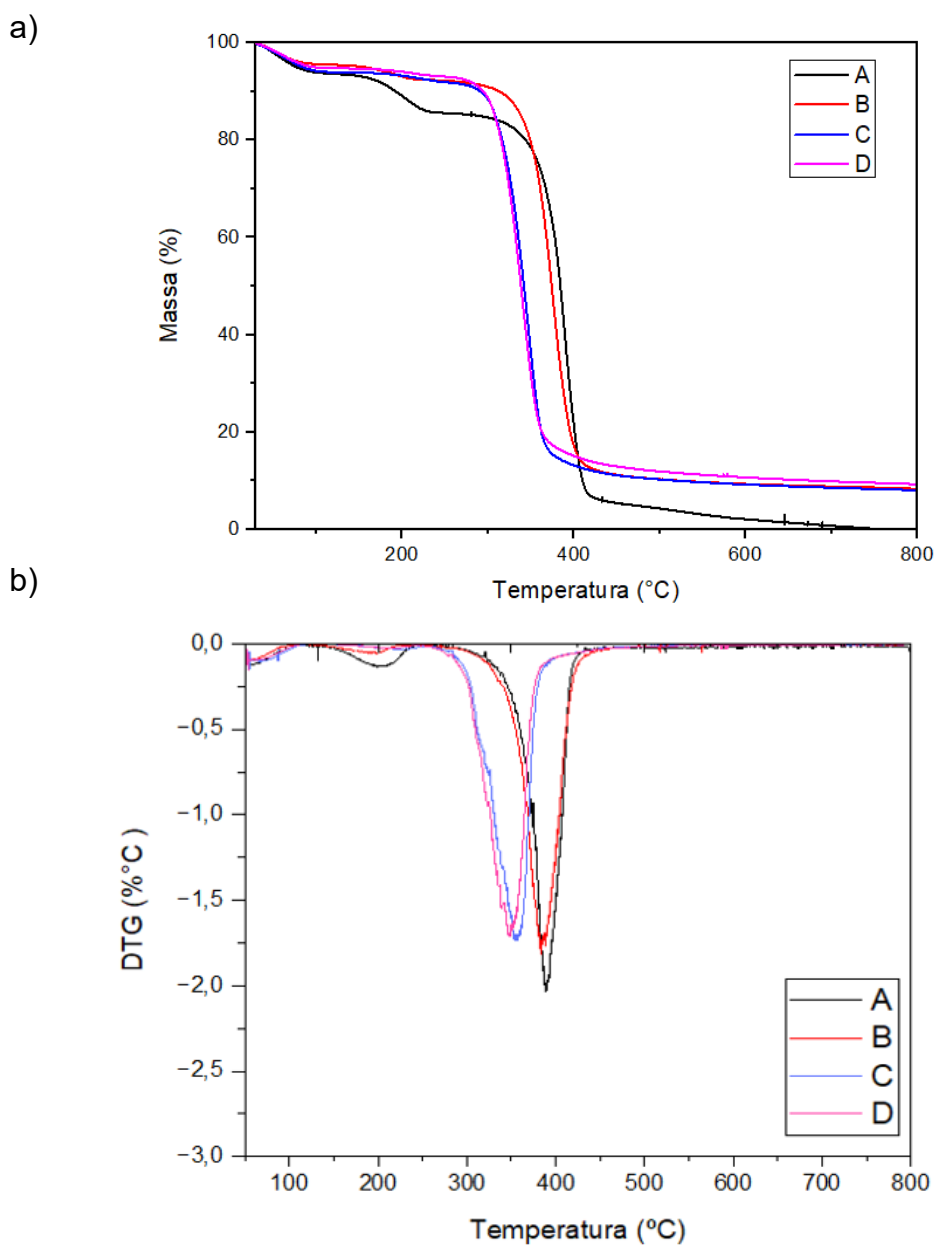
A análise espectrofotométrica evidenciou que o ácido ascórbico foi o agente mais eficaz, pois o filme submetido a condição que o utilizava apresentou maior absorbância na faixa característica das antocianinas. Esse resultado indica que o ácido ascórbico promove interações favoráveis com as antocianinas, aumentando a pigmentação.

Após a realização dos testes de incorporação das antocianinas ao filme e da aplicação de agentes copigmentantes, verificou-se que o melhor desempenho, considerando todas as análises realizadas, foi obtido pelo filme bio-oxidado e incorporado com antocianinas na presença de ácido ascórbico. Esse filme apresentou as melhores características em termos de estabilidade e potencial funcional, sendo, portanto, o escolhido para dar continuidade aos testes com alimentos.

5.5 Termo estabilidade - Análise de TGA e DTG

A análise por TGA mede as mudanças de massa de um material em função da temperatura. O perfil térmico dos filmes pode ser medido através de análise termogravimétrica e termogravimetria derivada (DTG) (Cuthbertson, et al, 2024). A Figura 24 apresenta os resultados de TGA e DTG para os filmes preparados

Figura 24 – (A) Filme de EHEC sem a bio-oxidação. **(B)** Filme de EHEC bio-oxidado. **(C)** Filme de EHEC bio-oxidado e incorporado com antocianinas. **(D)** Filme de EHEC bio-oxidado incorporado com antocianinas e ácido ascórbico.



Avaliando inicialmente pela curva de TGA pode-se verificar que todos os filmes apresentam uma perda de massa referente a água próximo a 100°C. Para o filme sem a bio-oxidação (A) apresenta uma segunda perda de massa referente ao glioxal próximo de 200°C. Os filmes de EHEC sem bio-oxidação (A) e bio-oxidado (B) apresentam maior estabilidade térmica com temperatura máxima (Tmax) de 383 °C e 390 °C, respectivamente. Os filmes com a incorporação de antocianina (filme C e filme D) apresentam uma menor estabilidade térmica comparados aos outros filmes, com Tmax para o filme C em 355 °C e para o filme D em 348 °C.

A maior perda de massa foi observada a partir de 370 °C. Os filmes C e D apresentaram perdas mais elevadas (83,57% e 81,91%, respectivamente) que podem ser atribuídas ao extrato orgânico presente nas amostras (antocianinas). Já os filmes A e B apresentaram menores perdas de massa (32,13% e 42,81%, respectivamente). A perda de massa em 100 °C foi relativamente baixa para todas as amostras, variando entre 4,52% e 6,2%, correspondente à eliminação da água.

Embora as curvas A e B (filmes sem a presença das antocianinas) tenham apresentado maior estabilidade térmica, a curva D (filme com antocianina) também demonstrou um desempenho térmico satisfatório, levando em consideração que a aplicação da etiqueta será em uso de embalagens para alimentos, das quais não ultrapassam uma temperatura maior que 35°C durante o armazenamento.

Tabela 5 – Resultados de perda de massa e massa residual para os filmes a partir das curvas de TGA

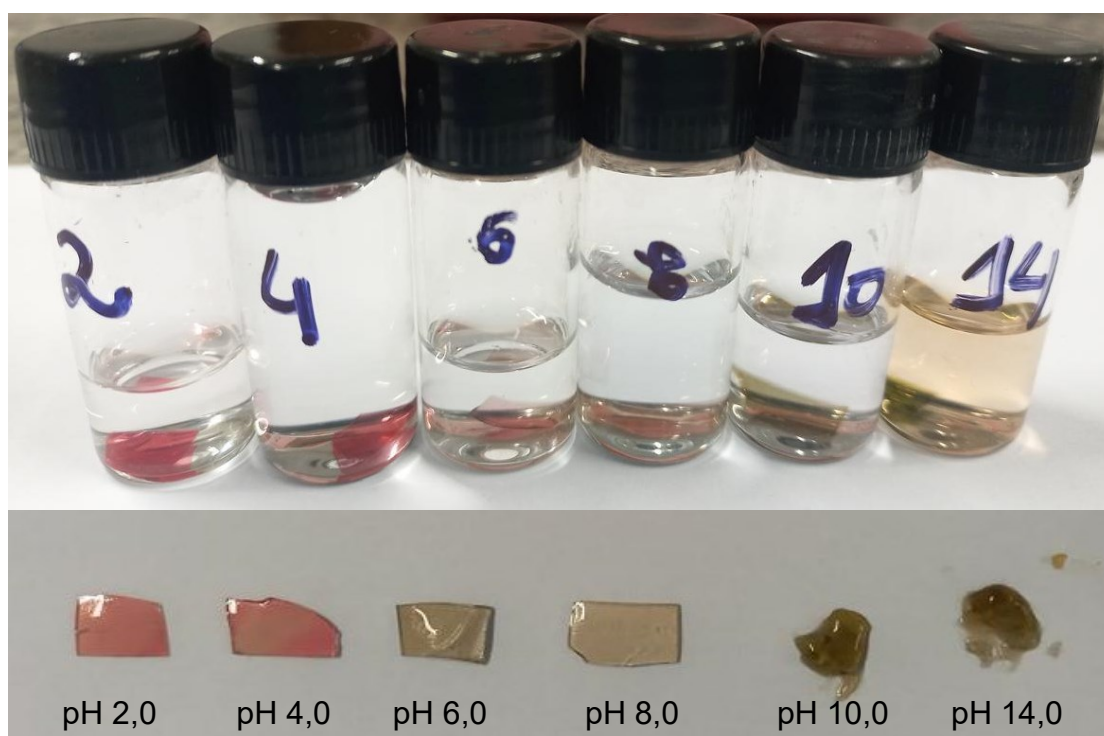
Filmes	Perda de massa (%)			Massa residual em 800 °C
	T (100°C)	T (370°C)	T (800°C)	
A	6,2	32,13	0,00	0,00
B	4,52	42,81	91,62	8,38
C	6,02	83,57	91,92	8,08
D	5,15	81,91	90,74	9,26

Fonte: A autora

5.6 Avaliação de cor

A avaliação de cor dos filmes poliméricos incorporados com antocianinas foi realizada em diferentes valores de pH, variando de 2 a 14, com o objetivo de observar as mudanças cromáticas induzidas pela variação do pH. A análise foi realizada por meio da imersão do filme em soluções com pH 2, 4, 6, 8, 10 e 14 por 30 segundos. Após a retirada do filme na solução, foi possível distinguir a diferença de coloração conforme apresentado na Figura 25.

Figura 25 - Teste de avaliação de coloração em diferentes valores de pH



Fonte: A autora

Na imagem dos filmes imersos em diferentes valores de pH, foi possível observar a transição cromática, confirmando a interação das antocianinas com o meio. A coloração variou de um tom rosa em ambiente ácido (pH 2) para amarelo-esverdeado em meio alcalino (pH 14). No entanto, em pH 10 e 14, os filmes sofreram desintegração, provavelmente devido ao tempo prolongado de exposição às soluções alcalinas, o que comprometeu sua integridade estrutural. Cabe ressaltar que pHs acima de 10 são bastante drásticos e não serão encontrados em alimentos próprios

para o consumo. Essa mudança de cor reforça o potencial das antocianinas como indicadores naturais de pH, destacando sua aplicabilidade em embalagens inteligentes.

5.7 Monitoramento da deterioração de alimentos

A análise realizada teve como objetivo simular uma embalagem de alimento a fim de investigar a deterioração do alimento, utilizando o camarão como modelo para avaliar a eficácia de um filme baseado no estudo proposto por Ezati (2020). Esse estudo visa entender como a interação entre o filme e os compostos liberados durante a deterioração dos alimentos pode fornecer informações úteis para o controle da qualidade e a segurança alimentar na aplicação em uma embalagem inteligente (Ezati;Rhim, 2020, p.7).

O teste de monitoramento do filme com o alimento consistiu em adicionar um camarão de aproximadamente 20 g em uma placa de Petri e fechá-la com outra placa de Petri (tampa), onde o filme foi colocado na parte interior.

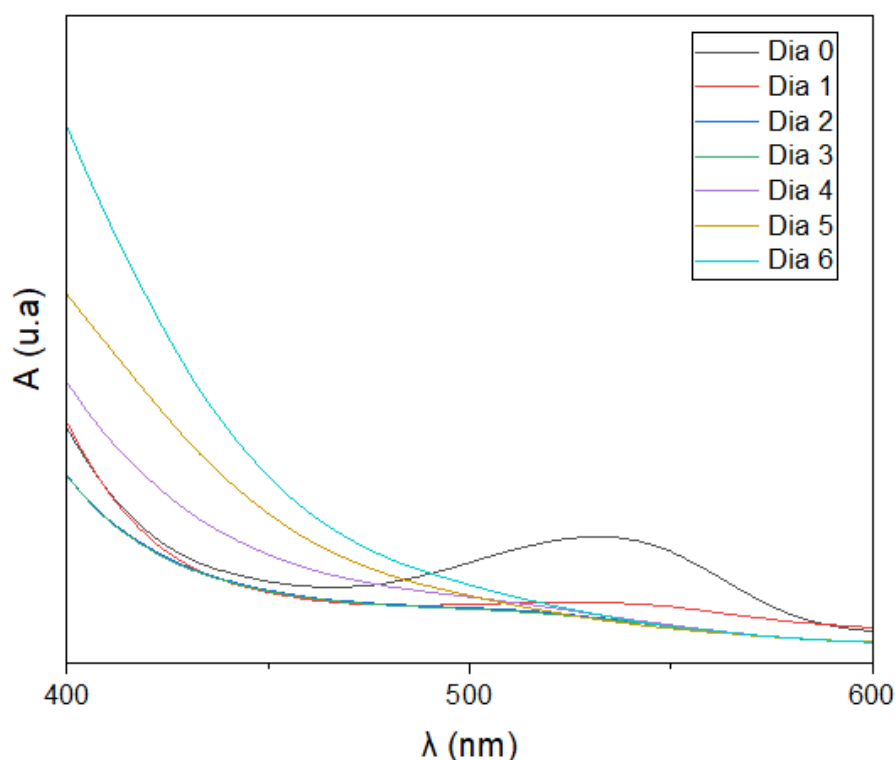
Na avaliação em questão, foi observada uma alteração de cor do filme, que passou de rosa para amarelado ao longo de um período de 6 dias. A escolha do alimento se deve ao fato do camarão sofrer deterioração através de um processo biológico que envolve, entre outros fatores, a liberação de compostos nitrogenados, principalmente a amônia (NH_3), sendo esta uma base fraca, ao se dispersar no ambiente, altera o pH do filme, resultando na alteração de coloração (Ezati;Rhim, 2020, p.7; Musso et al., 2017). As antocianinas, que possuem propriedades conforme visto anteriormente, mudam de tonalidade à medida que entram em contato com substâncias alcalinas, como a amônia, o que explica a mudança observada do filme de rosa para amarelado. Essa reação química é um indicativo da deterioração do camarão e serve como um sinal visual para o monitoramento de sua qualidade (Ezati;Rhim, 2020, p.7).

Figura 26 - Monitoramento da deterioração do camarão por 7 dias

Fonte: A autora

No filme em questão, produzido com antocianinas derivadas das amoras, foi observado que a faixa de coloração das antocianinas, conforme demonstrado na Figura 16, varia do rosa pink para o salmão, depois para um tom amarelado e, por fim, para um verde mais escuro. Na análise de deterioração do camarão, o filme apresentou um comportamento correspondente a essa mudança de cor. No dia 0, que foi o início da análise, o filme mantinha a cor rosa pink. Após dois dias, foi possível observar que o filme clareou, passando para um tom de rosa claro a salmão e, a partir do dia 4, a coloração permaneceu amarelada, tal comportamento que era o esperado devido à faixa de mudança de cor do próprio extrato.

Figura 27 - Espectro de absorbância dos filmes conforme a deterioração do camarão



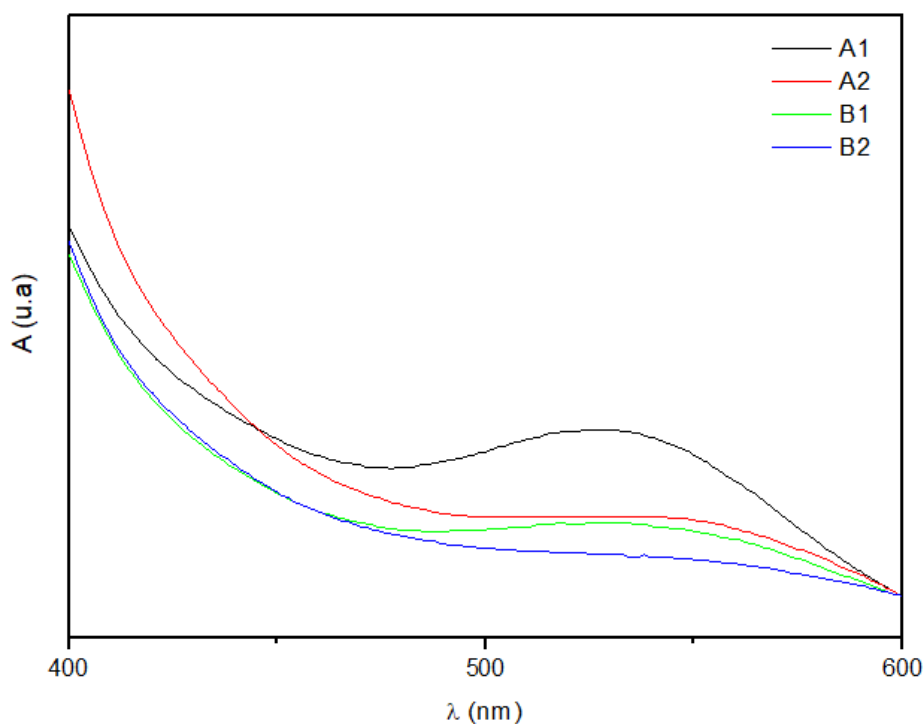
Fonte: A autora.

Ao analisar os espectros de UV-Vis do filme submetido ao teste ao longo de seis dias, observou-se que seu comportamento foi bastante condizente com o espectro apresentado na Figura 18 – Espectro de absorbância do extrato de amoras em diferentes pHs. No espectro do dia 0, a banda da antocianina (aproximadamente 520 nm) é bastante intensa devido ao pH ácido do filme e do extrato, o que está de acordo com o comportamento esperado do extrato. Nos espectros subsequentes, verifica-se uma diminuição dessa banda, não por redução da quantidade de antocianinas, mas porque essas moléculas sofrem mudanças estruturais à medida que o pH se altera, o que impacta diretamente sua coloração. Além disso, à medida que os dias passam, o pH do filme se modifica devido à liberação de amônia pelo camarão, que reage com a antocianina presente no filme.

5.8 Estudo da durabilidade e persistência da cor no filme

Após o desenvolvimento dos filmes incorporados com antocianinas e copigmentados com ácido ascórbico, foi realizado um estudo para avaliar sua estabilidade ao longo do tempo. Para isso, os filmes foram armazenados por dois meses em condições de temperatura ambiente e, posteriormente, suas propriedades ópticas foram analisadas por espectroscopia UV-Vis. Os espectros foram obtidos para quatro amostras: (A1) filme bio-oxidado e incorporado com antocianinas, copigmentado com ácido ascórbico, antes do armazenamento; (A2) filme bio-oxidado e incorporado com antocianinas, copigmentado com ácido ascórbico, após dois meses; (B1) filme não oxidado e incorporado com antocianinas, copigmentado com ácido ascórbico, antes do armazenamento; e (B2) filme não oxidado e incorporado com antocianinas, copigmentado com ácido ascórbico, após dois meses.

Figura 28 - Espectro de UV-Vis dos filmes após 2 meses. (A1) - Amostra de filme bio-oxidado e incorporado com antocianinas, copigmentado com ácido ascórbico, antes do armazenamento. (A2) Amostra de filme bio-oxidado e incorporado com antocianinas, copigmentado com ácido ascórbico, após dois meses. (B1) Amostra de filme não oxidado e incorporado com antocianinas, copigmentado com ácido ascórbico, antes do armazenamento. (B2) Amostra de filme não oxidado e incorporado com antocianinas, copigmentado com ácido ascórbico



Fonte: A autora

Os resultados indicaram que, ao longo do período de armazenamento, ocorreram modificações nos espectros das amostras. As mudanças observadas

sugerem que a durabilidade da coloração das antocianinas foi influenciada pelo processo de oxidação prévia do filme, bem como pelo tempo de armazenamento. Comparando-se os espectros iniciais e finais, observa-se que as amostras biooxidadas (A1 e A2) apresentaram uma variação menor na intensidade da banda de absorbância, indicando uma maior estabilidade da coloração em relação às amostras não oxidadas (B1 e B2). Além disso, a presença do ácido ascórbico como copigmento pode ter contribuído para retardar a degradação das antocianinas ao longo do tempo, preservando parcialmente suas propriedades ópticas. No entanto, mesmo com as amostras armazenadas em um local sem controle de luz ou calor, o efeito combinado do tempo e da oxidação prévia do filme influenciou de maneira distinta cada sistema, sugerindo que a biooxidação pode desempenhar um papel fundamental na estabilidade das antocianinas em matrizes poliméricas.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

No desenvolvimento deste trabalho, realizaram-se processos para a elaboração de uma etiqueta inteligente com aplicação em embalagens de alimentos. As embalagens inteligentes surgiram como uma inovação na indústria alimentícia e, diante do exposto, a busca por uma metodologia eficaz e inovadora. O processo iniciou-se com a extração das amoras pela busca das antocianinas através do procedimento de pôr sonicação o qual resultou em um extrato com teor de antocianinas de 0,42 mg/mL, cuja estabilidade e capacidade de alteração de cor frente a diferentes valores de pH foram confirmadas por análises UV-Vis. O método de extração mostrou-se eficiente e de fácil execução, mantendo a integridade dos pigmentos extraídos.

A produção dos filmes insolúveis em água foi alcançada com sucesso por meio da reticulação da EHEC utilizando glicoxal como agente reticulante. As condições de reação mostraram-se eficientes, garantindo a formação de um filme estável, insolúvel a água e com excelente manuseabilidade. Posteriormente, a bio-oxidação da superfície dos filmes foi realizada utilizando a enzima lacase de *Pleurotus ostreatus* em conjunto com o mediador TEMPO. O tempo ótimo de reação foi determinado em 2 h, com base em análises de tingimento com azul de metileno e espectroscopia UV-Vis, que evidenciaram a formação efetiva de grupos carboxila na superfície do filme — essenciais para a posterior reação de esterificação. A ligação covalente das antocianinas ao filme bio-oxidado foi realizada a 25 °C, e os testes de lavagem com água e etanol comprovaram a eficiência do processo: as antocianinas permaneceram firmemente fixadas ao filme mesmo após sucessivas lavagens, indicando que a ligação ocorreu de forma covalente e não apenas por interação física. Esse resultado representa um avanço importante frente aos métodos tradicionais de incorporação de antocianinas, que dependem apenas de interações fracas e, portanto, apresentam menor estabilidade. Além disso, os estudos de copigmentação utilizando diferentes agentes mostraram-se eficazes para aprimorar a estabilidade das antocianinas incorporadas ao filme. O ácido ascórbico destacou-se como o aditivo mais eficiente, promovendo maior intensidade de cor e aumentando a resistência do material às condições de degradação.

A estabilidade térmica dos filmes foi avaliada por análise termogravimétrica (TGA), demonstrando boa resistência térmica, e a funcionalidade como indicador de

pH foi comprovada pela mudança visível de coloração em diferentes faixas de pH, característica fundamental para a aplicação como embalagem inteligente.

Por fim, a viabilidade prática do filme foi testada utilizando camarões como modelo alimentar. Durante seis dias de armazenamento a 4 °C, o filme incorporado apresentou mudanças graduais de coloração em resposta à deterioração do alimento, demonstrando, de forma clara e visual, sua capacidade de monitorar o frescor dos produtos.

Todo o processo de desenvolvimento foi realizado em condições brandas, sem o uso de reagentes tóxicos ou condições severas de temperatura ou pH, reforçando o caráter sustentável e a compatibilidade do produto para aplicações em contato com alimentos. Assim, o filme polimérico desenvolvido neste estudo apresenta não apenas grande potencial para ser introduzido diretamente no mercado de embalagens inteligentes, como também representa uma inovação no campo de embalagens sustentáveis, reunindo segurança, funcionalidade e apelo ambiental.

REFERÊNCIAS

ARACRI, Elisabetta; VIDAL, Teresa; RAGAUSKAS, Arthur J.. Wet strength development in sisal cellulose fibers by effect of a laccase–TEMPO treatment. **Carbohydrate Polymers**, [S.L.], v. 84, n. 4, p. 1384-1390, abr. 2011. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2011.01.046>.

AGRAWAL, Mukta; SARAF, Shailendra; SARAF, Swarnlata; DUBEY, Sunil K.; PURI, Anu; GUPTA, Umesh; KESHARWANI, Prashant; RAVICHANDIRAN, V.; KUMAR, Pramod; NAIDU, V.G.M.. Stimuli-responsive In situ gelling system for nose-to-brain drug delivery. **Journal Of Controlled Release**, [S.L.], v. 327, p. 235-265, nov. 2020. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jconrel.2020.07.044>.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR 14725:2023 – Produtos químicos – Informações sobre segurança, saúde e meio ambiente. Rio de Janeiro, 2023.

BAI, Rubing; YU, Yuanyuan; WANG, Qiang; YUAN, Jiugang; FAN, Xuerong. Laccase-mediated in situ polymerization of pyrrole for simultaneous coloration and conduction of wool fabric. **Textile Research Journal**, [S.L.], v. 88, n. 1, p. 27-35, 25 out. 2016. SAGE Publications. <http://dx.doi.org/10.1177/0040517516673336>.

BALBINOT-ALFARO, Evellin; CRAVEIRO, Débora Vieira; LIMA, Karina Oliveira; COSTA, Helena Leão Gouveia; LOPES, Danielle Rubim; PRENTICE, Carlos. Intelligent Packaging with pH Indicator Potential. **Food Engineering Reviews**. v. 11, n. 4, p. 235-244, 2 ago. 2019. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s12393-019-09198-9>.

BERGER, J; REIST, M; MAYER, J.M; FELT, O; GURNY, R. Structure and interactions in chitosan hydrogels formed by complexation or aggregation for biomedical applications. **European Journal Of Pharmaceutics And Biopharmaceutics**, [S.L.], v. 57, n. 1, p. 35-52, jan. 2004. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0939-6411\(03\)00160-7](http://dx.doi.org/10.1016/s0939-6411(03)00160-7).

BHATTACHARYA, Amit; RAWLINS, James W.; RAY, Paramita. **Polymer grafting and crosslinking**. Canadá: Wiley, 2009. 343 p.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 91, de 11 de maio de 2001. Brasília, DF, 2001. Disponível em: <[http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/2718376/\(1\)RDC_91_2001_COMP.pdf/fb132262-e0a1-4a05-8ff7-bc-9334c18ad3](http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/2718376/(1)RDC_91_2001_COMP.pdf/fb132262-e0a1-4a05-8ff7-bc-9334c18ad3)>. Acesso em: 06 out. 2022.

CAVALCANTI, Rodrigo N; SANTOS, Diego T; MEIRELES, Maria Angela A. Non-thermal stabilization mechanisms of anthocyanins in model and food systems—An overview. **Food Research International**, v. 44, n. 2, p. 499–509, 1 mar. 2011.

CALEJO, Maria Teresa; KJØNIKSEN, Anna-Lena; PINAZO, Aurora; PÉREZ, Lourdes; CARDOSO, Ana Maria S.; LIMA, Maria C. Pedrosa de; JURADO, Amália S.; SANDE, Sverre Arne; NYSTRÖM, Bo. Thermoresponsive hydrogels with low toxicity from

mixtures of ethyl(hydroxyethyl) cellulose and arginine-based surfactants. **International Journal Of Pharmaceutics**, [S.L.], v. 436, n. 1-2, p. 454-462, out. 2012. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2012.07.018>.

CHEN, Fang; SUN, Yangzhao; ZHAO, Guanghua; LIAO, Xiaojun; HU, Xiaosong; WU, Jihong; WANG, Zhengfu. Optimization of ultrasound-assisted extraction of anthocyanins in red raspberries and identification of anthocyanins in extract using high-performance liquid chromatography–mass spectrometry. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 14, n. 6, p. 767-778, set. 2007. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ultsonch.2006.12.011>.

CHOI, Inyoung; LEE, Jun Y; LACROIX, Monique; HAN, Jaejoo. Intelligent pH indicator film composed of agar/potato starch and anthocyanin extracts from purple sweet potato. **Food Chemistry**. v. 14, n. 6, p. 767-778, set. 2007. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ultsonch.2006.12.011>.

COLOMBI, Samuele; SÁEZ, Isabel; BORRAS, Nuria; ESTRANY, Francesc; PÉREZ-MADRIGAL, Maria M.; GARCÍA-TORRES, José; MORGADO, Jorge; ALEMÁN, Carlos. Glyoxal crosslinking of electro-responsive alginate-based hydrogels: effects on the properties. **Carbohydrate Polymers**, [S.L.], v. 337, p. 122170, ago. 2024. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2024.122170>.

CUTHBERTSON, Amy A.; LINCOLN, Clarissa; MISCALL, Joel; STANLEY, Lisa M.; MAURYA, Anjani K.; ASUNDI, Arun S.; TASSONE, Christopher J.; RORRER, Nicholas A.; BECKHAM, Gregg T.. Characterization of polymer properties and identification of additives in commercially available research plastics. **Green Chemistry**, [S.L.], v. 26, n. 12, p. 7067-7090, 2024. Royal Society of Chemistry (RSC). <http://dx.doi.org/10.1039/d4gc00659c>.

DE-MELLO ROBERT; F; MARTINS, P.C.R; SILVA, A.B.; PINTO, F.S.T.; GIBBERT, L. Tecnologia de Alimentos. **Faculdade Metropolitana de São Paulo**. 2. Ed. Porto Alegre: SAGAH,2018.

DENG, Xudong; ZHANG, XI; HE, Cong; ZHANG, Jie; FU, Qiang; ZHANG, Tuo-Di; WANG, Xue-Ting; WU, Xianglong; YIN, Da-Chuan. Laccase-catalyzed surface oxidation of poly(2-hydroxyethyl methacrylate) contact lens hydrogel using polyvinylamine-graft-TEMPO as mediator. **Colloid And Interface Science Communications**, [S.L.], v. 46, p. 100581, jan. 2022. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.colcom.2021.100581>.

DOUSTDAR, Fatemeh; OLAD, Ali; GHORBANI, Marjan. Effect of glutaraldehyde and calcium chloride as different crosslinking agents on the characteristics of chitosan/cellulose nanocrystals scaffold. **International Journal Of Biological Macromolecules**, [S.L.], v. 208, p. 912-924, maio 2022. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.03.193>.

DONG, Aixue; TEKLU, Kidanu Masho; WANG, Weiming; FAN, Xuerong; WANG, Qiang; ARDANUY, Mònica; DONG, Zhen. Laccase/TEMPO-mediated Graft Hydrophobization of Jute Fibers to Enhance the Mechanical Properties of Jute/PLA

Composites. **Fibers And Polymers**, [S.L.], v. 23, n. 1, p. 243-253, 29 jul. 2021. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s12221-021-0125-8>.

EA, Helmy. Nano-biotechnology breakthrough and food-packing industry- A Review. **Microbial Biosystems**, [S.L.], v. 1, n. 1, p. 50-69, 1 fev. 2016. Egypts Presidential Specialized Council for Education and Scientific Research. <http://dx.doi.org/10.21608/mb.2016.5257>.

EMBRAPA, **A amora-preta ocupa espaço no mercado da indústria e de mesa ao valorizar o seu potencial**. Dez, 2015. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/7893485/a-amora-preta-ocupa-espaco-no-mercado-da-industria--e-de-mesa-ao-valorizar-o-seu-potencial>>. Acesso em: 28/06/2023

ENARU, Bianca; DREȚCANU, Georgiana; POP, Teodora Daria; STĂNILĂ, Andreea; DIACONEASA, Zorița. Anthocyanins: factors affecting their stability and degradation. **Antioxidants**, [S.L.], v. 10, n. 12, p. 1967, 9 dez. 2021. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/antiox10121967>.

FEI, Peng; ZENG, Fansen; ZHENG, Shiyu; CHEN, Qiaoling; HU, Yonghua; CAI, Jie. Acylation of blueberry anthocyanins with maleic acid: improvement of the stability and its application potential in intelligent color indicator packing materials. **Dyes And Pigments**, [S.L.], v. 184, p. 108852, jan. 2021. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.dyepig.2020.108852>.

GOODARZI, Mohsen Moazami; MORADI, Mehran; TAJIK, Hossein; FOROUGH, Mehrdad; EZATI, Parya; KUSWANDI, Bambang. Development of an easy-to-use colorimetric pH label with starch and carrot anthocyanins for milk shelf life assessment. **International Journal Of Biological Macromolecules**, [S.L.], v. 153, p. 240-247, jun. 2020. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.03.014>.

GONSALVES, Arlan de Assis; ARAÓJO, Cleônia Roberta Melo; SOARES, Nivaldo Alves; GOULART, Marília Oliveira Fonseca; ABREU, Fabiane Caxico de. Diferentes estratégias para a reticulação de quitosana. **Química Nova**, [S.L.], v. 34, n. 7, p. 1215-1223, 2011. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0100-40422011000700021>.

HEDIN, Jesper; ISAKSSON, Dan; ANDERSSON, Markus; NYDÉN, Magnus. Bi-layer formation of imidazole-modified ethyl(hydroxyethyl)cellulose at a hydrophobic surface as monitored by QCM-D. **Journal Of Colloid And Interface Science**, [S.L.], v. 336, n. 2, p. 388-392, ago. 2009. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcis.2009.04.033>

HERNÁNDEZ-MUÑOZ, Pilar; VILLALOBOS, Ricardo; CHIRALT, Amparo. Effect of cross-linking using aldehydes on properties of glutenin-rich films. **Food Hydrocolloids**, [S.L.], v. 18, n. 3, p. 403-411, maio 2004. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0268-005x\(03\)00128-0](http://dx.doi.org/10.1016/s0268-005x(03)00128-0).

HUANG, X. Promising strategies and new opportunities for high barrier polymer packaging films. *Progress in Polymer Science*, v. 140, p. 101722, 2023. DOI: 10.1016/j.progpolymsci.2023.101722.

JAUŁOVEC, Darja; VOGRINČIČ, Robert; KOKOL, Vanja. Introduction of aldehyde vs. carboxylic groups to cellulose nanofibers using laccase/TEMPO mediated oxidation. **Carbohydrate Polymers**, [S.L.], v. 116, p. 74-85, fev. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.03.014>.

JORGE, Neuza. **Embalagens para alimentos**. São Paulo: Unesp, 2013. 194 p.

JORDANOV, I.; STEVENS, D. L.; TARBUK, A.; MAGOVAC, E.; BISCHOF, S.; GRUNLAN, J. C. Enzymatic Modification of Polyamide for Improving the Conductivity of Water-Based Multilayer Nanocoatings. *ACS Omega*, v. 4, p. 12028–12035, 2019. DOI: 10.1021/acsomega.9b01052ACS

JIANG, Guangyang; HOU, Xiaoyan; ZENG, Xuedan; ZHANG, Can; WU, Hejun; SHEN, Guanghui; LI, Shanshan; LUO, Qingying; LI, Meiliang; LIU, Xingyan. Preparation and characterization of indicator films from carboxymethyl-cellulose/starch and purple sweet potato (*Ipomoea batatas* (L.) lam) anthocyanins for monitoring fish freshness. **International Journal Of Biological Macromolecules**, [S.L.], v. 143, p. 359-372, jan. 2020. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.12.024>.

KORICA, Matea; PERŁIN, Zdenka; ZEMLJIČ, Lidija Fras; MIHAJLOVSKI, Katarina; DOJČINOVIĆ, Biljana; TRIFUNOVIĆ, Snežana; VESEL, Alenka; NIKOLIĆ, Tanja; KOSTIĆ, Mirjana M.. Chitosan Nanoparticles Functionalized Viscose Fabrics as Potentially Durable Antibacterial Medical Textiles. **Materials**, [S.L.], v. 14, n. 13, p. 3762, 5 jul. 2021. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/ma14133762>.

KARAASLAN-AYHAN, Nagihan; YAMAN, Mehmet. Determination of anthocyanins and anthocyanidins in the wild grape (*Vitis sylvestris* Gmelin) by high-performance liquid chromatography-diode array detection (HPLC-DAD). **Instrumentation Science & Technology**, [S.L.], v. 50, n. 1, p. 57-68, 27 jul. 2021. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/10739149.2021.1954532>.

KALPANA, S.; PRIYADARSHINI, S.R.; LEENA, M. Maria; MOSES, J.A.; ANANDHARAMAKRISHNAN, C. Intelligent packaging: trends and applications in food systems. **Trends In Food Science & Technology**, [S.L.], v. 93, p. 145-157, nov. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tifs.2019.09.008>.

KHOO, Hock Eng; AZLAN, Azrina; TANG, Sou Teng; LIM, See Meng. Anthocyanidins and anthocyanins: colored pigments as food, pharmaceutical ingredients, and the potential health benefits. **Food & Nutrition Research**, [S.L.], v. 61, n. 1, p. 1361779, jan. 2017. SNF Swedish Nutrition Foundation. <http://dx.doi.org/10.1080/16546628.2017.1361779>.

KHARAGHANI, Davood; DUTTA, Debarun; HO, Kitty K. K.; ZHANG, Ke-Qin; KAI, Wei; REN, Xuehong; WILLCOX, Mark D. P.; KIM, Ick Soo. Active loading graphite/hydroxyapatite into the stable hydroxyethyl cellulose scaffold nanofibers for artificial cornea application. **Cellulose**, [S.L.], v. 27, n. 6, p. 3319-3334, 25 jan. 2020.

Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s10570-020-02999-w>.

LEE, Jungmin; RENNAKER, Christopher; WROLSTAD, Ronald E. Correlation of two anthocyanin quantification methods: hplc and spectrophotometric methods. **Food Chemistry**, v. 110, n. 3, p. 782-786, out. 2008. Elsevier BV.

LUO, Xiu'er; WANG, Ruoyong; WANG, Jinhua; LI, Ying; LUO, Huainan; CHEN, Shi; ZENG, Xin'an; HAN, Zhong. Acylation of Anthocyanins and Their Applications in the Food Industry: mechanisms and recent research advances. **Foods**, v. 11, n. 14, p. 2166, 21 jul. 2022. MDPI AG.

LUCHESI, Cláudia Leites; SPEROTTO, Natalia; SPADA, Jordana Corralo; TESSARO, Isabel Cristina. Effect of blueberry agro-industrial waste addition to corn starch-based films for the production of a pH-indicator film. **International Journal Of Biological Macromolecules**, [S.L.], v. 104, p. 11-18, nov. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.05.149>.

LOPEZ-CORONA, Alejandra Vanessa; VALENCIA-ESPINOSA, Illeen; GONZÁLEZ-SÁNCHEZ, Fabio Antonio; SÁNCHEZ-LÓPEZ, Angélica Lizeth; GARCIA-AMEZQUITA, Luis Eduardo; GARCIA-VARELA, Rebeca. Antioxidant, Anti-Inflammatory and Cytotoxic Activity of Phenolic Compound Family Extracted from Raspberries (*Rubus idaeus*): a general review. **Antioxidants**, [S.L.], v. 11, n. 6, p. 1192, 17 jun. 2022. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/antiox11061192>.

LIU, Liming; WU, Weina; ZHENG, Luman; YU, Jiahao; SUN, Peilong; SHAO, Ping. Intelligent packaging films incorporated with anthocyanins-loaded ovalbumin-carboxymethyl cellulose nanocomplexes for food freshness monitoring. **Food Chemistry**, [S.L.], v. 387, p. 132908, set. 2022. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.132908>.

LYYTIKÄINEN, Johanna; MORITS, Maria; ÖSTERBERG, Monika; HEISKANEN, Isto; BACKFOLK, Kaj. Skin and bubble formation in films made of methyl nanocellulose, hydrophobically modified ethyl(hydroxyethyl)cellulose and microfibrillated cellulose. **Cellulose**, [S.L.], v. 28, n. 2, p. 787-797, 13 nov. 2020. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s10570-020-03557-0>.

MARATHE, S. J. et al. Esterification of anthocyanins isolated from floral waste: Characterization of the esters and their application in various food systems. **Food Bioscience**, v. 40, p. 100852, abr. 2021.

MORAIS, Dayane de Castro *et al.* **Atualizações e debates sobre segurança alimentar e nutricional**. Viçosa: Ufv, 2020. 865 p.

NANDI, Leandro G; NICOLETI, Celso R.; BALLETTINI, Ismael C.; MACHADO, Vanderlei G. Optical Chemosensor for the Detection of Cyanide in Water Based On Ethyl(hydroxyethyl)cellulose Functionalized with Brooker's Merocyanine. **Analytical Chemistry**. 2014. 4653 – 4656. <http://dx.doi.org/10.1021/ac501233x>

NASUTION, Halimatuddahlia; HARAHA, Hamidah; DALIMUNTHE, Nisaul F.; GINTING, M. Hendra S.; JAAFAR, Mariatti; TAN, Orlando O. H.; ARUAN, Hotmauli K.; HERFANANDA, Alief L.. Hydrogel and Effects of Crosslinking Agent on Cellulose-Based Hydrogels: a review. **Gels**, [S.L.], v. 8, n. 9, p. 568, 7 set. 2022. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/gels8090568>.

NEMANI, Srinivasa Kartik; ANNAVARAPU, Rama Kishore; MOHAMMADIAN, Behrouz; RAIYAN, Asif; HEIL, Jamie; HAQUE, Md. Ashraful; ABDELAAL, Ahmed; SOJOUDI, Hossein. Surface Modification of Polymers: methods and applications. **Advanced Materials Interfaces**, [S.L.], v. 5, n. 24, p. 300-327, 14 nov. 2018. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/admi.201801247>.

OLADZADABBASABADI, Nazila; NAFCHI, Abdorreza Mohammadi; GHASEMLOU, Mehran; ARIFFIN, Fazilah; SINGH, Zora; AL-HASSAN, A.A. Natural anthocyanins: sources, extraction, characterization, and suitability for smart packaging. **Food Packaging And Shelf Life**, [S.L.], v. 33, p. 100872, set. 2022. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fpsl.2022.100872>.

PERALTA, J. et al. Aqueous hibiscus extract as a potential natural pH indicator incorporated in natural polymeric films. **Food Packaging and Shelf Life**, v. 19, p. 47–55, mar. 2019.

QIAN, Bing-Jun; LIU, Jian-Hua; ZHAO, Shu-Juan; CAI, Jian-Xiong; JING, Pu. The effects of gallic/ferulic/cafeic acids on colour intensification and anthocyanin stability. **Food Chemistry**, [S.L.], v. 228, p. 526-532, ago. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.01.120>

ROUTRAY, Winny; ORSAT, Valerie. Blueberries and Their Anthocyanins: factors affecting biosynthesis and properties. **Comprehensive Reviews In Food Science And Food Safety**, [S.L.], v. 10, n. 6, p. 303-320, 25 out. 2011. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1541-4337.2011.00164.x>.

TIRTASHI, Fahimeh Ebrahimi *et al.* Cellulose/chitosan pH-responsive indicator incorporated with carrot anthocyanins for intelligent food packaging. **Elsevier**. Indonesia, p. 920-926. jun. 2019.

SARANTOPOULOS, Claire; COFCEWICZ, Luísa Sartori. Embalagens Inteligentes para produtos perecíveis. **Boletim de Tecnologia e Desenvolvimento de Embalagens**, Campinas, v. 27, n. 3, p. 1-9, set. 2015. Disponível em: http://www.ital.agricultura.sp.gov.br/arquivos/cetea/informativo/v27n3/artigos/v27n3_artigo2.pdf. Acesso em: 20 jul. 2023.

SILVA, Liliana Primo da; PEREIRA, Eliana; PIRES, Tânia C.s.P.; ALVES, Maria José; PEREIRA, Olívia R.; BARROS, Lillian; FERREIRA, Isabel C.F.R.. Rubus ulmifolius Schott fruits: a detailed study of its nutritional, chemical and bioactive properties. **Food Research International**, [S.L.], v. 119, p. 34-43, maio 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2019.01.052>

SILVA, Liliana Primo da; PEREIRA, Eliana; PRIETO, Miguel A.; SIMAL-GANDARA, Jesus; PIRES, Tânia C.s.P.; ALVES, Maria José; CALHELHA, Ricardo; BARROS,

Lillian; FERREIRA, Isabel C.F.R.. Rubus ulmifolius Schott as a Novel Source of Food Colorant: extraction optimization of coloring pigments and incorporation in a bakery product. **Molecules**, [S.L.], v. 24, n. 11, p. 2181, 10 jun. 2019. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/molecules24112181>.

SINGH, Mamatha Chandra; PRICE, William E.; KELSO, Celine; CHARLTON, Karen; PROBST, Yasmine. Impact of molar absorbance on anthocyanin content of the foods. **Food Chemistry**, v. 386, p. 132855, ago. 2022. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.132855>.

SINGH, Mamatha Chandra; PROBST, Yasmine; PRICE, William E.; KELSO, Celine. Relative comparisons of extraction methods and solvent composition for Australian blueberry anthocyanins. **Journal Of Food Composition And Analysis**, [S.L.], v. 105, p. 104232, jan. 2022. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jfca.2021.104232>.

SWAMY, Azekah Yashna; PRASAD, Shelvin; PAN, Xun; ANDERSSON, Mats R.; GEDEFW, Desta. Glutaraldehyde and Glyoxal Crosslinked Polyethylenimine for Copper Ion Adsorption from Water. **Chemistryselect**, [S.L.], v. 7, n. 9, p. 1-9, mar. 2022. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/slct.202104318>.

WANG, Bo Chu; HE, Rui; LI, Zhi Min. The Stability and Antioxidant Activity of Anthocyanins from Blueberry. **Food Technology Biotechnology**. V. 48, p. 42-49. 2010.

WANG, Shuo; XIA, Peng; WANG, Shaozhen; LIANG, Jin; SUN, Yue; YUE, Pengxiang; GAO, Xueling. Packaging films formulated with gelatin and anthocyanins nanocomplexes: physical properties, antioxidant activity and its application for olive oil protection. **Food Hydrocolloids**, [S.L.], v. 96, p. 617-624, nov. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodhyd.2019.06.004>.

YANG, Wenjuan; GUO Yuxi; MENG, Liu; CHEN, Xuefeng; XIAO, Xuvang; WANG, Shengnan; GONG Pin; MA, Yangmin; CHEN, Fuxin. Structure and function of blueberry anthocyanins: A review of recent advances. **Functional Foods**. 2022.

YONG, Huimin; LIU, Jun. Recent advances in the preparation, physical and functional properties, and applications of anthocyanins-based active and intelligent packaging films. **Food Packaging And Shelf Life**, [S.L.], v. 26, p. 100550, dez. 2020. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fpsl.2020.100550>.

ZHANG, Junjun; ZOU, Xiaobo; ZHAI, Xiaodong; HUANG, Xiaowei; JIANG, Caiping; HOLMES, Mel. Preparation of an intelligent pH film based on biodegradable polymers and roselle anthocyanins for monitoring pork freshness. **Food Chemistry**, [S.L.], v. 272, p. 306-312, jan. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.08.041>.

ZHANG, Yun; ZHU, Peter C.; EDGREN, David. Crosslinking reaction of poly(vinyl alcohol) with glyoxal. **Journal Of Polymer Research**, [S.L.], v. 17, n. 5, p. 725-730, 2 dez. 2009. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s10965-009-9362-z>.

ZHANG, Mingyue; BIESOLD, Gill M.; CHOI, Woosung; YU, Jiwoo; DENG, Yulin; SILVESTRE, Clara; LIN, Zhiqun. Recent advances in polymers and polymer composites for food packaging. **Materials Today**, [S.L.], v. 53, p. 134-161, mar. 2022. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mattod.2022.01.022>.