



**Universidade do Minho**  
Escola de Engenharia

Kseniia Shevchenko

**Revestimento Funcional para Deteção da  
Deterioração de Alimentos**

Dissertação de Mestrado em Tecnologia e  
Ciência Alimentar

Trabalho realizado sob a orientação de

**Professor Doutor José António Couto Teixeira**

29 de dezembro 2021



**Universidade do Minho**  
Escola de Engenharia

Kseniia Shevchenko

## **Revestimento Funcional para Deteção da Deterioração de Alimentos**

Dissertação de Mestrado em Tecnologia e  
Ciência Alimentar

Trabalho realizado sob a orientação de

**Professor Doutor José António Couto Teixeira**  
**Mestre Verónica de Carvalho Roque Bouça**

29 de dezembro 2021

## **DIREITOS DE AUTOR E CONDIÇÕES DE UTILIZAÇÃO DO TRABALHO POR TERCEIROS**

Este é um trabalho académico que pode ser utilizado por terceiros desde que respeitadas as regras e boas práticas internacionalmente aceites, no que concerne aos direitos de autor e direitos conexos.

Assim, o presente trabalho pode ser utilizado nos termos previstos na licença abaixo indicada. Caso o utilizador necessite de permissão para poder fazer um uso do trabalho em condições não previstas no licenciamento indicado, deverá contactar o autor, através do RepositóriUM da Universidade do Minho.



**Atribuição-NãoComercial-SemDerivações**  
**CC BY-NC-ND**

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>

## Agradecimentos

Em primeiro lugar, gostaria de agradecer a toda a equipa do CeNTI pelo tema desafiante que me foi proposto e pelo ambiente acolhedor em que estive inserida neste último ano. Ainda queria agradecer a oportunidade de conhecer novas técnicas e equipamentos.

À Verónica Bouça que me acompanhou durante este ano, pela partilha do conhecimento, pela demonstração do interesse, pelo todo o apoio que me foi dado e pela disponibilidade de tirar qualquer dúvida e de me ajudar durante a realização deste trabalho.

À Sara Fernandes pela orientação, disponibilidade, por todo o tempo dispensado no presente trabalho e também pela simpatia.

Ao Doutor José António Couto Teixeira por estar sempre disponível e atento a qualquer necessidade ao longo do desenvolvimento do trabalho científico.

À minha família que me deu apoio ao longo deste percurso e que me motivou sempre a deixar vir o melhor de mim ao de cima.

Ao Marco por estar presente na minha vida nos bons e nos maus momentos.

A todos os meus amigos e colegas estagiário pela ajuda e apoio demonstrado e também pela boa disposição.

Um enorme obrigada por toda a força e motivação.

## **DECLARAÇÃO DE INTEGRIDADE**

Declaro ter atuado com integridade na elaboração do presente trabalho acadêmico e confirmo que não recorri à prática de plágio nem a qualquer forma de utilização indevida ou falsificação de informações ou resultados em nenhuma das etapas conducente à sua elaboração.

Mais declaro que conheço e que respeitei o Código de Conduta Ética da Universidade do Minho.

## Resumo

É de conhecimento geral que na nossa sociedade há perdas significativas na cadeia de abastecimento agrícola. Muitas das perdas são inevitáveis, enquanto outras como, por exemplo, perdas alimentares associadas às etapas de armazenamento, podem ser evitadas ou reduzidas significativamente. A redução do valor das perdas alimentares para metade é uma das metas para a União Europeia até 2030.

Uma das formas de diminuir o desperdício alimentar é a utilização de embalagens ativas ou inteligentes. Enquanto a embalagem ativa interage com produto, alterando as suas condições com o objetivo de reduzir a deterioração, mantendo a qualidade e a segurança, a embalagem inteligente é capazes de fornecer ao consumidor informações em tempo real sobre a qualidade dos alimentos embalados. Estas podem incluir indicadores de tempo e temperatura ou indicadores de qualidade.

O desenvolvimento de um revestimento funcional sensível à mudança de pH na atmosfera da embalagem é uma das formas de diminuir o desperdício alimentar, ajudando o consumidor de uma forma visual muito simples a consumir o alimento antes que este fique impróprio para o consumo.

O objetivo principal da presente dissertação foi o desenvolvimento de um revestimento funcional de base biopolimérica aditivado com um indicador colorimétrico sensível às alterações de pH.

Depois de testar várias formulações e estratégias para o desenvolvimento do revestimento funcional foram escolhidas as melhores formulações com base na caracterização físico-química dos revestimentos e esses revestimentos foram testados ao nível da sensibilidade da resposta à mudança de pH da atmosfera da embalagem.

Os revestimentos funcionais desenvolvidos mostraram-se eficientes tanto durante os testes *in vitro* como durante os testes *in situ*, o que indica que os revestimentos funcionais desenvolvidos podem ser utilizados nas embalagens alimentares para a deteção da deterioração dos alimentos perecíveis.

**Palavras-chave:** embalagem inteligente, revestimento funcional, pH, deterioração de alimentos.

## Abstract

It is common knowledge that in our society there are significant losses in the agricultural supply chain. Many of the losses are unavoidable, while others, such as food losses associated with storage steps, can be avoided or significantly reduced. Halving the value of food losses is one of the targets for the European Union by 2030.

One of the ways to decrease food waste is the use of active or smart packaging. While active packaging interacts with the product, changing its conditions with the aim of reducing spoilage while maintaining quality and safety, smart packaging is able to provide the consumer with real-time information about the quality of the packaged food. These can include time and temperature indicators or quality indicators.

Developing a functional coating sensitive to pH change in the packaging atmosphere is one way to decrease food waste by helping the consumer in a very simple visual way to consume the food before it becomes unfit for consumption.

The main objective of this dissertation was to develop a bio-based functional coating with a colorimetric indicator sensitive to pH changes.

After testing various formulations and strategies for the development of the functional coating, the best formulations were chosen based on the physicochemical characterization of the coatings and these coatings were tested for sensitivity of response to pH change in the packaging atmosphere.

The developed functional coatings were shown to be efficient during both in vitro and in situ tests, indicating that the developed functional coatings can be used in food packaging for the detection of perishable food spoilage.

**Keywords:** smart packaging, functional coating, pH, food spoilage.

## Índice

Agradecimentos .....	iv
Resumo.....	vi
Abstract .....	vii
Lista de Abreviaturas, Acrónimos e Símbolos .....	x
Lista de Figuras.....	xii
Lista de Tabelas .....	xv
1. Introdução .....	1
1.1. Enquadramento.....	1
1.1. Apresentação da Empresa.....	2
1.2. Objetivos .....	2
2. Estado da Arte .....	4
2.1. Embalagens Alimentares.....	4
2.1.1. Embalagens Ativas.....	4
2.1.2. Embalagem Inteligente.....	5
2.2. Alteração de pH na Deterioração de Alimentos .....	9
2.2.1. Alteração de pH na Deterioração de Carnes e Peixes .....	9
2.3. Polímeros Utilizados em Embalagens Alimentares.....	10
2.3.1. Biopolímeros.....	11
2.4. Colorimetria.....	17
2.4.1. CIELab .....	18
2.4.2. CIEDE2000.....	19
3. Materiais e Métodos .....	20
3.1. Materiais.....	20
3.2. Métodos .....	20
3.2.1. Preparação de Revestimentos Funcionais.....	20
3.2.2. Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier com Reflectância Total Atenuada (FTIR-ATR) .....	28
3.2.3. Solubilidade de Água e Índice de Dilatação .....	29
3.2.4. Ensaio Mecânico .....	29
3.2.5. Medição de Ângulos de Contacto e da Energia Livre de Superfície .	30
3.2.6. Microscopia Ótica .....	33
3.2.7. Espectrofotometria UV-Vis.....	34
4. Apresentação de Resultados e Discussão .....	39
4.1. Condições de Revestimentos Seleccionados .....	39
4.2. Estudo da Solubilidade .....	43



4.3. Estudo das Propriedades Físico-Químicas do Revestimento .....	44
4.3.1. FTIR-ATR.....	44
4.3.2. Ensaio Mecânico por Flexão .....	46
4.4. Estudo da Eficiência de Resposta do Revestimento à Mudança de pH.....	50
4.4.1. Estudo da Eficiência de Resposta do Revestimento em Meio Líquido.	50
4.4.2. Estudo da Resposta dos Revestimentos Funcionais em Meio Atmosférico .....	52
4.4.3. Estudo da Resposta do Revestimento Funcional <i>In Situ</i> .....	60
5. Conclusão e Perspetivas Futuras .....	64
Referências.....	66

## Lista de Abreviaturas, Acrónimos e Símbolos

$R_T$  – Componente rotacional;

$S_G$  – Compensação de diferença da cromaticidade;

$S_H$  – Compensação de diferença da tonalidade.

$S_L$  – Compensação de diferença da claridade;

$k_L; k_C; k_H$  – Fatores experimentais de condições experimentais

$\gamma_s^d$  – Componente dispersiva

$\gamma_s^p$  – Componente polar

$\Delta H'$  – Diferença da tonalidade;

$\Delta C'$  – Diferença da cromaticidade;

$\Delta L'$  – Diferença da claridade;

AA – Ácido acético

CeNTI – Centro de Nanotecnologia e Materiais Técnicos, Funcionais e Inteligentes

CHT – Quitosano

CIE – Comissão Internacional de Iluminação

CMC – Carboximetilcelulose

$da^*$  – Variação vermelho-verde no eixo  $a^*$ ;

$db^*$  – Variação amarelo-azul no eixo  $b^*$

$dL^*$  – Variação de luminosidade no eixo  $L^*$ ;

EM – Ensaio mecânico

EU – União Europeia

FAO – Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura

FTIR-ATR – Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier com refletância total atenuada

HDPE – Polietileno de alta densidade

ID – Índice de dilatação

LDPE – Polietileno de baixa densidade

PET – Politereftalato de etileno

PHA – Poli- hidroxialcanoato

PLA – Ácido poliláctico

PS – Poliestireno

PTFE – Politetrafluoretileno

RFID – Etiquetas de identificação por radiofrequência

Rpm – Rotações por minuto

SA – Solubilidade em água

SFE – Energia de superfície livre

VM – Vermelho de metila

## Lista de Figuras

Figura 1:Diferentes tipos de embalagens inteligentes existentes no mercado. (Adotado de Müller & Schmid, 2019).....	6
Figura 2: Extratos de antocianinas provenientes de diferentes fontes: a) extrato de feijão preto; b) extrato proveniente de batata doce roxa; c) extrato proveniente de couve roxa; d) extrato proveniente de mirtilo.....	8
Figura 3: Representação da mudança da cor do vermelho de metila em função do pH do meio. (Adoptado de Benedict et al., 2006).....	8
Figura 4: Resposta dos indicadores de pH à base de CHT e antocianinas a diferentes valores de pH: (a) pH=2,0; (b) pH=4,0; (c) pH=5,6; (d) pH=7,0; (e) pH=8,0; (f) pH=13,0. (Adoptado de Yoshida et al., 2014).....	16
Figura 5: Representação gráfica dos espaços CIE L*a*b* (a) e CIE L*C*h). (Adaptado de Stancil & Jordan, 1985).....	18
Figura 6: Aplicador de filmes Elcometer.....	22
Figura 7: Diferentes abordagens utilizadas para melhorar a adesão entre o revestimento e o substrato.....	23
Figura 8: Apresentação esquemática dos revestimentos de uma e de duas camadas no substrato polimérico com pré-tratamento com plasma.....	27
Figura 9: Espectrofotômetro Perkin Elmer Spectrum 100 Series da Perkin Elmer.....	28
Figura 10: Imagem das garras do equipamento Shimadzu Autograph AGX-V 50kN com o substrato com revestimento funcional para realização dos ensaios mecânicos por flexão.....	30
Figura 11: Apresentação esquemática da medição de ângulo de contacto com a técnica Sessile Drop, onde $\gamma_{sl}$ corresponde à tensão na interface sólido-líquido; $\gamma_{lv}$ corresponde à tensão na interface líquido-vapor e $\gamma_{sv}$ corresponde à tensão na interface sólido-vapor. (Adaptado de Kwok & Neumann, 1999).....	31
Figura 12: Processo de determinação de ângulo de contacto entre o substrato e o líquido (1).....	32
Figura 13: Processo de determinação de ângulo de contacto entre o substrato e o líquido (2).....	32
Figura 14: Microscópio Ótico de luz transmitida Leica DM 2500 M.....	33

Figura 15: Representação esquemática do ensaio de reversibilidade da cor na ausência da atmosfera de amónia.....	37
Figura 16: Representação de dois revestimentos promissores à base de CMC.....	40
Figura 17: Medição de ângulo de contacto da água para as amostras pré- tratadas com o plasma a 40% e com o plasma a 50% e e da amostra controlo (sem pré-tratamento).....	41
Figura 18: Energia de superfície das amostras tratadas com o plasma e da amostra controlo.....	42
Figura 19: Valores de solubilidade em água para revestimentos promissores.....	43
Figura 20: Representação gráfica FTIR do substrato revestido com CHT e do substrato revestido com CHT+VM.....	45
Figura 21: Medição dos ângulos de contacto das amostras submetidas ao ensaio mecânico por flexão.....	47
Figura 22: Amostra de revestimento de CHT de uma só camada com EM.....	48
Figura 23: Amostra de revestimento de CHT de uma só camada sem EM.....	48
Figura 24: Amostra de revestimento de CHT de duas camadas com EM.....	49
Figura 25: Amostra de revestimento de CHT de duas camadas sem EM.....	49
Figura 26: Mudança de cor do revestimento funcional em função da mudança de pH.....	51
Figura 27: Mudança visual da cor das soluções tampão durante o teste dos revestimentos funcional em soluções tampão com diferentes valores de pH.....	51
Figura 28: Avaliação da migração do VM dos revestimentos funcional para as soluções tampão.....	52
Figura 29: Resposta do revestimento funcional de uma camada a diferentes concentrações de amónia ao longo do tempo.....	54
Figura 30: Foto das amostras de mudança de cor do revestimento funcional de uma camada ao longo do tempo e em função da concentração da amónia a qual o revestimento foi exposto.....	54
Figura 31: Resposta do revestimento funcional de duas camadas a diferentes concentrações de amónia ao longo do tempo.....	55
Figura 32: Foto das amostras de mudança de cor do revestimento funcional de duas camadas ao longo do tempo e em função da concentração da amónia a qual o revestimento foi exposto.....	56

Figura 33: Mudança da cor dos revestimentos de uma e de duas camadas na ausência de amónia.....	57
Figura 34: Mudança de cor dos revestimentos funcionais na ausência de amónia.....	58
Figura 35: Mudança de cor total dos revestimentos funcionais desenvolvidos depois de serem submetidos a presença de amónia e a seguir a presença de ácido acético.....	59
Figura 36: Foto das amostras dos revestimentos de uma e de duas camadas antes de serem submetidos ao ensaio de reversibilidade de cor na presença de AA e depois.....	59
Figura 37: Resposta do revestimento funcional de uma camada à deterioração do alimento a 22 °C.....	61
Figura 38: Resposta do revestimento funcional de uma camada à deterioração do alimento a 4 °C.....	61
Figura 39: Resposta do revestimento funcional de uma camada à deterioração do camarão a 4 °C.....	62
Figura 40: Resposta do revestimento funcional de duas camadas à deterioração do camarão a 4 °C.....	62
Figura 41: Fotos relativas à mudança de cor dos revestimentos funcionais de uma e de duas camadas durante a deterioração do camarão a 4 °C.....	63

## Lista de Tabelas

Tabela 1: Revestimentos preliminares de base CHT em substrato polimérico .....	21
Tabela 2: Revestimento à base de CMC sem utilização de surfactantes.....	22
Tabela 3: Revestimentos testados de base CHT com aditivos (surfactantes e glicerol) em diferentes percentagens. ....	23
Tabela 4: Revestimentos testados de base CMC com utilização de aditivos (surfactantes e glicerol) em diferentes percentagens. ....	24
Tabela 5: Condições testadas durante o tratamento do substrato com o plasma. ....	25
Tabela 6: Condições experimentais testadas no ensaio de termofixação para quatro revestimentos diferentes .....	27
Tabela 7: Soluções tampão de citrato de sódio e ácido cítrico preparadas para a avaliação da mudança de cor do VM em resposta à mudança de pH do meio.....	35
Tabela 8: Resumo do ensaio de migração do vermelho de metila nas soluções tampão.....	36
Tabela 9: Formulações promissoras obtidas através do melhoramento da formulação do biopolímero. ....	40

# 1. Introdução

Neste primeiro capítulo vai ser feito um enquadramento do tema da dissertação onde serão abordados os motivos pelos quais o desenvolvimento deste trabalho é importante e de que forma poderá ajudar no atual panorama do desenvolvimento da cadeia alimentar. Para além disso será feito um levantamento do estado da arte para uma melhor compreensão do trabalho que já foi desenvolvido nesta área.

## 1.1. Enquadramento

Há muito que se reconhece que existem perdas significativas na cadeia de abastecimento agrícola, tanto durante o cultivo como durante a colheita, no processamento e na entrega de alimentos aos consumidores. Muitas das perdas em etapas iniciais são inevitáveis devido a vários fatores, tais como o clima, ataques de insetos ou fungos, deterioração e danos por roedores. Durante as etapas posteriores também existem várias perdas dificilmente controladas ou evitadas, assim como as perdas durante o processamento e transporte. Em contrapartida, as perdas alimentares associadas às etapas de armazenamento tanto nas superfícies comerciais, como em casa dos consumidores, podem ser evitadas ou reduzidas substancialmente (Butler, 2012).

Apesar de várias estimativas de desperdício alimentar feitas, estas são normalmente baseadas em dados estatísticos e modelos de disponibilidade alimentar, que, normalmente, apresentam valores estimados e não reais, pelo que há uma falta de compreensão clara sobre a quantidade real de alimentos desperdiçados pelos consumidores dentro e fora de casa (Dou & Toth, 2020).

Anualmente, cerca de 20 % de todos os alimentos produzidos na União Europeia (UE) destinados ao consumo humano são perdidos ao longo da cadeia de abastecimento da União Europeia (UE). Cerca de 40 milhões de toneladas são desperdiçadas anualmente por parte do consumidor final (Canali *et al.*, 2017). Além disso, a Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura, 2019, estima que a cada ano cerca de um terço, o que corresponde a 1,3 mil milhões de toneladas, de todos os alimentos produzidos para consumo humano no mundo são desperdiçados. Estabelecer medidas adequadas para atingir reduções desse valor, contribuirá de forma positiva para o objetivo de reduzir o desperdício de alimentos em toda a Europa em 30 % até 2025 (European Commission, 2017) e em 50 % até 2030 (Canali *et al.*, 2017). Desta forma, o desperdício de alimentos é um dos problemas de resolução mais urgentes da atualidade.



De acordo com a FAO, 2019, reduzir o desperdício de alimentos é uma forma significativa de reduzir os custos de produção, aumentar a eficiência do sistema alimentar, melhorar a segurança alimentar e nutricional e contribuir para um sistema alimentar mais ambientalmente sustentável (FAO, 2019). Como tal, a redução do desperdício de alimentos é um objetivo sinérgico que irá ter impacto positivo sobre várias áreas, incluindo a economia e a redução de impactos ambientais. (Aschemann-Witzel *et al.*, 2020).

## 1.1. Apresentação da Empresa

O CeNTI - Centro de Nanotecnologia e Materiais Técnicos, Funcionais e Inteligentes - é um instituto de investigação e desenvolvimento tecnológico privado sem fins lucrativos, localizado em Vila Nova de Famalicão, que foi fundado em 2006 como resultado de uma parceria entre várias entidades de relevância nacional e internacional, mais precisamente de três Universidades nacionais: a Universidade do Minho, a Universidade do Porto e a Universidade de Aveiro; dois Centros Tecnológicos: o CITEVE – Centro Tecnológico das Indústrias Têxtil e do Vestuário de Portugal, e o CTIC – Centro Tecnológico das Indústrias do Couro; e um Instituto de Novas Tecnologias: o CEIIA – Centro para a Excelência e Inovação na Indústria Automóvel.

A missão e atividade do CeNTI tem-se destacado pelo dinamismo e apoio de proximidade aos sectores industriais a nível nacional e internacional, no sentido de desenvolver e validar novas tecnologias que têm por base o desenvolvimento de novos materiais, novas tecnologias interativas, novos sistemas de sensorização em áreas multissetoriais e multitecnológicas.

Sendo o CeNTI um Instituto de Novas Tecnologias que apresenta orientação multidisciplinar e multissetorial, está equipado com a mais avançada tecnologia. Dispõe de meio físicos avançados de desenvolvimento, teste e prototipagem. Apresenta no seu portefólio, diversos projetos que evidenciam o seu compromisso e missão no apoio e dinamização de infraestruturas tecnológicas, industriais e empresariais, com o objetivo de desenvolver novos produtos de elevado valor acrescentado para o mercado e a incorporação dessas tecnologias.

## 1.2. Objetivos

Uma das formas de diminuir o desperdício alimentar é a utilização de embalagens inteligentes, uma vez que são capazes de fornecer aos consumidores informações em tempo

real sobre qualidade de alimentos embalados ( Tirtashi *et al.*, 2019). As embalagens inteligentes podem incluir indicadores de tempo e temperatura, ou indicadores de qualidade dos alimentos (Tichoniuk *et al.*, 2017), como por exemplo um indicador colorimétrico que muda de cor quando deteta mudanças de pH associadas à deterioração dos alimentos (Mustafa & Andreescu, 2018).

Uma vez que as principais alterações nos alimentos frescos como carne ou peixe devem-se à libertação de compostos do tipo amina durante o processo de deterioração, este processo tem impacto na alteração do pH do ambiente dentro embalagem. Sendo assim, essa alteração será detetada pelo sistema funcional desenvolvido e vai comunicar essa alteração ao consumidor.

Desta forma, o objetivo da presente dissertação centrava-se no desenvolvimento de um revestimento funcional de base biológica aditivado com um indicador colorimétrico sensível às alterações de pH, que foi utilizado para revestir um substrato polimérico tipicamente utilizado em embalagens alimentares. Os desenvolvimentos realizados para o alcance dos objetivos englobam vários métodos de caracterização complementares, como por exemplo avaliação físico-química do indicador desenvolvido, através de métodos como espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier com refletância total atenuada (FTIR-ATR), ensaio mecânico por flexão para avaliação de solubilidade em água (SA) e do índice de dilatação (ID) do revestimento desenvolvido e também avaliação colorimétrica da resposta do indicador, entre outras.

Pretende-se estudar a mudança de cor do indicador desenvolvido em meio líquido, através de utilização de soluções tampão com diferentes concentrações. Para além disso o indicador vai ser estudado *in vitro* com a utilização de amónia para simular a libertação de aminas voláteis durante a deterioração do alimento. Por último, pretende-se estudar este indicador num sistema de embalagens alimentares de forma que este permita aferir o estado real da qualidade dos alimentos, através de uma comunicação simples e visual da faixa de pH em que se encontra o alimento, permitindo assim ao consumidor tirar conclusão sobre segurança de produto para o consumo.

## 2. Estado da Arte

### 2.1. Embalagens Alimentares

A embalagem é parte complementar da maior parte dos alimentos. Esta desempenha um papel fundamental na indústria alimentar graças às suas múltiplas funções, nomeadamente, proteção, conservação, informação e conveniência na utilização e manuseamento para o consumidor. Como forma de proteção, a embalagem deve ser vista como um recipiente que contém o produto a embalar e o protege de choques, vibrações e compressões que ocorram ao longo do seu percurso, permitindo assim, que o alimento seja transportado e manuseado não só pelo cliente final, mas ao longo de todo o seu circuito. Para além de proteger o alimento de impactos físicos, deve ajudar a preservar as suas propriedades organoléticas e microbiológicas, garantir também a proteção e conservação da qualidade e integridade dos alimentos, e ainda contribuir para a redução de desperdício alimentar (Ghoshal, 2018; Vitale *et al.*, 2018).

De acordo com a FAO, o desperdício alimentar doméstico é causado por hábitos de compra inadequados, informação pouco clara nos rótulos, compras em excesso e armazenamento inadequado ou insuficiente (FAO, 2019). De acordo com uma pesquisa realizada no Reino Unido, tendo sido o objetivo principal o estudo da relação entre a embalagem e o desperdício alimentar doméstico, aproximadamente 20–31 % de carnes e peixes, 10–15 % de produtos de padaria e 9 % dos iogurtes são desperdiçados por motivos associados à rotulagem (Zeng *et al.*, 2021).

Nos últimos anos, diversos estudos têm demonstrado que o aumento da vida de prateleira dos alimentos e, por consequente, a redução do desperdício alimentar, assim como a redução dos custos associados ao mesmo, pode ser atingido por meio de uma solução de embalagem otimizada como por exemplo: embalagens ativas ou embalagens inteligentes (Vitale *et al.*, 2018).

#### 2.1.1. Embalagens Ativas

O principal objetivo da embalagem ativa é detetar mudanças no ambiente interno ou externo da embalagem, respondendo a essas alterações, de forma garantir a integridade do produto embalado. Existem vários tipos de embalagens ativas como, por exemplo, embalagens que absorvem o vapor de água libertado. Para além disso, as embalagens de atmosfera modificada ou controlada também fazem parte de embalagens ativas. Para tal, no

sentido de melhor conservação do produto, na atmosfera interna da embalagem pode ser introduzido dióxido de carbono para limitar o crescimento da carga microbiana (Brody et al., 2001).

Atualmente, as tecnologias de embalagem ativa mais populares e amplamente utilizadas para alimentos consistem em embalagens que são projetadas para remover o oxigênio de dentro da mesma. Os sequestradores de oxigênio ajudam a diminuir os efeitos oxidativos do conteúdo desta, prolongando assim, a validade e garantido a qualidade e a segurança do alimento (Ghoshal, 2018).

De acordo com Ghoshal, 2018, a embalagem ativa tem sido uma inovação importante no sistema de embalagens alimentares durante várias décadas, desde a inserção inicial de agentes dessecantes em embalagens de alimentos secos.

Hoje em dia existem vários sistemas de embalagens ativas que são utilizadas na indústria alimentar. As embalagens ativas podem apresentar na sua constituição emissores de dióxido de carbono, absorventes de odores, reguladores da humidade relativa, podem também conter várias substância antibacterianas e antioxidantes (Wyrwa & Barska, 2017).

### 2.1.2. Embalagem Inteligente

Uma embalagem inteligente é aquela que monitoriza uma ou mais propriedades do alimento embalado ou do ambiente onde ele está inserido, e é capaz de informar fabricante, retalhista ou consumidor sobre o estado do produto. No entanto, o conceito de embalagem inteligente é diferente dos princípios de embalagem ativa (Ghoshal, 2018). Desta forma, a embalagem é classificada como “inteligente” se tiver a capacidade de responder às alterações no produto, e comunicar essa informação ao ser humano. Por exemplo, uma embalagem inteligente é aquela que pode acompanhar as condições de qualidade ou segurança de um produto alimentar e fornecer um alerta atempado ao consumidor ou ao fabricante de alimentos. O sistema de embalagem inteligente é um sistema que envolve não apenas a embalagem, mas também o produto alimentar, o ambiente interno e/ou externo e outros aspetos importantes (Kit L. Yam *et al.*, 2005).

Existem várias funções que uma embalagem pode executar para ser considerada como uma embalagem inteligente. Algumas dessas funções são: a extensão de atributos intrínsecos do produto, como por exemplo: aparência, sabor, aroma, *etc.*; indicação de qualquer tipo de alteração no produto ou na própria embalagem, comunicação do histórico do produto, ou outras condições importantes, por exemplo, condições de armazenamento, entre outros (Ghoshal, 2018).

Às embalagens inteligentes estão sempre associados rótulos ou etiquetas pequenas e baratas, que são fixadas na embalagem primária ou, por vezes, na embalagem secundária, para facilitar a comunicação em toda a cadeia de distribuição e para que as ações apropriadas possam ser tomadas no sentido de garantir qualidade e segurança dos alimentos. Existem dois tipos de embalagens inteligentes: suportes de dados (como etiquetas de código de barras e etiquetas de identificação por radiofrequência [RFID]), que são usados para armazenar e transmitir dados; e indicadores de embalagem (como indicadores de tempo-temperatura, indicadores de gás, indicadores de pH, biossensores), que são usados para controlar o ambiente externo ou interno da embalagem e, quando necessário, emitir avisos visuais (Ghoshal, 2018; Kit L. Yam *et al.*, 2005).

A redução da componente de desperdício alimentar associada ao "não usado a tempo", pode ser significativamente reduzida pelo uso de embalagens inteligentes, que fornecem informações precisas ao consumidor sobre as condições dos alimentos (Butler, 2012).

Hoje em dia já existem vários exemplos de embalagens inteligentes comercializadas no mercado. Na Figura 1 encontram-se identificados vários tipos de embalagens inteligentes comercializados atualmente no mercado.

Tipo	Tecnologia	Nome	Empresa
Portadores de Dados	Identificação por radiofrequência	Easy2log	CAEN RFID Srl
		Intelligent Box	Mondi Pic
Indicadores	Indicadores de tempo-temperatura	CS8304	Convergence Systems Ltd.
		Temptrip	Temptrip LLC
		Checkpoint®	Vitsab
		Fresh-Check®	LifeLines
		On Vu™	Ciba Speciality Chemical and
		MonitorMark™	FreshPoint
		eO	3M™, Minnesota
		Keep-it®	CRYOLOG S.A.
		Cook-Chex	Keep-it Technologies
		Timestrip	Pymah Corp.
Colour-Therm	Timestrip Plc		
TopCryo™	Colour-Therm		
Indicadores de frescura	Indicadores de frescura	Fresh Tag	COX Technologies
		SensorQ™	DSM NV and Food Quality Sensor
		RipeSense	RipSense™ and ort Research
Sensores	Bio sensores	Food fresh™	Vanprob
		Toxin Guard™	Toxin Alert
	Food Sentinel®	SIRA Technologies	
	Sensores de gás	Tell-Tab™	IMPAK Corporation
		Ageless Eye™	Mitsubishi Gas Chemical Inc.
O <sub>2</sub> Sense	FreshPoint Lab.		

Figura 1: Diferentes tipos de embalagens inteligentes existentes no mercado. (Adotado de Müller & Schmid, 2019)

## a) Indicadores Colorimétricos

Os indicadores colorimétricos podem indicar presença, ausência ou concentração de diferentes substâncias por meio de uma mudança característica na cor. Hoje em dia existem vários indicadores colorimétricos disponíveis no mercado para utilizar nas embalagens alimentares. Sistemas de indicadores colorimétricos não invasivos fornecem informação qualitativa através da alteração colorimétrica visual. Esses indicadores colorimétricos tanto podem identificar a integridade da embalagem como fornecer informação acerca da frescura do alimento embalado (O'Grady & Kerry, 2008).

A mudança da cor dos indicadores colorimétricos tanto pode ser associada à mudança de pH na atmosfera da embalagem, mas também à presença de várias substâncias como etanol, produzido durante a fermentação, liberação de etileno durante o processo de amadurecimento da fruta, entre outros (O'Grady & Kerry, 2008).

## b) Indicadores Colorimétricos Responsivos à Alteração de pH

Certas substâncias orgânicas mudam de cor em solução, quando a concentração de íons  $H^+$  atinge um determinado valor. Por norma, essas substâncias são ácidos orgânicos fracos ou bases orgânicas fracas que podem ser utilizadas para determinar o pH de uma solução, (Sajin *et al.*, 2020).

Existem vários pigmentos sintéticos como o verde de bromocresol, o azul de bromofenol, vermelho de clorofenol que apresentam diferentes faixas de viragem da cor e que podem ser imobilizados na matriz polimérica para monitorizar a deterioração de alimentos perecíveis como, por exemplo, peixe através da liberação de amins voláteis que vão ter um impacto direto na alteração do pH da atmosfera da embalagem provocando, assim, a mudança na cor do indicador sensível ao pH (Balbinot-Alfaro *et al.*, 2019).

Apesar da sua elevada utilidade em várias indústrias, os indicadores de pH comerciais são caros e alguns têm efeitos tóxicos sobre os utilizadores e podem causar poluição ambiental. Por essas razões, existe um interesse crescente no sentido de encontrar fontes alternativas de indicadores de pH de origem natural. Essas alternativas teriam menor custo, seriam mais disponíveis e menos tóxicas para o utilizador e meio ambiente (Abugri *et al.*, 2012).

Desta forma, alguns pigmentos naturais provenientes de fontes vegetais, tais como as antocianinas, apresentam elevado potencial como indicadores de pH. As antocianinas normalmente são isoladas de flores e frutos, e a expressão da sua cor é influenciada pela sua

estrutura química, pH, temperatura, presença de oxigénio, entre outros fatores. Assim, a instabilidade da cor das antocianinas faz com que estas sejam muito interessantes para monitorizar a qualidade dos alimentos, e portanto, serem utilizados no desenvolvimento de indicadores de deterioração dos alimentos nas embalagens inteligentes (Suman *et al.*, 2018).

Na Figura 2 estão representados vários extratos de antocianinas provenientes de diferentes fontes como alguns legumes, frutos, entre outros.



Figura 2: Extratos de antocianinas provenientes de diferentes fontes: a) extrato de feijão preto; b) extrato proveniente de batata doce roxa; c) extrato proveniente de couve roxa; d) extrato proveniente de mirtilo.

Já no caso dos indicadores sintéticos, estes são maioritariamente tóxicos para serem utilizados nas embalagens alimentares, sendo que um dos indicadores de pH menos tóxicos é o vermelho de metila (VM) (Medtronic, 2012). VM é um indicador clássico à base de ácido, naturalmente assume cor vermelha quando está na sua forma protonada, amarelo-laranja para a forma neutra e amarelo para a forma desprotonada (Benedict *et al.*, 2006).

Na Figura 3, encontra-se representada uma ilustração que indica a mudança de cor do VM em função do pH do meio, sendo que para valores de pH abaixo dos 4 o VM apresenta coloração vermelha, enquanto para valores de pH acima de 6 este apresenta coloração amarela.

Diminuição de pH

Aumento de pH



Figura 3: Representação da mudança da cor do vermelho de metila em função do pH do meio. (Adoptado de Benedict *et al.*, 2006)

## 2.2. Alteração de pH na Deterioração de Alimentos

Os alimentos frescos são produtos altamente perecíveis devido à sua rica composição em nutrientes e água. Estes podem ser deteriorados por microrganismos, e também por reações enzimáticas que neles ocorrem. Existem vários fatores que podem provocar a deterioração alimentar, e estes podem ser divididos em: físicos (temperatura, impactos mecânicos), químicos (reação de Maillard, oxidação lipídica, entre outras), e biológicos (enzimas, presença de parasitas e microrganismos). Como tal, existem vários métodos tradicionais e também tecnologias emergentes que surgiram no final do século XX que ajudam a preservar a qualidade e a segurança dos alimentos. Alguns desses métodos são: salga, cura, tratamentos térmicos, campos elétricos pulsados, entre outros (Torres *et al.*, 2015).

O pH de um alimento é uma forma de entender se o alimento apresenta caráter ácido ou básico. A maior parte dos alimentos apresentam pH abaixo de 7, o que indica um caráter ácido (Robert & William, 2016). Os microrganismos, leveduras, e bolores são sensíveis a valores de pH de um alimento, sendo que valores de pH muito altos ou muito baixos vão prevenir o seu crescimento num alimento. A maior parte dos agentes patogénicos podem crescer em valores de pH a variar entre 4,6 e 9,0. No entanto, são poucos os alimentos que apresentam valores de pH suficientemente baixos para inibir o crescimento de microrganismos, especialmente as leveduras e os bolores (Robert & William, 2016).

Alguns alimentos podem apresentar naturalmente caráter ácido, como é o exemplo de vinagre, vinho, sumo de limão, enquanto outros podem ser “acidificados” propositadamente, via adição de ácidos ou então através de processos como fermentação. Os alimentos com um pH superior a 4,6 vulgarmente são conhecidos como alimentos pouco ácidos, sendo que o leite, carne e legumes fazem parte da lista desses alimentos (Moses, 2005).

Existem vários métodos de preservação de alimentos que podem ser divididos em métodos de preservação tradicionais e tecnologias emergentes. Um dos principais métodos de preservação tradicional é a redução de pH que pode ocorrer em alimentos durante adição de agentes acidificantes ou então durante alguns processos metabólicos (Torres *et al.*, 2015).

### 2.2.1. Alteração de pH na Deterioração de Carnes e Peixes

A deterioração dos alimentos é um processo metabólico complexo que faz com que os alimentos sejam não seguros para o consumo devido a alterações nas características estruturais e/ou proliferação microbiana no alimento (Rawat, 2015).



A proteína animal, mais vulgarmente conhecida como carne, é a primeira fonte de proteínas mais consumida a nível mundial, devido à sua matriz altamente rica em proteína. O processo de degradação da carne ou dos produtos à base de carne deve-se à proliferação microbiana, degradação enzimática e/ou oxidação lipídica (Dave & Ghaly, 2011) que são responsáveis pela decomposição das proteínas, gorduras e dos hidratos de carbono, resultando no desenvolvimento de odores característicos do processo de deterioração da carne e alguns *off-flavours* tornando, assim, a carne desagradável e/ou imprópria para o consumo (Iulietto *et al.*, 2015).

Até ao momento, foram feitos vários estudos que comprovam que durante a degradação da carne ocorre proliferação de bactérias, sendo que durante esse processo ocorre a produção do ácido láctico, o que vai ter um impacto direto no valor do pH da carne. Desta forma, durante deterioração da carne ou de produtos à base de carne, ocorre diminuição de pH, sendo que este pode baixar de pH=6,3 para pH=5,4 (Korkeala *et al.*, 1990).

O peixe é amplamente conhecido como uma boa fonte de proteínas na dieta dos seres humanos. De acordo com alguns autores, o consumo de peixe representa cerca de 14 % da ingestão mundial de proteínas de origem animal. O peixe fresco é constituído maioritariamente por água e proteína, é rico em aminoácidos essenciais, é uma boa fonte de diversos minerais e vitaminas, e ainda apresenta tecido muscular completamente estéril quando vivo. A deterioração de peixe é assim um processo muito complexo durante o qual ocorre a decomposição de vários componentes e a formação de novos compostos, que são responsáveis pela alteração de odor, sabor e da própria textura do peixe (Ghaly *et al.*, 2010).

No caso dos peixes os microrganismos podem estar presentes na cavidade intestinal e em todas as superfícies exteriores. Para além disso, o peixe fresco é um produto altamente perecível uma vez que apresenta elevado valor de atividade de água e valores de pH que variam entre 6,4 e 6,6. Normalmente, a deterioração do peixe inicia logo após 12-24 horas, se não for devidamente armazenado em ambiente refrigerado com temperatura abaixo dos 5°C (Suriasih, 1983).

### 2.3. Polímeros Utilizados em Embalagens Alimentares

O plástico é definido como um material processado de base polimérica. O mesmo pode ser utilizado na produção de filmes, tubos, diferentes tipo de peças, embalagens alimentares, entre outros. Uma vez que o plástico apresenta uma diversificação elevada de aplicações nas indústrias, existe uma enorme variedade de materiais plásticos. A embalagem alimentar é um dos principais campos de aplicação desses materiais, sendo que a função mais importante de

um material de embalagem é a preservação da qualidade dos alimentos (Baner, 2008). De acordo com *Plastics Europe Market Research Group* (PEMRG), em 2018 cerca de 40 % de todo o plástico produzido a nível mundial utilizava-se na produção de embalagens alimentares (Plastics Europe & Conversio Market & Strategy GmbH, 2019).

O Polietileno de Alta Densidade (HDPE), o Polietileno de Baixa Densidade (LDPE) e Polipropileno são alguns dos plásticos que são amplamente utilizados no desenvolvimento de embalagens alimentares. No caso do HDPE, este apresenta baixo nível de ramificações e tem forças intermoleculares mais fortes e resistentes, comparando com LDPE. Fisicamente, HDPE é um material mais rígido, mais opaco e apresenta resistência a temperaturas mais elevadas, o que permite larga utilização do mesmo, tanto a nível industrial como no dia-a-dia (Madhu *et al.*, 2014).

O plástico é um material cada vez mais utilizado o que leva a alguns problemas ligados, maioritariamente à poluição e ao esgotamento de recursos petrolíferos ao longo dos anos. Desta forma, nos últimos anos têm sido desenvolvidas várias alternativas ao plástico à base de matéria petrolífera dos quais são exemplo, os biopolímeros degradáveis (Madhu *et al.*, 2014).

### 2.3.1. Biopolímeros

O termo bioplástico é muitas vezes utilizado pelo público em geral, mas tanto pode referir-se a polímeros à base biológica, ou ao carácter biodegradável de um polímero. Tal como os plásticos de base petrolífera, os polímeros *bio-based* podem apresentar várias propriedades que são um fator decisivo na definição das aplicações em que podem ser utilizados. Para além disso, polímeros de base biológica muitas vezes apresentam aparência muito semelhante à dos polímeros de base petrolífera e por isso muitas vezes não podem ser facilmente distinguidos pelo consumidor (van den Oever *et al.*, 2017). Exemplos de bioplásticos são o ácido poliláctico (PLA) ou do poli-hidroxialcanoato (PHA).

Hoje em dia, já existem vários biopolímeros que são largamente utilizados na indústria alimentar como, por exemplo, acetato de celulose, ácido poliláctico, quitosano, entre outros. No caso do ácido poliláctico, este pode ser utilizado nas embalagens alimentares como, por exemplo, embalagens de iogurte, em vez de politereftalato de etileno, uma vez que possui propriedades semelhantes (Lackner, 2015).

Já no caso do quitosano (CHT), nos últimos anos têm aumentado o número de potenciais aplicações deste biopolímero como um revestimento devido às suas propriedades antioxidantes, antimicrobianas e também devido às suas propriedades mecânicas. Para além

disso, o CHT pode ser utilizado como um revestimento comestível, que se aplica sobre um alimento (Cazón & Vázquez, 2019).

Atualmente, os filmes biodegradáveis de fontes renováveis desenvolvidos, não poderiam substituir na totalidade as embalagens tradicionais de plástico para todos os alimentos disponíveis no mercado. Mas, em alguns casos, os biopolímeros podem substituir parcialmente os polímeros tradicionais, ou podem ser usados nas embalagens alimentares, desempenhando várias funções como controlar as trocas gasosas, controlar a humidade ou aromas indesejáveis (Pandey et al., 2015). Para além disso, podem libertar agentes ativos para a matriz alimentar, como agentes antimicrobianos naturais ou antioxidante ou serem utilizados como polímeros base para desenvolvimento de sensores colorimétricos de pH.

### a) Celulose e Derivados

Durante milhares de anos, a celulose respondeu às necessidades da humanidade de várias formas: como materiais fibrosos (algodão, linho, cânhamo, etc.) ou materiais compostos (madeira). As fontes históricas descobriram que há mais de 5 000 anos, no antigo Egito, as fibras e os tecidos de celulose já se utilizavam frequentemente. Desde então, a celulose tornou-se em material natural mais difundido pelo mundo (Kargarzadeh et al., 2017). No entanto, foi muito mais tarde que as pessoas adquiriram conhecimento da sua constituição química, configuração ou conformação molecular.

A celulose é um componente que constitui pelo menos um terço das plantas, correspondendo a 40-60 % (em peso) da madeira seca e mais de 90 % do algodão (99,9 % do algodão purificado) e linho. Desta forma, a celulose é sem dúvida, o composto orgânico de ocorrência natural mais abundante (Kamide, 2005).

Apesar da potencial aplicação em vários campos, a estrutura química da celulose apresenta várias desvantagens, como baixa solubilidade, natureza não termoplástica e alta hidrofiliabilidade. Para além disso, a celulose natural só pode ser degradada por enzimas específicas, como a celulase, produzida por alguns fungos e bactérias. No entanto, essas desvantagens podem ser superadas com modificações estruturais e alterações dos grupos funcionais da celulose (Zennifer et al., 2021). Desta forma, as propriedades da celulose modificada, vão depender de três fatores: o tipo de substituição, o grau de polimerização, e o grau de substituição da cadeia de celulose (Murray, 2009).

Em geral, as modificações químicas da celulose geram melhorias significativas nos parâmetros da solubilidade pelo que são vistas como uma opção para aumentar as aplicações

dos materiais à base deste polímero, e em condições específicas é ainda possível formar filmes (Murray, 2009; Zennifer et al., 2021).

As fibras de celulose possuem várias características interessantes, como resistência à tração, elevado brilho superficial e boa transparência. Devido a essas características os derivados da celulose podem ser regenerados como filmes bioplásticos para a produção de embalagens alimentares. Estes filmes têm um papel interessante nas aplicações nas embalagens alimentares devido à baixa permeabilidade ao oxigênio. Por vezes, aos derivados da celulose podem ser adicionados alguns plastificantes para sintetizar polímero com maior flexibilidade (Asgher et al., 2020).

De seguida vão ser apresentados alguns exemplos reportados em literatura da utilização de derivados de celulose com indicadores de pH em embalagens inteligentes.

Em 2020, Chen et al., desenvolveu um indicador de pH, para ser utilizado em embalagens alimentares à base de celulose. Como indicador responsivo ao pH, neste estudo, foram utilizadas antocianinas extraídas da batata doce roxa. A extração das antocianinas a partir da batata doce roxa, foi realizada pelo método de extração em solução aquosa de etanol seguida por etapas de filtração, evaporação do solvente e de liofilização. Para a preparação dos filmes foi utilizada celulose nanofibrilada diluída a 0,8 % em água desionizada e homogeneizada, à qual foram adicionadas as antocianinas extraídas. A mistura foi vertida para moldes de politetrafluoretileno (PTFE), e foi seca a 30 °C durante 36 horas. A avaliação da mudança de cor conforme a alteração de pH, foi avaliada mergulhando os filmes em soluções tampão com diferentes valores de pH. Ao submeter o filme preparado numa solução com pH ácido (pH=2,0) o filme mudou de cor para vermelho, enquanto que ao submeter o filme numa solução com pH neutro, o filme mudou de cor para bege claro. No caso da solução de pH alcalino (pH=12), o filme apresentava uma cor amarelada. Desta forma, o filme preparado apresentou mudanças de cor nítidas, quando em contacto com soluções tampão de diferentes valores de pH. No entanto, este revestimento funcional não foi testado em ambiente real.

Em outro estudo realizado por Tichoniuk *et al.*, 2017, foi desenvolvido um revestimento à base de carboximetilcelulose (CMC) como matriz polimérica para embalagens alimentares, no qual foram incorporados três tipos de indicadores naturais diferentes (curcumina, extrato da casca de uva, e extrato de beterraba), e um sintético (vermelho de metila). Inicialmente os indicadores colorimétricos de pH preparados, foram testados *in vitro*, colocando os sensores em caixas de Petri com pequenas amostras de bacalhau cru. As amostras de bacalhau cru juntamente com os indicadores foram armazenadas durante 20 horas à temperatura ambiente. Os três indicadores reagiram à deterioração de bacalhau cru de forma satisfatória, sendo que as mudanças de cor mais nítidas foram observadas nos

revestimentos que continham a curcumina e o vermelho de metila como indicador sensível ao pH. Depois de obter resultados promissores durante o teste *in vitro*, os três indicadores foram testados em embalagens alimentares. Para tal, as amostras de bacalhau com peso igual a 100 g foram colocadas em caixas de poliestireno (PS) e foram seladas com uma folha de PET que continha os indicadores imobilizados na sua superfície em forma de revestimento. As amostras de peixe embaladas foram armazenadas à temperatura ambiente durante 22 horas. Neste ensaio de caracterização de performance em ambiente real, dois dos indicadores apresentaram um comportamento desejável, sendo que o indicador à base de curcumina mudou de cor de amarelo claro para laranja cada vez mais intenso, à medida que a deterioração do alimento progredia. No caso do indicador vermelho de metila, este mudou de cor de vermelho framboesa para amarelo palha. Ambos os filmes apresentaram elevada estabilidade das cores alteradas.

## b) Quitosano

A natureza oferece-nos uma vasta gama de materiais que apresentam grande potencial para ajudar a preservar os seus recursos. Um dos exemplos desses materiais é o quitosano que é um dos biomateriais mais utilizados e largamente distribuído no mundo. É o segundo polissacarídeo natural mais abundante a seguir à celulose e é o biopolímero de origem animal mais abundante (Haghighi et al., 2020).

O quitosano é obtido pela desacetilação da quitina, que por sua vez é extraída de resíduos marinhos como crustáceos (por exemplo, caranguejo, lagosta, camarão e krill), moluscos (por exemplo, lula) e microrganismos (Mackay & Tait, 2011). Os resíduos da casca dos camarões dos caranguejos são as fontes mais citadas na literatura como matéria-prima para a síntese de quitosano. Diferentes fontes apresentam diferentes conteúdos de quitina: os resíduos de casca do crustáceo, em média, apresentam entre 30-50 % em peso de carbonato de cálcio e entre 20-30 %, em peso de quitina, enquanto as carapaças de algumas espécies de lagostas, apresentam entre 60-75 %, em peso, do seu conteúdo em quitina. Este valor é o mais elevado entre todas as espécies que contêm quitina (Kou et al., 2021). Este biopolímero pode ser aplicado em várias indústrias, como por exemplo, a indústria farmacêutica, médica, alimentar, entre outras (Pal et al., 2020).

O processamento da quitina para obter quitosano envolve trituração e secagem de resíduos de marisco (por exemplo, camarão, caranguejo, lagosta ou qualquer outro crustáceo adequado). O produto é primeiramente processado com uma etapa de tratamento ácido

seguida de uma etapa de tratamento alcalino, para remover o cálcio e a proteína, respetivamente. O produto obtido após estas etapas é a quitina, que é ainda submetida a um tratamento com hidróxido de sódio concentrado, num processo conhecido como desacetilação, para produzir quitosano (Vunain et al., 2017).

As propriedades físico-químicas, de solubilidade e viscosidade do quitosano dependem do grau de desacetilação e do seu peso molecular. Contudo, pode-se afirmar que quitosano é insolúvel em soluções aquosas com o pH acima de 7, sendo que este passa a ser solúvel em soluções ácidas diluídas (pH<6) (Pal et al., 2020; Vunain et al., 2017).

A quitina e quitosano têm inúmeras aplicações e vantagens. A propriedade mais atrativa do quitosano é a possibilidade de formar hidrocolóides e gelificar água, assim como pode ainda ser usado como aditivo alimentar, pois funciona como agente espessante e como matriz de revestimento na indústria alimentar (Pal et al., 2020). Por essa razão, o quitosano está a ser amplamente investigado e usado devido às suas propriedades biológicas e funcionais únicas. No entanto, desvantagens como baixas propriedades mecânicas e alta sensibilidade às temperaturas elevadas e à humidade, representam grandes limitações para suas aplicações industriais (Haghighi et al., 2020).

No caso das aplicações do quitosano na produção de embalagens alimentares, a sua utilização é ainda limitada uma vez que apesar de apresentar boas propriedades de barreira contra gases e lípidos, devido ao seu carácter hidrofílico, este é caracterizado com propriedades de barreira fraca ao vapor de água, o que é essencial na maioria das aplicações de embalagens de alimentos (Mackay & Tait, 2011)

De seguida vão ser apresentados alguns exemplos reportados em literatura da utilização de quitosano com indicadores de pH em embalagens inteligentes.

Em 2014, Yoshida *et al.*, desenvolveu um indicador colorimétrico de pH de resposta rápida, a partir de quitosano e antocianinas, aplicando técnicas de fabricação simples. O filme indicador foi preparado a partir de uma solução de quitosano a 2 % (m/m) em solução de ácido acético diluído, onde foram testadas várias concentrações de antocianinas 0,01-2,00 % (m/m), sendo que a solução com 1 % (m/m) de concentração de antocianinas apresentou a melhor variação de cor dos filmes de quitosano em diferentes condições de pH. Pequenas quantidades da mistura foram vertidas para as placas de Petri, e secas durante a noite à temperatura ambiente, tendo-se obtido filmes de cor violeta escuros, finos e flexíveis. A resposta do indicador de pH no filme foi avaliada por imersão em soluções tampão com diferentes valores de pH (pH entre 2,0-13,0). Os filmes apresentaram coloração rosa pálida quando submetidos a pH ácido, em pH neutro mudaram de cor para verde azulado e, em pH básico ficavam amarelos. As variações de cor observadas, foram associadas às diferentes

estruturas químicas de antocianinas, as quais são dependentes do pH da solução (Yoshida et al., 2014).

Na Figura 4 estão representadas as respostas colorimétricas aos diferentes valores de pH dos filmes desenvolvidos à base de CHT e antocianinas.

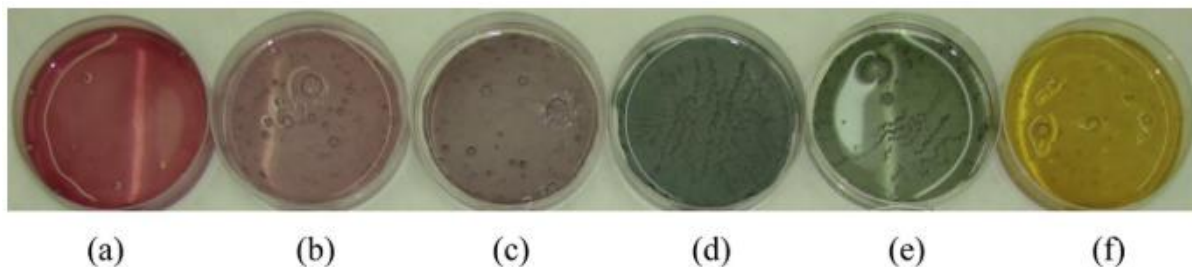


Figura 4: Resposta dos indicadores de pH à base de CHT e antocianinas a diferentes valores de pH: (a) pH=2,0; (b) pH=4,0; (c) pH=5,6; (d) pH=7,0; (e) pH=8,0; (f) pH=13,0. (Adaptado de Yoshida et al., 2014)

Em 2018, Halász e Csóka desenvolveram um indicador colorimétrico, também com base em quitosano e antocianinas, tendo estas sido extraídas de arónia preta. Para preparação deste filme foi utilizada uma solução de quitosano 1 % (m/m) em ácido acético diluído, onde foram adicionadas as antocianinas em diferentes concentrações. Os filmes foram vertidos para placas de polipropileno (PP) e secos em estufa a 40 °C durante 24 horas. Para avaliar a resposta dos filmes à mudança de pH, estes foram introduzidos em soluções tampão com valores de pH diferentes, tendo-se verificado: uma coloração vermelha após contacto com as soluções de pH mais ácido, para pH neutro, a cor do filme alterou para castanho-cinzento, e para valores de pH básicos a cor do filme mudou para azul intenso (Halász & Csóka, 2018).

Num outro estudo realizado em 2020, Zhang, *et al.*, desenvolveu um filme à base de quitosano e procianidina como indicador de pH, tendo as misturas sido preparadas de forma semelhante aos estudos apresentados anteriormente. Para obter os filmes, a mistura foi vertida para placas de PTFE, seca inicialmente à temperatura ambiente durante 24 h e, posteriormente, à temperatura de 105 °C durante mais 4 h. A avaliação do filme foi também realizada por imersão destes em várias soluções tampão com valores de pH diferentes, tendo-se verificado que nas soluções de pH mais ácido os filmes apresentam coloração amarelada, enquanto que nas soluções de pH alcalino, a cor do filme muda para vermelho (Zhang et al., 2021).

Apesar de nos estudos apresentados anteriormente, os três filmes apresentam mudanças de cor visíveis quando submetidos a soluções tampão com valores de pH diferentes, nenhum deles foi avaliado em ambiente real, não existindo, assim, informação clara sobre o comportamento desses filmes em embalagens alimentares.

Num outro estudo de Tirtashi *et al.*, 2019, foi desenvolvido um indicador colorimétrico sensível à mudança de pH, com base em quitosano e antocianinas extraídas da cenoura preta,

que foi testado para monitorizar a deterioração do leite. A preparação do indicador foi realizada pela utilização de um filtro à base de papel de celulose que foi totalmente imerso numa solução de quitosano e antocianina, de seguida seco e mantido em local escuro. A eficiência da resposta do indicador a diferentes valores de pH foi testada inicialmente com várias soluções tampão de diferentes valores de pH, tendo verificado que em soluções de pH ácidos, o filme apresentou uma coloração vermelha, em soluções de pH neutro a cor do filme mudou para violeta, e em soluções de pH alcalinos a cor do filme mudou para azul. Para avaliar o desempenho deste indicador em ambiente real, foram realizados testes com leite de vaca. O leite, após a pasteurização, apresenta  $\text{pH}=5,7$ , sendo que para esse valor de pH o indicador preparado apresenta uma coloração violeta. Após 48 horas de armazenamento do leite a  $20^{\circ}\text{C}$ , e quando a população de microrganismos mesófilos foi superior aos valores legalmente permitidos, o leite foi considerado como deteriorado. Neste momento, o indicador voltou a ser testado e, desta vez apresentou coloração rosa, indicando, desta forma, que o pH do leite baixou durante o armazenamento (Ebrahimi Tirtashi *et al.*, 2019b).

## 2.4. Colorimetria

A visão humana é um processo extremamente complicado pelo que não existe nenhum sistema de medição que possa caracterizar numericamente toda a perceção humana da luz e da cor. Desta forma, a cor de um material não pode ser quantificada de uma forma puramente física, uma vez que depende de vários aspetos como, por exemplo, a perceção individual que varia de pessoa para pessoa, fonte de luz, entre outros (Goodman, 2012).

Apesar das dificuldades descritas anteriormente, todas as cores podem ser caracterizadas pela tonalidade dominante, pela saturação, ou seja, quantidade dessa tonalidade, e pelo grau de luminosidade. Assim, em 1976, a Comissão Internacional de Iluminação (CIE) adotou um método padrão de cálculo de uma cor, conhecido como CIE 1976  $L^*a^*b^*$  ou (CIE Lab) *Colour Space* (Gangakhedkar, 2010).

Uma vez que a perceção da cor e da diferença entre as cores é um ramo muito utilizado em várias indústrias, o modelo da perceção da cor pelo CIE tem vindo a melhorar ao longo dos anos no sentido de conseguir uma melhor descrição numérica da cor ou da diferença dentre as cores.

Na Figura 5 estão representados dois espaços de cor existentes: CIE  $L^*a^*b^*$  e CIE  $L^*C^*h$ , sendo que o primeiro espaço utiliza coordenadas perpendiculares, enquanto o segundo utiliza coordenadas cilíndricas (Stancil & Jordan, 1985).



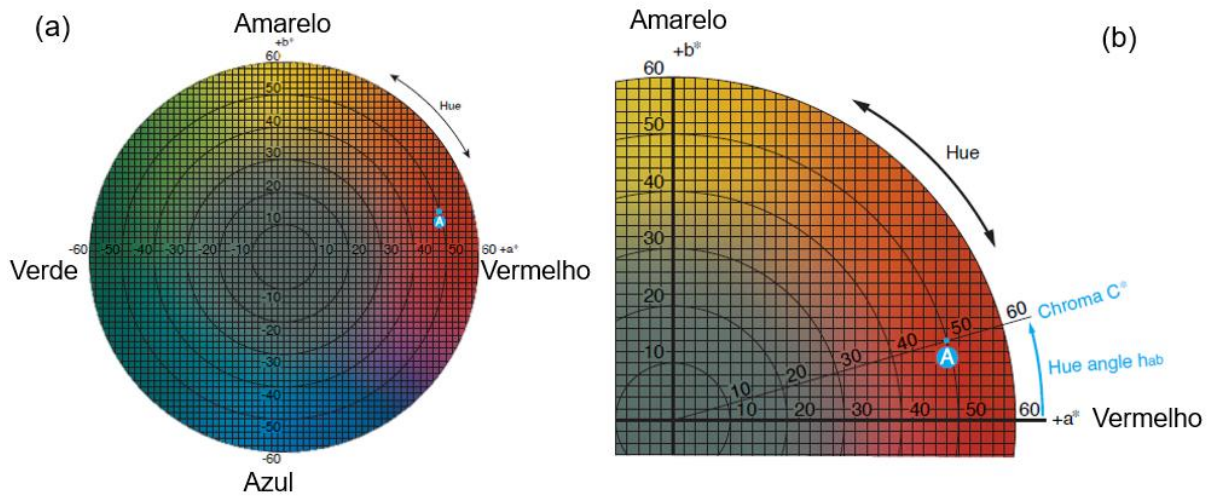


Figura 5: Representação gráfica dos espaços CIE L\*a\*b\* (a) e CIE L\*C\*h. (Adaptado de Stancil & Jordan, 1985)

No caso das coordenadas perpendiculares, L\* representa a variação da luminosidade, enquanto a\* e b\* representam variação vermelho-verde e amarelo-azul, respetivamente. Por outro lado, no caso das coordenadas cilíndricas, L\* representa a variação de luminosidade no respetivo eixo, enquanto a coordenada C\* apresenta a variação de saturação no raio C\* e h (em graus) representa a variação do ângulo de tom (Gangakhedkar, 2010).

### 2.4.1. CIELab

A distância de cores, no espaço de cores CIE L\*a\*b\* é especificada como dE ( $\Delta E$ ) e pode ser calculada de acordo com a fórmula desenvolvida em 1976, usando a seguinte equação:

$$dE^* = \sqrt{dL^{*2} + da^{*2} + db^{*2}} \quad (\text{Eq. 1})$$

Onde,

- dL\* representa a variação de luminosidade no eixo L\*;
- da\* representa a variação vermelho-verde no eixo a\*;
- db\* representa a variação amarelo-azul no eixo b\* (Hiller, 2019).

Apesar de ser uma forma simples e prática de avaliar distância entre duas cores, foi rapidamente detetado que esta equação apresentava algumas falhas, uma vez que esta equação não tem em conta algumas variáveis importantes, como a alta sensibilidade de olho humano a pequenas variações na diferença de cor em algumas regiões do sistema de coordenadas CIE L\*a\*b\* (Habekost, 2013). Essas diferenças perceptuais de cores levou a CIE a desenvolver formas mais complexas e mais completas para a quantificação de diferença de cor entre duas amostras (Gangakhedkar, 2010).

## 2.4.2. CIEDE2000

A fórmula CIEDE2000 ( $dE_{2000}$  ou  $\Delta E_{00}$ ) foi publicada pela CIE em 2001. Esta fórmula é mais sofisticada do que as formulas anteriormente apresentadas pela CIE, sendo que esta abordagem prevê a redução das limitações das interpretações anteriores (Sharma et al., 2005). A diferença de cores de acordo com a CIEDE2000 pode ser calculada de acordo com a seguinte equação:

$$dE_{2000} = \sqrt{\left(\frac{\Delta L'}{k_L S_L}\right)^2 + \left(\frac{\Delta C'}{k_C S_C}\right)^2 + \left(\frac{\Delta H'}{k_H S_H}\right)^2 + R_T \left(\frac{\Delta C'}{k_C S_C}\right) \left(\frac{\Delta H'}{k_H S_H}\right)} \quad (\text{Eq. 2})$$

Onde,

- $\Delta L'$  representa diferença da claridade;
- $\Delta C'$  representa diferença da cromaticidade;
- $\Delta H'$  representa diferença da tonalidade;
- $R_T$  representa componente rotacional;
- $k_L; k_C; k_H$  representam fatores experimentais de condições experimentais
- $S_L$  representa compensação de diferença da claridade;
- $S_G$  representa compensação de diferença da cromaticidade;
- $S_H$  representa compensação de diferença da tonalidade.

Atualmente esta fórmula é considerada como a melhor para a quantificação da distância entre duas cores, uma vez que é a fórmula que melhor representa a percepção visual. Ela não só contém funções ponderadas para luminosidade, saturação e tom, mas também os termos de mistura. O último termo na equação é referido como termo de rotação, isso introduz uma ponderação adicional dependente do tom “rotatório”. Todas as fórmulas de distância entre as cores descritas até agora podem ser descritas pela fórmula apresentada acima. Esta interpretação aproxima-se muito mais do objetivo de se obter uma distância entre duas cores para todas as tonalidade de cores (Hiller, 2019).

### 3. Materiais e Métodos

No presente capítulo estão apresentados os materiais utilizados durante o desenvolvimento dos revestimentos funcionais. São também apresentados os diferentes métodos e procedimentos utilizados para a formulação dos revestimentos funcionais, assim como para a caracterização dos mesmos.

#### 3.1. Materiais

Para a preparação dos revestimentos foram utilizados os seguintes reagentes: quitosano (CHT) com um grau de desacetilação  $\geq 95\%$  (*ChitoClear<sup>®</sup> HQG 95, Primex*); carboximetilcelulose, sal sódico (CMC),  $\sim 250$  kD (*Sigma-Aldrich*); surfactante Tween<sup>®</sup> 20 (*Sigma-Aldrich*), Tween<sup>®</sup> 80 (*Sigma-Aldrich*) e Span<sup>®</sup> 80 (*Sigma-Aldrich*); glicerol anidro (Merck); ácido acético glacial 99,9% (VWR); e vermelho de metila (VM) (ACS grade, VWR). Para preparar as soluções tampão foi utilizado o ácido cítrico anidro (*Sigma-Aldrich*) e citrato trissódico com grau de pureza de 99% (*Panreac*).

Durante a preparação das formulações, para dissolver o CHT e a CMC foi utilizado um agitador mecânico CAT R 18.

Para a realização dos ensaios *in situ* foi utilizado o camarão cozido *Vannamei* de calibre 40/60 adquirido no hipermercado *Auchan*.

#### 3.2. Métodos

Neste subcapítulo vão ser descritas todas as formulações preparadas durante o desenvolvimento do revestimento funcional, assim como as técnicas de caracterização que foram usadas durante o desenvolvimento do revestimento. Durante todo o trabalho foi utilizado o mesmo substrato tipicamente utilizado em embalagens alimentares.

##### 3.2.1. Preparação de Revestimentos Funcionais

###### a) Revestimentos Preliminares com Biopolímeros

Para elaboração do revestimento funcional, inicialmente foram preparadas três soluções de CHT com concentrações diferentes. Para preparar essas soluções foram pesadas três massas diferentes de CHT (1, 2, 3 g) e cada uma dessas porções de CHT foi dissolvida em

100 mL de uma solução aquosa de ácido acético a 1 % (v/v). A dissolução foi feita gradualmente com auxílio de agitação mecânica durante aproximadamente 6 horas. e com uma velocidade de agitação entre 600-800 rotações por minuto (rpm). Depois da dissolução completa foram obtidas soluções de CHT com três concentrações diferentes de 1 %, 2 % e 3 % (m/v), respectivamente.

As soluções descritas anteriormente foram aplicadas num substrato polimérico tipicamente utilizado em embalagens alimentares, utilizando um aplicador de filme, tendo sido testadas duas espessuras diferentes para cada uma das soluções de concentração diferente. Na Tabela 1 estão representados todos os revestimentos preliminares de base CHT realizados em substrato polimérico, indicando as concentrações de polímero utilizadas e espessuras do revestimento aplicadas.

Tabela 1: Revestimentos preliminares de base CHT em substrato polimérico

CHT % (m/v)	Espessura do revestimento ( $\mu\text{m}$ )
1	200
	400
2	200
	400
3	200
	400

O segundo biopolímero utilizado para a preparação do revestimento funcional foi a CMC, sendo que para esta abordagem foram preparadas soluções de duas concentrações diferentes. Para preparar essas soluções foram pesadas duas massas diferentes de CMC (2 e 4 g) em que cada uma foi dissolvida em 100 mL de água destilada. A dissolução foi feita gradualmente com auxílio de agitação mecânica durante aproximadamente 6 horas com uma velocidade de agitação entre 600-800 rpm. Depois da dissolução completa foram obtidas soluções aquosas de CMC com duas concentrações diferentes de 2 e 4 % (m/v), respectivamente.

As soluções descritas anteriormente foram também aplicadas num substrato polimérico tipicamente utilizado em embalagens alimentares. Para a aplicação de revestimentos foi utilizado um aplicador de filme da *Elcometer*, e tendo sido testadas também duas espessuras diferentes para cada uma das soluções de concentração diferente. Na Tabela 2 estão representados todos os revestimentos preliminares de base CMC realizados em substrato polimérico, indicando as concentrações de polímero utilizadas e espessuras de revestimento aplicadas.

Tabela 2: Revestimento à base de CMC sem utilização de surfactantes.

CMC % (m/v)	Espessura do revestimento ( $\mu\text{m}$ )
2	200
	400
4	200
	400

Na Figura 6 está representado o aplicador de filmes que foi utilizado para a aplicação de todos os revestimentos funcionais desenvolvidos, e que permite aplicar as formulações com base em biopolímeros no substrato de uma forma uniforme e com a espessura pretendida e constante.



Figura 6: Aplicador de filmes Elcometer.

As aplicações das formulações com base em biopolímeros, com ou sem aditivos, foi realizada com o auxílio de um aplicador de filmes com diferentes espessuras, tendo sido utilizadas as espessuras de 200 e 400  $\mu\text{m}$ , mais especificamente.

#### a) Diferentes Abordagens para Melhoria da Adesão entre o Revestimento o Substrato

De modo a melhorar a adesão do revestimento com o substrato foram estudadas duas abordagens (Figura 7): i) utilização de surfactantes na formulação polimérica utilizada para o revestimento, ii) pré-tratamento do substrato com plasma de modo a aumentar a molhabilidade deste.

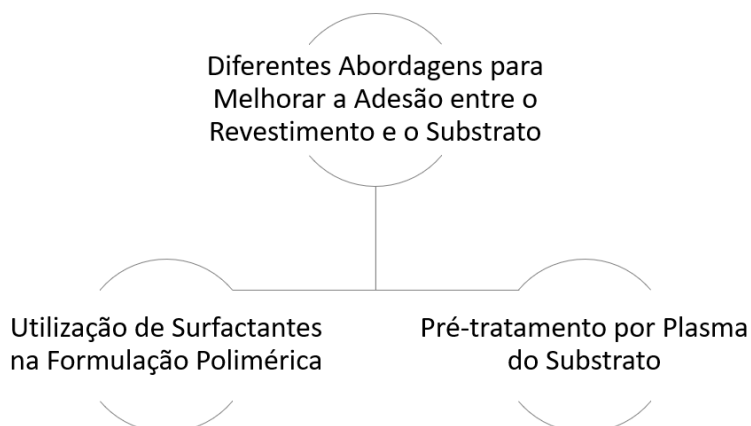


Figura 7: Diferentes abordagens utilizadas para melhorar a adesão entre o revestimento e o substrato.

Na abordagem i) foi utilizado o substrato polimérico previamente escolhido sem ser submetido a qualquer tipo de tratamento prévio. No sentido de diminuir tensão superficial da formulação de revestimento, o que consequentemente poderá melhorar a compatibilidade e a adesão entre este e o substrato, foram adicionados vários aditivos, tanto às soluções de CHT, como às soluções de CMC. Para tal, foram testados três surfactantes diferentes como aditivos: Tween 20, Tween 80 e Span 80. Para além dos surfactantes, foi ainda utilizado outro aditivo no sentido de melhorar outras características do revestimento desenvolvido, pelo que, foi também testada a adição de glicerol para diminuir a fragilidade do revestimento desenvolvido.

Com o objetivo de obter o melhor revestimento funcional possível foram testadas várias formulações com concentrações diferentes de cada componente, e que se encontram especificadas nas Tabelas 3 e 4.

Tabela 3: Revestimentos testados de base CHT com aditivos (surfactantes e glicerol) em diferentes percentagens.

Biopolímero	Concentração Inicial de Biopolímero (w/v%)	Surfactante (v/v%)	Concentração de Glicerol (v/v%)
CHT	3 %	Tween 80 (10 %)	0 %
		Tween 20 (10 %)	
		Span 80 (10 %)	
		Tween 80 (5 %)	

		Tween 80 (10 %)	0,5 %
		Tween 80 (5 %)	
	2 %	Tween 80 (10 %)	0 %
		Tween 20 (10 %)	
		Span 80 (10 %)	
		Tween 80 (5 %)	
		Tween 80 (10 %)	
		Tween 80 (5 %)	0,5 %
		Tween 80 (10 %)	0 %
	Tween 20 (10 %)		
	Span 80 (10 %)		
	Tween 80 (5 %)		
	Tween 80 (10 %)		
	1 %	Tween 80 (5 %)	0,5 %
Tween 80 (10 %)			

Tabela 4: Revestimentos testados de base CMC com utilização de aditivos (surfactantes e glicerol) em diferentes percentagens.

Biopolímero	Concentração Inicial de Biopolímero (w/v%)	Surfactante (v/v%)	Concentração de Glicerol (v/v%)
CMC	4 %	Tween 80 (10%)	0 %
		Tween 20 (10%)	
		Span 80 (10%)	
		Tween 80 (5 %)	
		Tween 80 (10 %)	0,5 %
		Tween 80 (5 %)	0,5 %
		Tween 80 (5 %)	1 %
	2 %	Tween 80 (10 %)	0 %
		Tween 20 (10 %)	
		Span 80 (10 %)	
		Tween 80 (5 %)	
		Tween 80 (10 %)	0,5 %
		Tween 80 (5 %)	0,5 %

Na abordagem ii) optou-se pela aplicação de um pré-tratamento da superfície do substrato polimérico com o plasma atmosférico, no sentido de aumentar a molhabilidade do mesmo. O tratamento com plasma é um processo largamente utilizado na indústria para melhorar a molhabilidade, por ser um processo simples de realizar e que permite um tratamento contínuo numa única etapa (Park & Jin, 2001). O plasma consiste numa descarga de um gás altamente ionizado em que a carga dos eletrões é equilibrada pela carga dos iões positivos, de modo a que o sistema como um todo seja eletricamente neutro (Haynes *et al.*, 2017), e origina uma maior quantidade de grupos químicos polares na superfície do substrato que poderão formar ligações mais fortes com o revestimento.

Neste trabalho o pré-tratamento por plasma foi realizado no substrato polimérico tipicamente utilizado nas embalagens previamente mencionado para tentar obter uma melhor adesão do revestimento. Este tratamento foi realizado recorrendo ao equipamento *Atmospheric Plasma Treatment System* dada *Sigma Technologies International* presente nas instalações do CeNTI. O tratamento foi feito com gás atmosférico, com a velocidade de rotação de 7,7 m/min, tendo sido variada a potência de descarga elétrica sobre o ar que se encontra entre os elétrodos metálicos e o substrato a ser tratado.

Tendo em conta que a potência teórica máxima fornecida aos elétrodos é de 15 kW, o que corresponde a 100 %, foram testadas diferentes percentagens de potências a variar entre 90-40 % da potência teórica máxima do equipamento para conseguir escolher a melhor condição para os objetivos propostos. Na Tabela 5 encontram-se os diferentes parâmetros utilizados para este estudo. O tamanho dos substratos tratados foi de 29,7×21,0 cm, e a eficiência do tratamento com plasma dos mesmo foi caracterizado pela medição do ângulo de contacto da gota de água com a superfície do substrato.

Tabela 5: Condições testadas durante o tratamento do substrato com o plasma.

Gás	Potência máxima (kW)	Potência utilizada (%)	Velocidade (m/min)
Ar	15	40	7,7
		50	
		70	
		90	

## b) Incorporação do Indicador Sensível ao pH

Para deteção de mudança de pH foi utilizado o indicador vermelho de metila. De acordo com a especificação do VM a solubilidade máxima em etanol é de 0,1 % (m/v)



("Product Specification," 1993). Desta forma, para a incorporar o VM na solução de biopolímero foi preparada uma solução de VM de 0,08 % (m/v) em solução aquosa de etanol a 80% (v/v), a qual foi colocado num banho de ultrassons durante 20 minutos. Depois da preparação da solução do VM, esta foi incorporada na solução previamente preparada de biopolímero numa proporção de 5 % (v/v).

### c) Secagem dos Revestimentos Funcionais

Todos os revestimentos realizados, depois de serem aplicados no substrato com o aplicador de filmes nas condições desejadas, foram sujeitos a uma etapa de secagem, para a qual estes foram colocados na estufa a 40 °C durante 15 h até secagem completa do revestimento. Para esta etapa foi utilizada uma estufa não ventilada da marca *Binder*.

### d) Revestimento com Uma ou Duas Camadas

Com o objetivo de se conseguir uma melhor retenção do VM na matriz polimérica de CHT e/ou CMC, decidiu-se testar revestimentos de duas camadas. Este tipo de revestimento só foi testado em substratos em que também se realizou o pré-tratamento por plasma, sendo que a diferença principal entre estes revestimentos é que no caso do revestimento de duas camadas, depois da aplicação do revestimento funcional no substrato e da secagem deste, aplicou-se uma segunda camada de revestimento com biopolímero sem a incorporação do indicador sensível à mudança de pH. Desta forma passa-se a representar como CHT/VM o revestimento de uma só camada, enquanto a apresentação CHT/VM→CHT refere-se ao revestimento de duas camadas, sendo que a segunda camada não apresenta na sua constituição o VM e poderá servir de barreira para prevenir a migração do VM para o ambiente da embalagem. Na Figura 8 estão esquematizadas as principais diferenças entre os revestimentos de uma e de duas camadas.

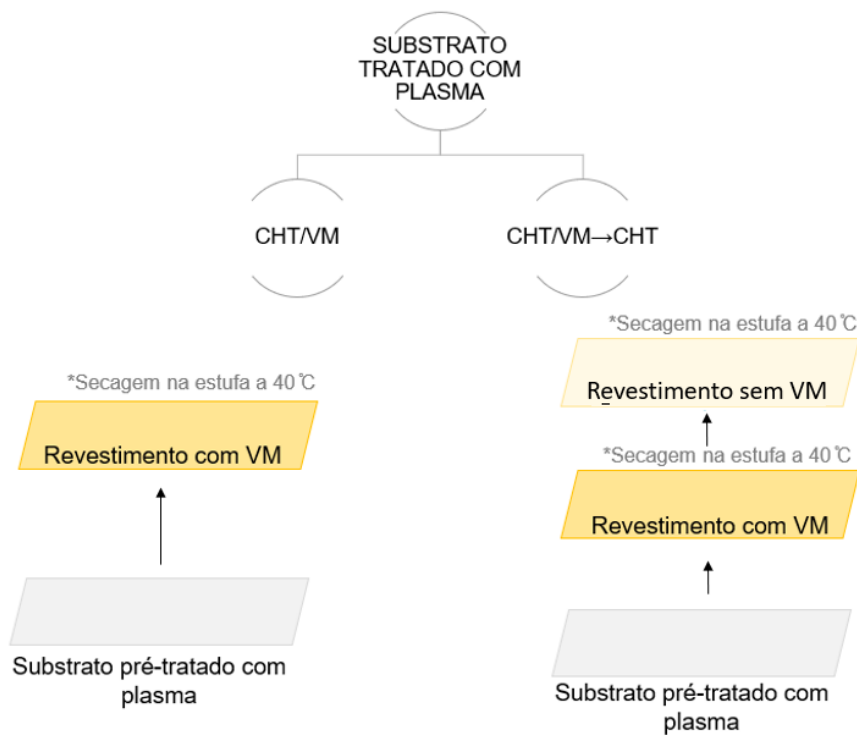


Figura 8: Apresentação esquemática dos revestimentos de uma e de duas camadas no substrato polimérico com pré-tratamento com plasma.

### e) Termofixação

A termofixação é uma técnica que permite conferir aos revestimentos poliméricos uma maior coesão da rede polimérica. Este processo foi testado em alguns dos revestimentos realizados numa tentativa de aumentar a retenção física do VM na matriz polimérica. A termofixação foi realizada com a prensa hidráulica e foram testadas duas condições de temperatura diferentes (40 e 80 °C) para posterior avaliação da migração do indicador sensível ao pH. Neste ensaio, parâmetros como o tempo e a pressão, foram constantes.. Na Tabela 6 estão representadas as várias condições de termofixação que foram testadas durante este trabalho, assim como os quatro revestimentos diferentes em que foi aplicada.

Tabela 6: Condições experimentais testadas no ensaio de termofixação para quatro revestimentos diferentes

Revestimento	Temperatura (°C)	Tempo (min)	Pressão (bar)
CHT	40	1	6
CHT	80		
CHT→CHT	40		
CHT→CHT	80		
CHT/VM	40		

<b>CHT/VM</b>	80		
<b>CHT/VM→CHT</b>	40		
<b>CHT/VM→CHT</b>	80		

### 3.2.2. Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier com Reflectância Total Atenuada (FTIR-ATR)

Os componentes utilizados para o desenvolvimento dos revestimentos funcionais, assim como o próprio revestimento funcional, foram caracterizados quimicamente, usando a técnica de espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier com reflectância total atenuada (FTIR-ATR), recorrendo ao espectrofotómetro *Perkin Elmer Spectrum 100 Series* de cristal diamante/seleneto de zinco com um acessório de ATR e software Spectrum 10.4.00.0190. Os espectros FTIR-ATR foram recolhidos num intervalo de 4000 a 600  $\text{cm}^{-1}$  com a resolução de 8  $\text{cm}^{-1}$ .

O objetivo principal dessa técnica passa pela deteção de grupos funcionais provenientes dos componentes do revestimento funcional e permite uma comparação entre amostras de modo a concluir sobre a presença destes componentes na superfície do substrato.

Na Figura 9 está representado o equipamento com auxílio do qual foi feito o ensaio FTIR-ATR.



Figura 9: Espectrofotómetro Perkin Elmer Spectrum 100 Series da Perkin Elmer.

### 3.2.3. Solubilidade de Água e Índice de Dilatação

Para aferir sobre a possível solubilidade em água e determinar os respectivos valores, assim como para concluir sobre a possível dilatação dos revestimentos funcionais, foi adotado o método de caracterização já descrito anteriormente em literatura por Yadal et al., 2021. O substrato com revestimento funcional, previamente cortado em fragmentos de 2 x 2 cm, foi seco na estufa a 105 °C até se verificar um peso constante. Depois da pré-secagem inicial, o peso de cada amostra foi registado (p1). Todas as medições de massa foram efetuadas com o auxílio da balança analítica da marca *Mettler Toledo*, modelo XS205DR. As amostras foram colocadas em frascos de 50 mL contendo 20 ml de água destilada, e os frascos foram tapados com parafilme para depois serem colocados num banho de água termostaticado (Scansci) à temperatura de 30 °C durante 24 horas. Passado esse tempo, as amostras foram removidas, o excesso de água foi retirado com o auxílio de papel de filtro, e depois registou-se o novo peso das amostras (p2). Em seguida, para determinação do índice de dilatação, as mesmas amostras foram posteriormente colocadas na estufa a 105 °C até se voltar a atingir um peso constante, de modo a garantir que a humidade residual foi removida. Depois do processo de secagem, foi novamente registado o peso da amostra seca (p3).

Para calcular o índice de dilatação do revestimento funcional no substrato, foi utilizada a Equação 3, enquanto que para calcular a solubilidade do mesmo foi utilizada a Equação 4:

$$\text{Índice de Dilatação (\%)} = \frac{p2-p1}{p1} \times 100 \quad (\text{Eq. 3})$$

$$\text{Solubilidade em Água (\%)} = \frac{p1-p3}{p1} \times 100 \quad (\text{Eq. 4})$$

### 3.2.4. Ensaio Mecânico

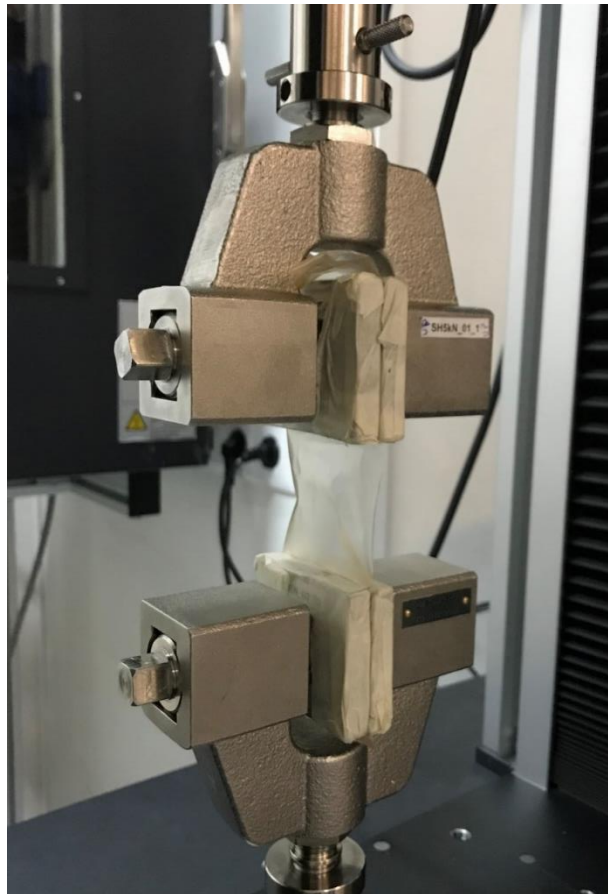
No caso do ensaio mecânico, os revestimentos funcionais de uma e de duas camadas, com e sem incorporação do VM, foram submetidos a teste mecânico por flexão que foi adaptado da norma ISO 7854: 1995 - *Rubber- or plastics-coated fabrics — Determination of resistance to damage by flexing*.

Durante este ensaio a amostra de substrato revestido foi colocada entre as garras do equipamento e sujeita a um movimento de flexão, provocando assim uma dobra na amostra.

Desta forma, este ensaio permite verificar se o revestimento aplicado no substrato em condições experimentais sofre algum dano físico. Para uma melhor compreensão do possível dano físico, as amostras resultantes deste ensaio foram avaliadas por microscopia ótica e também foram determinados os respetivos ângulos de contacto com gota de água para comparação dos valores antes e depois das amostras serem submetidas ao ensaio.

Para a realização deste ensaio foi utilizado o equipamento *Shimadzu Autograph AGX-V 50kN*, sendo que as amostras com 37,5 mm de largura e 125 mm de comprimento foram colocadas entre as duas garras do equipamento, a distância inicial entre as mesmas foi de 50 mm. O software *TRAPEZIUM™ X-V* foi programado para uma oscilação de 10 mm com uma velocidade igual a 350 mm por minuto. Este ciclo, que corresponde em média a 3,4 s foi repetido 100 vezes para cada amostra.

Na Figura 10 encontram-se representadas as garras com o substrato revestido imediatamente antes de se iniciar o processo de flexão.



*Figura 10: Imagem das garras do equipamento Shimadzu Autograph AGX-V 50kN com o substrato com revestimento funcional para realização dos ensaios mecânicos por flexão.*

### 3.2.5. Medição de Ângulos de Contacto e da Energia Livre de Superfície

A medição dos ângulos de contacto de uma superfície foi um tipo de caracterização realizada durante este trabalho experimental em diferentes fases dos desenvolvimentos para aferir sobre: a eficiência do pré-tratamento com plasma no substrato e também para complementar as análises de microscopia ótica na observação de efeitos de degradação mecânica nos substratos revestidos após os ensaios mecânicos de flexão. Para estas análises foi utilizado o tensiómetro *Tetha* da marca *Bioling Scientific*, controlado pelo software *oneAttention*.

A técnica que foi utilizada para a determinação de ângulo de contacto foi a *Sessile Drop*, com o volume de gota fixo de 3  $\mu\text{L}$  sendo que o líquido utilizado foi a água destilada. Na Figura 11, encontra-se a apresentação esquemática da medição de ângulo de contacto por esta técnica.

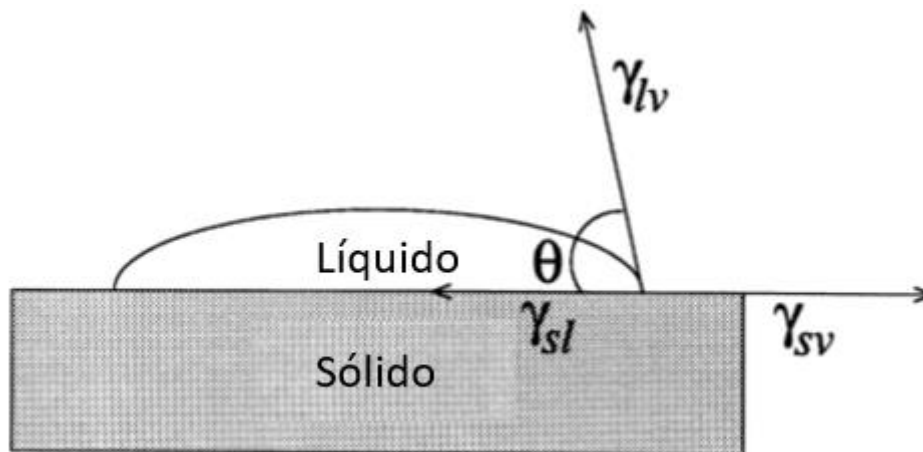


Figura 11: Apresentação esquemática da medição de ângulo de contacto com a técnica *Sessile Drop*, onde  $\gamma_{sl}$  corresponde à tensão na interface sólido-líquido;  $\gamma_{lv}$  corresponde à tensão na interface líquido-vapor e  $\gamma_{sv}$  corresponde à tensão na interface sólido-vapor. (Adaptado de Kwok & Neumann, 1999)

Para verificar a eficiência do plasma, foram medidos os ângulos de contacto ( $\theta$ ) da amostra controlo (amostra sem ser submetidas a qualquer tratamento por plasma) para comparação com os valores do ângulo de contacto das amostras com pré-tratamento. O ângulo de contacto é um fator importante na caracterização de uma superfície, para poder concluir sobre o carácter hidrofílico ( $\text{ângulo} < 90^{\circ}$ ) /hidrofóbico ( $\text{ângulo} > 90^{\circ}$ ) de uma superfície, o que por sua vez permite aferir sobre a compatibilidade e adesão entre o substrato e o revestimento.

Para avaliar se o ensaio mecânico por flexão teve impacto na superfície do revestimento funcional a nível da sua potencial degradação física, os ângulos de contacto das amostras submetidas a esse ensaio e estes foram comparados com os ângulos de contacto das amostras controlo. Neste caso, para além da determinação dos ângulos de contacto, foi realizado também o cálculo da respetiva energia de superfície da amostra. Nas Figuras 12 e

13 encontra-se representado o processo de determinação de ângulo de contato. Na Figura 12 está representada a agulha que deposita a gota de um líquido com um volume conhecido no substrato e na Figura 13 está representada a avaliação do ângulo de contacto com a utilização do *software oneAttension*.

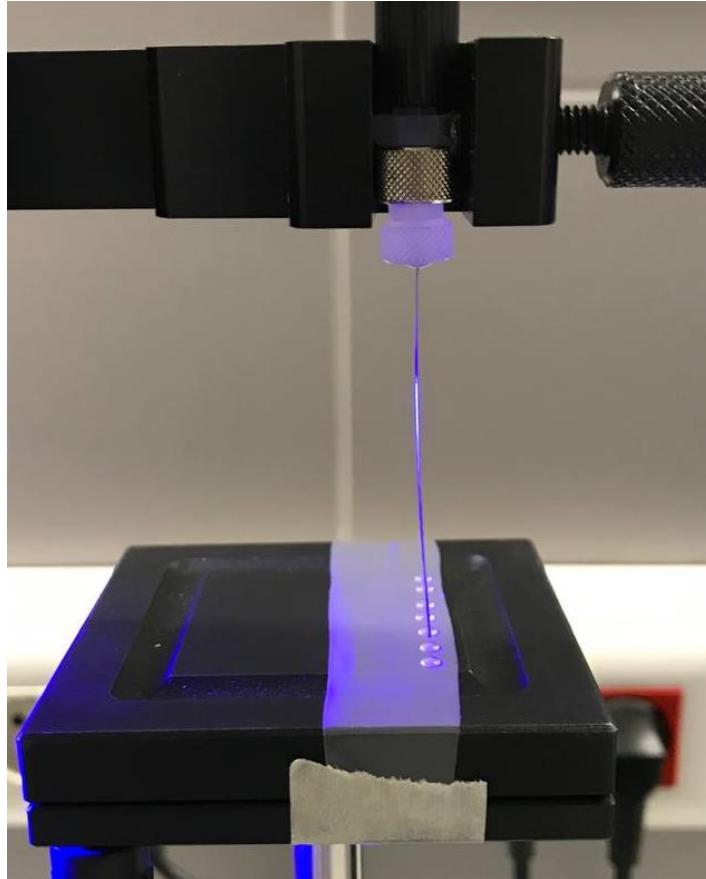


Figura 12: Processo de determinação de ângulo de contacto entre o substrato e o líquido (1).

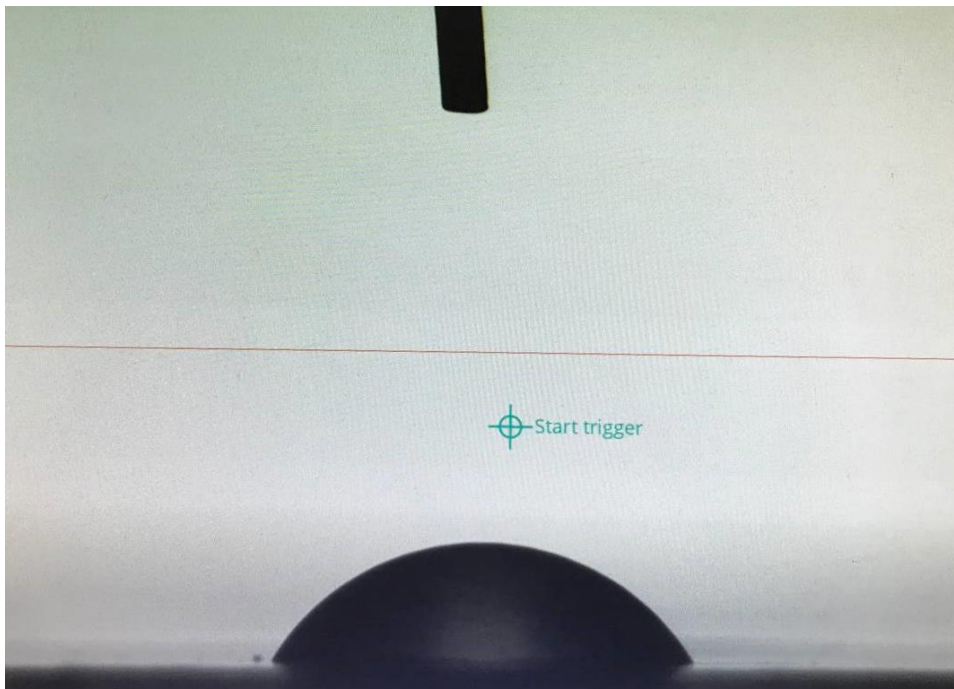


Figura 13: Processo de determinação de ângulo de contacto entre o substrato e o líquido (2).

Uma das aplicações importantes da medição do ângulo de contato é a avaliação da energia livre de superfície (SFE) da fase sólida. Neste trabalho, a SFE do substrato foi determinada tendo em consideração o modelo termodinâmico OWRK/Fowkes através da medição dos ângulos de contacto com dois líquidos: água destilada e diiodometano (DIM) para a determinação da componente polar ( $\gamma_s^p$ ) e componente dispersiva ( $\gamma_s^d$ ) da superfície do substrato. Pela soma da componente polar e da componente dispersiva, obtém-se a energia total de superfície (Subedi, 2011):

$$\gamma_l(1 + \cos\theta) = 2[(\gamma_l^d)(\gamma_s^d)]^{\frac{1}{2}} + 2[(\gamma_l^p)(\gamma_s^p)]^{\frac{1}{2}} \quad (\text{Eq. 5})$$

### 3.2.6. Microscopia Ótica

O microscópio ótico de luz transmitida *Leica DM 2500 M* foi utilizado para observar as superfícies dos revestimentos funcionais antes e depois destes serem submetidos ao ensaio mecânico de flexão com o objetivo de observar a possível degradação da superfície dos revestimentos funcionais durante o ensaio mecânico. Esta análise foi feita com software *Leica Applications* utilizando as objetivas de 5 e 10x, e ocular de 10x. Na Figura 14 está representado o equipamento utilizado para a observação da superfície dos revestimentos funcionais.



Figura 14: Microscópio Ótico de luz transmitida *Leica DM 2500 M*.



### 3.2.7. Espectrofotometria UV-Vis

Espectrofotometria UV-Vis é uma técnica analítica de caracterização largamente utilizada uma vez que é de fácil execução e de baixo custo. Esta técnica utiliza a radiação eletromagnética na gama de comprimento de onda que compreende a radiação ultravioleta e a radiação visível, para medir vários parâmetros de uma amostra como absorvância, transmitância, refletância. Essa medição tanto pode ser feita em amostras no estado líquido, ou em amostras sólidas quando é utilizada uma esfera integradora no equipamento. Neste trabalho, a caracterização das amostras líquidas e das amostras sólidas foi realizada utilizando um espectrofotômetro de UV-Vis *Lambda 35 da Perkin Elmer*. No caso das amostras líquidas, as análises basearam-se em varrimentos para determinar o pico de absorvância máxima, e posteriormente, foram realizadas leituras do valor de absorvância a um determinado comprimento de onda. No caso das amostras sólidas, a caracterização baseou-se na leitura da transmitância das mesmas num intervalo de comprimento de onda entre 700 e 400 nm, o que corresponde ao intervalo de comprimento de onda da luz visível. Para este último estudo foi utilizado um acessório de esfera integradora interna com 60 mm, da *Perkin Elmer*.

#### a) Absorvância em Soluções

No caso da aplicação da espectrofotometria para caracterizar amostras no estado líquido, esta teve o objectivo de analisar os picos de absorvância máxima do indicador sensível ao pH, o VM, e para avaliar a sua resposta à alteração dos valores de pH no meio. Para além disso, foi realizado também um estudo para aferir a possível migração do VM do revestimento funcional para um meio líquido quando em contacto com este.

#### b) Mudança de Cor do Vermelho de Metila na Presença de Diferentes Soluções Tampão

Para avaliar a mudança de cor do vermelho de metila em resposta a diferentes valores de pH do meio, foram preparadas cinco soluções tampão de citrato de sódio e ácido cítrico, com valores de pH a variar entre pH=3,4 e pH=6,2, englobando assim as diferentes formas químicas do vermelho de metila: a forma protonada e a forma desprotonada, respetivamente.

Na Tabela 7 estão representadas as soluções tampão que foram preparadas para a avaliação da resposta do indicador sensível ao pH utilizado para o desenvolvimento do

revestimento funcional. Para este fim, para cada 10 mL de solução tampão foram adicionados 0,5 mL da solução de VM 0,08 % (m/v). Depois disso, para todas as soluções, foi realizado uma análise de varrimento UV-Vis (700 a 200 nm) para medição de absorvâncias.

*Tabela 7: Soluções tampão de citrato de sódio e ácido cítrico preparadas para a avaliação da mudança de cor do VM em resposta à mudança de pH do meio.*

<b>Soluções Tampão de Citrato de Sódio</b>			
<b>pH</b>	<b>Ácido Cítrico 0,1 M (mL)</b>	<b>Citrato de Sódio 0,1 M (mL)</b>	<b>V total (mL)</b>
3,4	73	27	100
4	59	41	100
5	35	65	100
6	11,5	88,5	100
6,2	8	92	100

## ii) Avaliação da Migração do Vermelho de Metila

O objetivo principal deste ensaio foi a avaliação da migração do indicador sensível à mudança de pH do revestimento para o meio líquido, de modo a entender-se se existe alguma limitação na aplicação dos revestimentos funcionais desenvolvidos, nomeadamente, em embalagens com alimentos líquidos.

Para a avaliação da migração do VM do revestimento funcional para as soluções tampão, foi necessário estabelecer uma reta de calibração que relacionasse a concentração do VM com o valor da absorvância. Para tal, foram preparadas seis soluções de concentrações diferentes de vermelho de metila, utilizando a solução tampão com o pH=3,4 como solvente. Num meio com o valor de pH mencionado, o vermelho de metila encontra-se na sua forma protonada com uma coloração rosa-avermelhada intensa, apresentando o pico de absorvância máxima ao comprimento de onda de 522 nm. Para todas as soluções preparadas foi obtido o respetivo valor de absorvância ao comprimento de onda mencionado, o que permitiu a construção da reta de calibração necessária. Depois de definir a reta de calibração, foi efetuado o ensaio para avaliar a migração do indicador sensível ao pH.

Na Tabela 8 estão representados os diferentes revestimentos utilizados para este ensaio, assim como os diferentes tempos em que os revestimentos estiveram em meio líquido antes de se avaliar a migração do VM para as soluções tampão.

Tabela 8: Resumo do ensaio de migração do vermelho de metila nas soluções tampão.

Revestimento	Sem Termofixação	Termofixação 40 °C	Termofixação 80 °C	Tempo de contacto com as soluções tampão (min)
CHT/VM	×	V	V	1
CHT/VM Termofixação	V	×	×	
CHT/VM→CHT	×	V	V	
CHT/VM→CHT Termofixação	V	×	×	
CHT/VM	×	V	V	30
CHT/VM Prensa	V	×	×	
CHT/VM→CHT	×	V	V	
CHT/VM→CHT Prensa	V	×	×	

Para a realização deste ensaio, para cada revestimento foram preparadas amostras de tamanho 1,5×1,5 cm, e essas amostras foram colocadas num frasco de vidro de 20 mL contendo 10 mL de solução tampão. Depois de revestimento permanecer um tempo previamente estabelecido em solução tampão (1 ou 30 min), este foi retirado, e o líquido foi analisado de modo a realizar a leitura da absorvância deste a 522 nm. Assim, esse valor de absorvância foi utilizado para determinar a concentração do VM através da reta de calibração previamente estabelecida.

### c) Colorimetria dos Revestimentos

A avaliação do desempenho do revestimento funcional desenvolvido foi realizada em duas partes. Inicialmente, testou-se a resposta do revestimento funcional num ambiente de atmosfera modificada, sendo que para este fim foi utilizada a solução de amónia. Em atmosfera modificada foram testados vários parâmetros do revestimento desenvolvido, como eficiência da mudança de cor dos revestimentos funcionais de uma e de duas camadas quando expostos a diferentes concentrações de amónia, e também a evolução da cor ao longo do tempo. Todos os cálculos de mudança de cor total foram feitos de acordo com o modelo mais atual CIEDE2000.

Após os ensaios *in vitro*, realizaram-se testes para a avaliação do desempenho do revestimento funcional desenvolvido na presença de um alimento real. Durante este ensaio *in situ*, foi testada a eficiência dos revestimentos e foi avaliado o desempenho dos mesmos ao longo do tempo.

## i) Ensaio *In Vitro*

Para avaliar a sensibilidade dos revestimentos colorimétricos desenvolvidos quando submetidos a uma atmosfera modificada através da presença de diferentes concentrações de amónia, foi realizado o seguinte ensaio: pequenas amostras dos revestimentos, de um tamanho de 3×5 cm foram colocadas em frascos de 50 mL, onde foram também adicionados 250 µL de soluções de amónia com diferentes concentrações.. As concentrações de amónia testadas foram: 0,52 mol/L e 2,64 mol/L. Depois de colocar a amónia nos frascos, estes foram tapados com a tampa e selados com o parafilme. As leituras de transmitância foram feitas para cinco tempos diferentes: 0, 5, 30, 90 e 180 min. Depois de recolher todas as leituras da transmitância foi efetuado o cálculo de mudança de cor total.

Para além da sensibilidade do revestimento foi avaliada também a reversibilidade da cor na ausência de amónia. Para tal, inicialmente os revestimentos funcionais preparados foram submetidos à presença de 250 µL de duas concentrações de amónia, 0,52 mol/L e 2,64 mol/L, e passando os 180 minutos foi feita a leitura de transmitância, o que permitiu calcular a diferença de cor total dos revestimentos causada pelos 180 min na presença de amónia. Depois disso, os revestimentos foram retirados da atmosfera modificada e foram colocados em frascos sem amónia, onde permaneceram durante 6 dias. Após este tempo, foi realizada a leitura da transmitância dos revestimentos e foi calculada de novo a diferença de cor total. Na Figura 15 encontra-se uma representação esquemática do ensaio de reversibilidade da cor dos revestimentos funcionais na ausência de amónia.

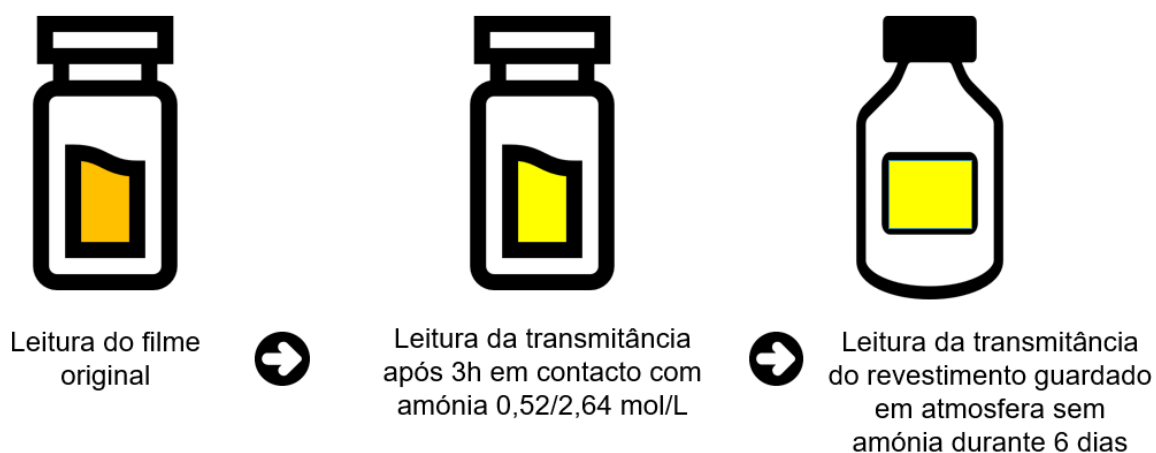


Figura 15: Representação esquemática do ensaio de reversibilidade da cor na ausência da atmosfera de amónia

## ii) Ensaios *In Situ*

Durante os ensaios *in situ*, os revestimentos funcionais desenvolvidos foram testados na presença de camarão cozido. Para estes ensaios, foi escolhido utilizar camarão. O primeiro ensaio *in situ* baseou-se na avaliação da mudança de cor total dos revestimentos na presença de alimento fresco enquanto o alimento estava guardado a 22 °C e 4 °C (temperatura ambiente e temperatura do frigorífico). Para fazer esta avaliação, os revestimentos foram colocados em frascos na presença do produto fresco e foi avaliada a mudança de cor total dos revestimentos ao longo das 39 horas. Durante este ensaio foi testada a resposta do revestimento de uma camada só.

Durante o outro ensaio *in situ*, foi avaliada a resposta do revestimento funcional, de uma e de duas camadas, à deterioração do alimento escolhido ao longo do tempo. Para isso os revestimentos foram colocados em frascos de 50 mL, onde também foram colocadas amostras de alimento previamente escolhido. Todos os frascos foram tapados e selados com o parafilme. Foi feita a avaliação de colorimetria dos revestimentos 6 vezes, para tempos de ensaio de 0, 3, 20, 27, 49 e 79 h. Com base nas leituras de transmitância foi calculada a diferença de cor total ao longo da deterioração do produto alimentar. Este ensaio decorreu a uma temperatura de 4 °C e foi testado revestimento funcional desenvolvido de uma camada e também de duas camadas.

## 4. Apresentação de Resultados e Discussão

O objetivo principal deste trabalho passa pelo desenvolvimento de um revestimento sensível à mudança de pH que ocorre naturalmente durante a deterioração de alguns alimentos perecíveis, enquanto inserido numa embalagem alimentar. Para o desenvolvimento do revestimento funcional foi utilizado um substrato polimérico usualmente utilizado em embalagens alimentares e para o revestimento à base de biopolímeros foram utilizados dois tipos de polímeros, CHT e CMC. Como indicador sensível à mudança de pH incorporado na matriz polimérica do revestimento foi utilizado o vermelho de metila. Para o desenvolvimento dos revestimentos foram exploradas duas abordagens, sendo que a primeira passou pela adição de surfactantes às formulações à base de CHT ou de CMC para diminuir a tensão superficial e permitir uma melhor adesão entre o revestimento e o substrato. Enquanto na segunda abordagem foram testadas várias condições de pré-tratamento por plasma ao substrato, em que se variou a potência de descarga elétrica de modo a aumentar a molhabilidade deste do substrato, tendo sido selecionada a condição mais adequada o substrato utilizado.

Durante este trabalho, para além do desenvolvimento do revestimento, também foi efetuada a caracterização físico-química e a avaliação da resposta colorimétrica do revestimento. Desta forma, neste capítulo vão ser apresentados e discutidos todos os resultados obtidos tanto durante a caracterização dos revestimentos, assim como durante a avaliação da resposta colorimétrica do revestimento, tanto *in vitro* como *in situ*.

### 4.1. Condições de Revestimentos Selecionados

Para a escolha do revestimento foram testadas várias condições com adição de surfactantes diferentes em diferentes percentagens, e no sentido de melhorar a plasticidade do revestimento também foi testado a adição o glicerol. Desta forma, da abordagem que tinha como objetivo o melhoramento da formulação, houve duas formulações que se mostraram promissoras.

Na Tabela 9 estão representadas as duas formulações que se mostraram promissoras - ambas as formulações são à base de CMC, sendo que a primeira apresenta na sua constituição o surfactante Tween® 80 numa percentagem 5% v/v, e a segunda apresenta na sua matriz polimérica o mesmo surfactante na mesma percentagem e também glicerol numa percentagem igual a 0,5% v/v. Ambos os revestimentos secaram após 15 horas na estufa a 40 °C.

Tabela 9: Formulações promissoras obtidas através do melhoramento da formulação do biopolímero.

Polímero	% Inicial (w/v)	Surfactante (v/v)	Glicerol (v/v)
CMC	4%	Tween® 80 (5%)	0%
			0,5%

Na Figura 16 estão representadas imagens dos revestimentos promissores obtidos por meio da adição de surfactante e glicerol. Nessa figura, do lado esquerdo, encontra-se representada a formulação à base de CMC 4% (w/v) + Tween® 80 5% (v/v), enquanto do lado direito da imagem encontra-se representada a imagem da formulação à base de CMC 4% (w/v) + Tween® 80 5% (v/v) + Glicerol 0,5% (v/v). Tal como dá para constatar através da imagem, a formulação que apresenta na sua constituição glicerol apresenta uma aparência mais lisa e visualmente apresenta uma melhor aderência ao substrato utilizado.



Figura 16: Representação de dois revestimentos promissores à base de CMC.

No caso da estratégia onde se utilizou o plasma atmosférico para o pré-tratamento da superfície do substrato para tornar a superfície do mesmo mais hidrofílica também foram testadas várias condições. O gás utilizado (ar) no pré- tratamento por plasma e a velocidade de rotação do rolo (7,7 m/min) foram sempre constantes, tendo sido variada a potência da

descarga. Assim sendo, foram testadas quatro potências, nomeadamente 40%, 50%, 70% e 90% da potência máxima (aproximadamente 15 kW). De modo, a avaliar as alterações na superfície do substrato após o pré-tratamento por plasma, procedeu-se à medição dos ângulos de contacto para a água. No caso das amostras tratadas com uma potência de superior a 50%, observou-se a olho nu a danificação da superfície do substrato, pelo que decidiu-se testar duas potências mais baixas: a de 40% e a de 50% e comparar os ângulos de contacto do revestimento tratado com essas potências do plasma e comparar os mesmos com a amostra controlo, que neste caso era o substrato sem ser submetido a qualquer tipo de tratamento.

Na Figura 17 estão representadas três medições diferentes de ângulos de contacto, sendo que a primeira medição foi feita para o substrato sem ser tratado com o plasma, o que permitiu ter uma ideia de valores de ângulos de contacto para o substrato a ser utilizado. Para além disso, foram avaliados os ângulos de contacto das superfícies dos substratos tratados com o plasma a 40% e com o plasma a 50%. É de notar, que no caso da amostra controlo, substrato que não foi tratado com o plasma, o valor de ângulo de contacto em média é de  $92^{\circ}$  o que indica que o substrato sem o tratamento é hidrofóbico, enquanto para as amostras tratadas com o plasma a 40% e com o plasma a 50%, os valores de ângulo de contacto desceram para  $59^{\circ}$  e  $60^{\circ}$ , respetivamente.

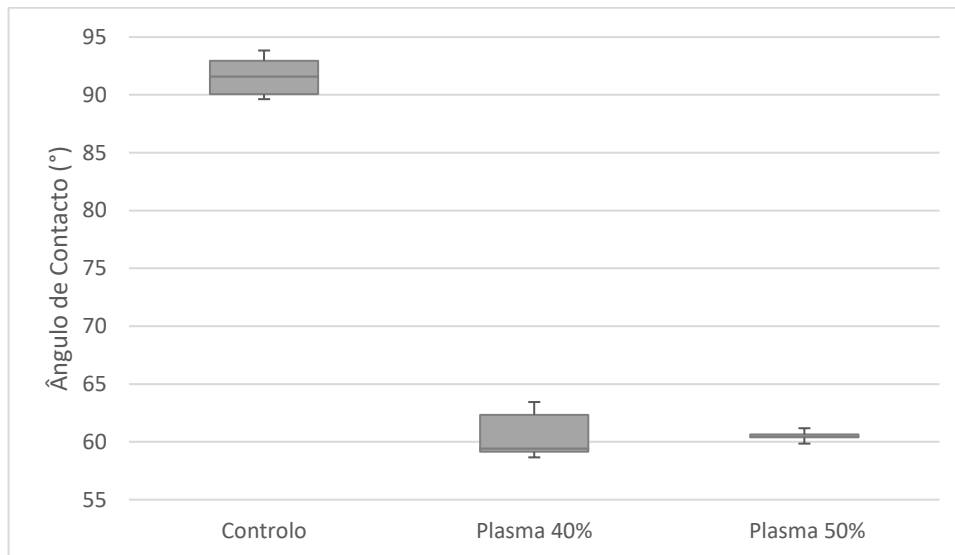


Figura 17: Medição de ângulo de contacto da água para as amostras pré- tratadas com o plasma a 40% e com o plasma a 50% e da amostra controlo (sem pré-tratamento).

Depois da avaliação dos ângulos de contacto, passou-se para a avaliação da energia da superfície do substrato não tratado com o plasma e dos substratos tratados com o plasma. A energia de superfície do substrato foi determinada através do cálculo das componentes polar e dispersivas utilizando o modelo termodinâmico OWRK/Fowkes.



Observando a Figura 18 onde está representada a variação da energia de superfície do substrato em função da variação da potência do plasma, pode-se concluir que a energia de superfície aumenta quando se aplica ao substrato o pré-tratamento com o plasma, no entanto, a variação da energia de superfície em função da variação de potência utilizada do plasma é muito baixa. Desta forma, a energia de superfície para a amostra controlo é de aproximadamente 36 mN/m, enquanto no caso das amostras tratadas com o plasma a 40% e a 50% este valor aumenta para 49 mN/m e 50 mN/m, respetivamente. Também é de notar que a maior parte da energia de superfície calculada deve-se à componente dispersiva. Os materiais que apresentam valores de energia de superfície abaixo dos 36 mN/m são considerados materiais de baixa energia superficial e apresentam molhabilidade baixa, assim como o substrato utilizado durante este estudo. Na Figura 18 também é notável que no caso dos substratos tratados com o plasma ocorre um aumento da componente polar e, assim sendo, aumenta a molhabilidade do substrato utilizado durante o desenvolvimento e os biopolímeros utilizados que são de base aquosa.

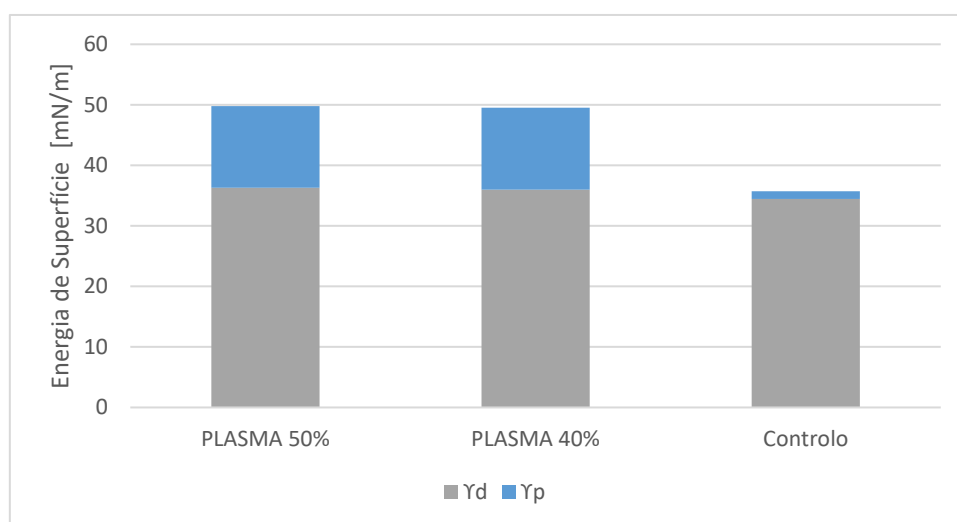


Figura 18: Energia de superfície das amostras tratadas com o plasma e da amostra controlo.

Depois da caracterização por ângulo de contacto e da determinação energia da superfície, foi possível optar por duas condições promissoras, que corresponde ao substrato pré-tratado com o plasma a 40% com a aplicação de CMC e de CHT. Após a escolha dos revestimentos mais promissores avançou-se para a caracterização da solubilidade em água dos revestimentos, caracterização físico-química e para a caracterização da resposta colorimétrica dos revestimentos funcionais desenvolvidos.

## 4.2. Estudo da Solubilidade

Para o estudo da solubilidade em água dos revestimentos promissores utilizou-se o método do cálculo da diferença do peso de uma amostra antes de passar 24 horas no banho e depois. Os revestimentos escolhidos para este ensaio foram:

- CMC 4%(v/v) + Tween® 80 5% (v/v) + Glicerol 0,5% (v/v);
- CMC + Plasma 40%;
- CHT + Plasma 40%.

Na Figura 19 estão representados os valores de solubilidade em água dos diferentes revestimentos promissores e os respetivos desvios padrão. Avaliando este gráfico é possível concluir que o revestimento aplicado no substrato que não foi sujeito ao pré-tratamento por plasma, CMC + Tween 80 + Glicerol, apresenta um maior valor de solubilidade que corresponde a aproximadamente 33%. Por um lado, isto deve-se ao facto da CMC ser solúvel em água, mas por outro lado, a solubilidade em água para esse revestimento é mais elevada comparando esses valores com os do revestimento de CMC aplicado em substrato submetido ao pré-tratamento com o plasma, uma vez que essa formulação para além de CMC contém também glicerol que é solúvel em água, aumentando, assim, a solubilidade do revestimento em geral.

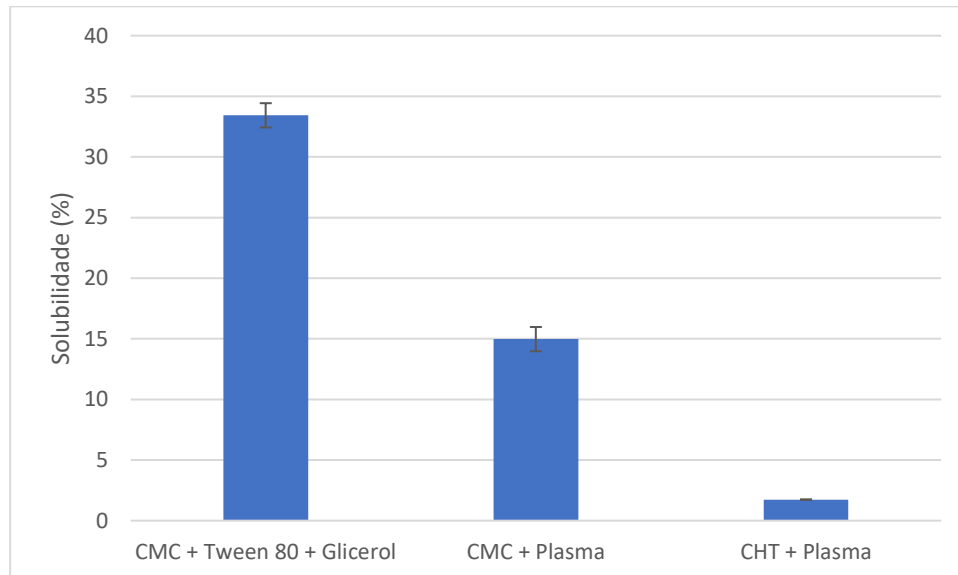


Figura 19: Valores de solubilidade em água para revestimentos promissores.

Por outro lado, depois de avaliar os valores de solubilidade em água, pode-se concluir, que os revestimentos à base de CHT são menos solúveis apresentando um valor de solubilidade de 2%, enquanto para os revestimentos à base de CMC aplicados em substratos tratados com o plasma o valor da solubilidade em água é de 15%. Esta diferença pode ser justificada pela preparação do biopolímero, uma vez que a CMC é solúvel em água, e o CHT é dissolvido em ácido acético 1%. Desta forma, quando esses dois revestimentos foram

submetidos ao ensaio de solubilidade em água era expectável que o revestimento de CMC apresentasse valores de solubilidade em água mais elevados, comparando com os de revestimentos de CHT. Assim sendo, os revestimentos à base de CHT apresentam um maior interesse para serem aplicados em embalagens alimentares, uma vez que numa embalagem alimentar pode ocorrer condensação dos líquidos no seu interior e é de elevada importância que o revestimento funcional que seja utilizado nas embalagens alimentares apresente valores de solubilidade em água muito reduzidos para, por um lado, não comprometer a qualidade ou (e) segurança do produto alimentar embalado, e por outro lado para não danificar o revestimento funcional desenvolvido e para não comprometer a resposta do mesmo.

### 4.3. Estudo das Propriedades Físico-Químicas do Revestimento

Durante os estudos anteriores foi possível concluir, que o revestimento mais adequado para conseguir atingir a meta estabelecida é o revestimento de CHT devido às suas características de baixa solubilidade, comparando com o outro biopolímero testado. Tendo também em conta o estudo dos ângulos de contacto do polímero pré-tratado com o plasma conclui-se que a condição ideal para avançar para a incorporação do vermelho de metila e para futuros testes é: substrato pré-tratado com plasma (tratamento com ar, 40% da potência máxima) e revestimento funcional de CHT a 3% (m/v).

Para a incorporação do vermelho de metila foi preparada previamente uma solução do mesmo numa concentração 0,08% (m/v) em etanol a 80% (v/v). A incorporação do VM foi feita acrescentando diretamente a solução de VM ao biopolímero escolhido, seguido de uma mistura dos dois. Depois de preparação do revestimento funcional esse foi guardado num frasco de plástico tapado ao abrigo da luz.

No sentido de uma melhor proteção da camada funcional do revestimento surgiu a abordagem de aplicação de uma camada de CHT por cima do revestimento funcionalizado seco. Desta forma, nos ensaios seguintes para além do revestimento de CHT de uma só camada foi também testado o revestimento de duas camadas (camada de CHT funcionalizada + camada de CHT).

#### 4.3.1. FTIR-ATR

Para uma análise química do revestimento e de todos os constituintes do mesmo, foi utilizada a técnica de análise de espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier com reflectância total atenuada sendo que o objetivo principal da utilização desta técnica foi

estudar os grupos funcionais de todos os constituintes do revestimento funcional e avaliar se o biopolímero escolhido para o revestimento cobria de uma forma uniforme a superfície do substrato.

Na Figura 20 estão representados os dados obtidos durante a análise FTIR. As amostras Substrato + CHT + VM e Substrato + CHT partilham as mesmas bandas funcionais, pelo que apresentam as mesmas frequências de vibração. Para além disso, a amostra Substrato + CHT apresenta picos característicos de HDPE, que se encontra entre os valores de comprimento de onda a variar entre  $2950\text{ cm}^{-1}$  e  $2850\text{ cm}^{-1}$ . No caso da amostra com o revestimento funcional esses picos já não são tao nítidos.

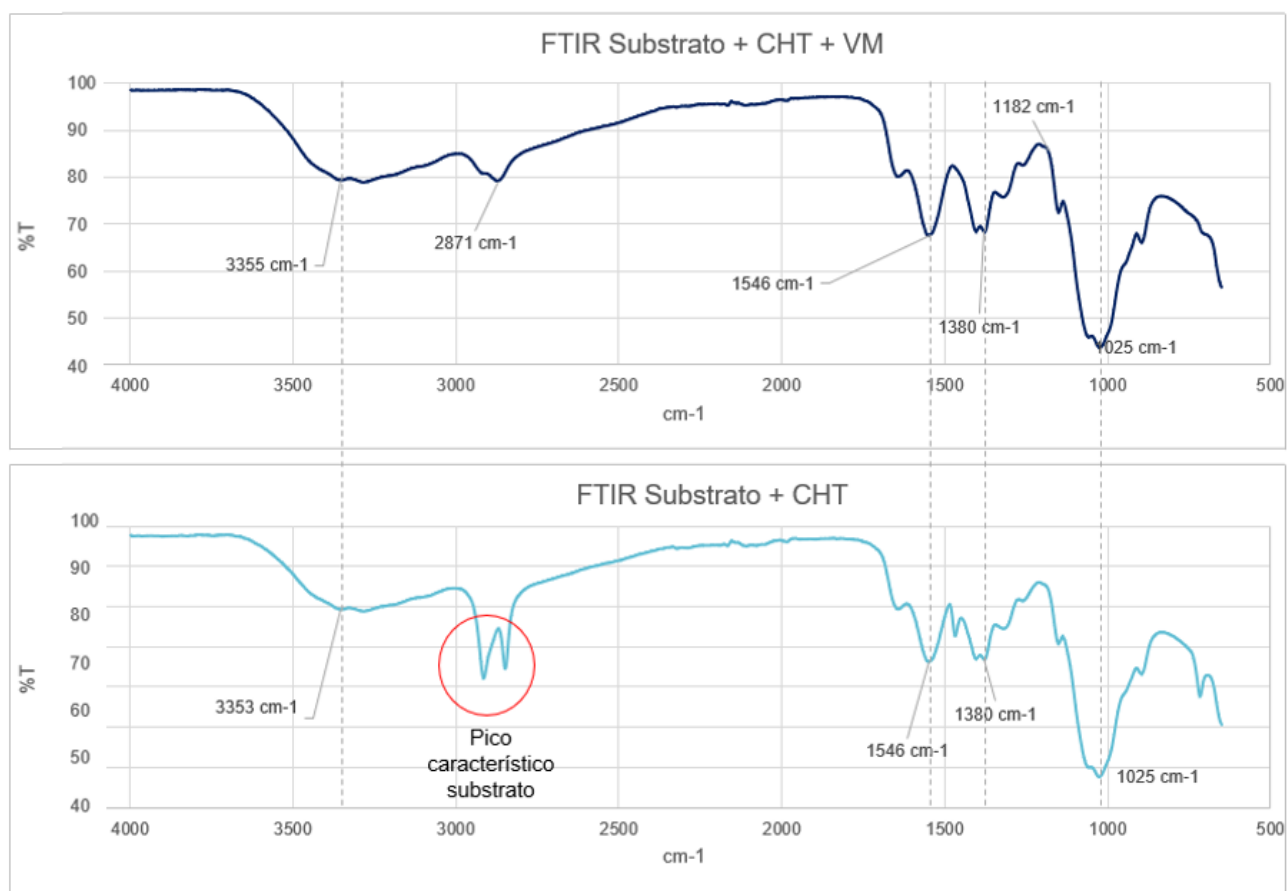


Figura 20: Representação gráfica FTIR do substrato revestido com CHT e do substrato revestido com CHT+VM.

Essas duas amostras partilham as mesmas bandas de absorvância para um comprimento de onda igual a  $3355\text{ cm}^{-1}$ ,  $1380\text{ cm}^{-1}$  e  $1025\text{ cm}^{-1}$  que correspondem aos grupos funcionais O-H, C-H (grupo metilo) e C-N, respetivamente. Essas bandas de absorvância são características de CHT, pelo que aparecem em ambas as amostras, uma vez que o substrato está revestido com o CHT.

### 4.3.2. Ensaio Mecânico por Flexão

Um outro ensaio a que foram submetidas as amostras selecionadas durante estudos anteriores, nomeadamente revestimento de uma camada de CHT e revestimento de duas camadas, foi um ensaio mecânico por flexão, que foi adotado da norma ISO 7854: 1995 - *Rubber- or plastics-coated fabrics — Determination of resistance to damage by flexing*. Durante este ensaio foi aplicada uma força mecânica às amostras, sendo que no fim deste ensaio as amostras foram submetidas a dois outros ensaios: análise de ângulos de contacto e observação da superfície das amostras utilizadas com auxílio do microscópio ótico. Este conjunto de ensaios permitiu analisar as amostras selecionadas a nível de aderência do revestimento ao substrato utilizado nas condições pré-definidas. Durante este ensaio foram analisados 4 tipos de revestimentos diferentes: revestimentos de uma só camada (sem a incorporação e com a incorporação do VM) e amostras de duas camadas (sem a incorporação e com a incorporação do VM na primeira camada do revestimento).

#### a) Medição dos Ângulos de Contacto

Depois de submeter as amostras ao ensaio por flexão o primeiro parâmetro que foi avaliado foi o ângulo de contacto. Os valores de ângulo de contacto calculados com a água foram comparados entre as amostras que foram submetidas ao ensaio mecânico (com EM) e as amostras que não foram submetidas ao ensaio mecânico (sem EM). A avaliação de ângulo de contacto ajudou a perceber se houve degradação mecânica do revestimento e da adesão do mesmo ao substrato durante o ensaio mecânico nas condições estabelecidas.

Na Figura 21 estão representados os valores obtidos na avaliação dos ângulos de contacto das amostras submetidas ao ensaio mecânico (EM) e a comparação dos mesmos com as amostras controlo. No caso das amostras de uma camada, os valores de ângulos de contacto das amostras que não foram submetidas ao ensaio mecânico, amostras controlo, rondam  $91^{\circ}$  e  $92^{\circ}$  para os revestimentos sem incorporação do VM e com a incorporação do agente sensível ao pH, respetivamente. No caso das amostras que foram submetidas ao ensaio mecânico, os valores de ângulos de contacto rondam os  $92^{\circ}$ , tanto para as amostras sem a incorporação do VM como para as amostras com a incorporação do VM. Já no caso das amostras de duas camadas, os ângulos de contacto foram de aproximadamente  $89^{\circ}$  no caso

da amostra sem a incorporação do VM, e de 87° no caso da amostra com a incorporação do VM.

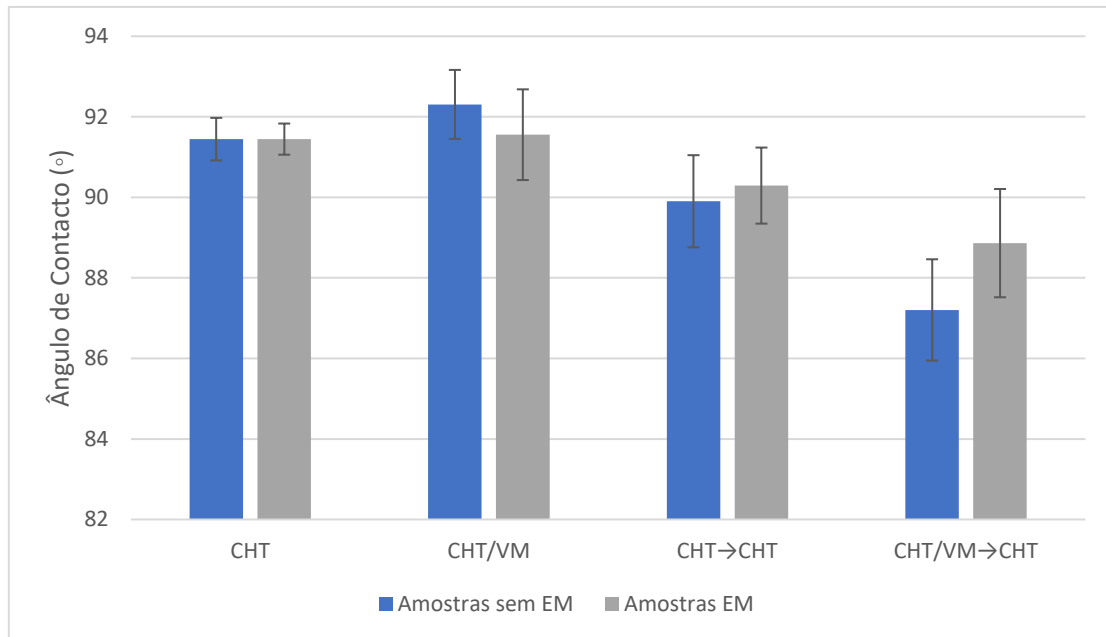


Figura 21: Medição dos ângulos de contacto das amostras submetidas ao ensaio mecânico por flexão.

Através da Figura 21 também é possível constatar que não existe uma diferença considerável entre os valores dos ângulos de contacto das amostras sem EM e das amostras após serem submetidas ao ensaio mecânico por flexão, o que significa que não houve alterações detetáveis na superfície do revestimento. Desta forma é possível concluir que existe adesão entre os revestimentos e o substrato e que as condições do ensaio mecânico empregues nas amostras não tiveram um impacto detetável nessa adesão.

## b) Microscópia Ótica

Depois da análise dos ângulos de contacto das amostras submetidas aos ensaios mecânicos, as mesmas amostras foram analisadas a nível de microscopia ótica para verificar se houve deformação visível da adesão do revestimento ao substrato, comparando com as amostras controlo.

Na Figura 22 e na Figura 23 estão representadas duas amostras de uma só camada, sendo que a amostra da Figura 22 foi submetida ao ensaio mecânico e a amostra da Figura 23 não foi submetida a qualquer força mecânica. Ao analisar essas duas amostras, pode-se concluir que tanto a amostra que foi submetida ao ensaio mecânico, assim como amostra que não foi submetida ao ensaio mecânico apresentam alguns riscos na superfície, pelo que não se pode concluir que o risco que se apresenta na superfície da amostra que foi submetida ao ensaio mecânico deve-se à força aplicada à amostra durante o ensaio.



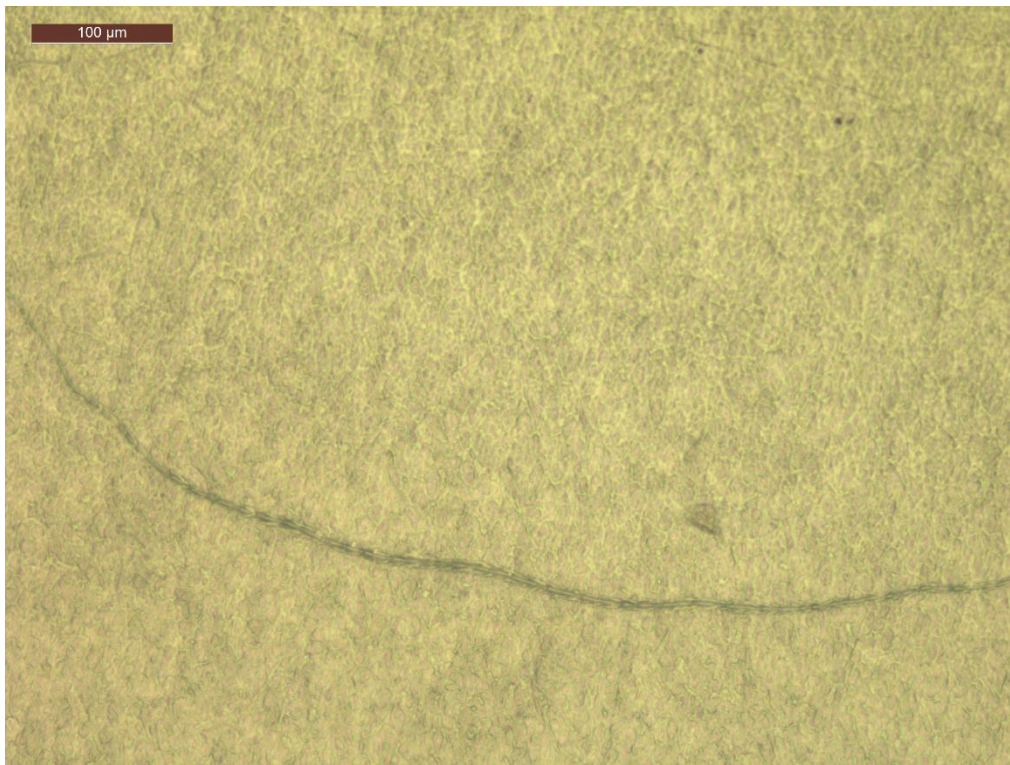


Figura 22: Amostra de revestimento de CHT de uma só camada com EM.

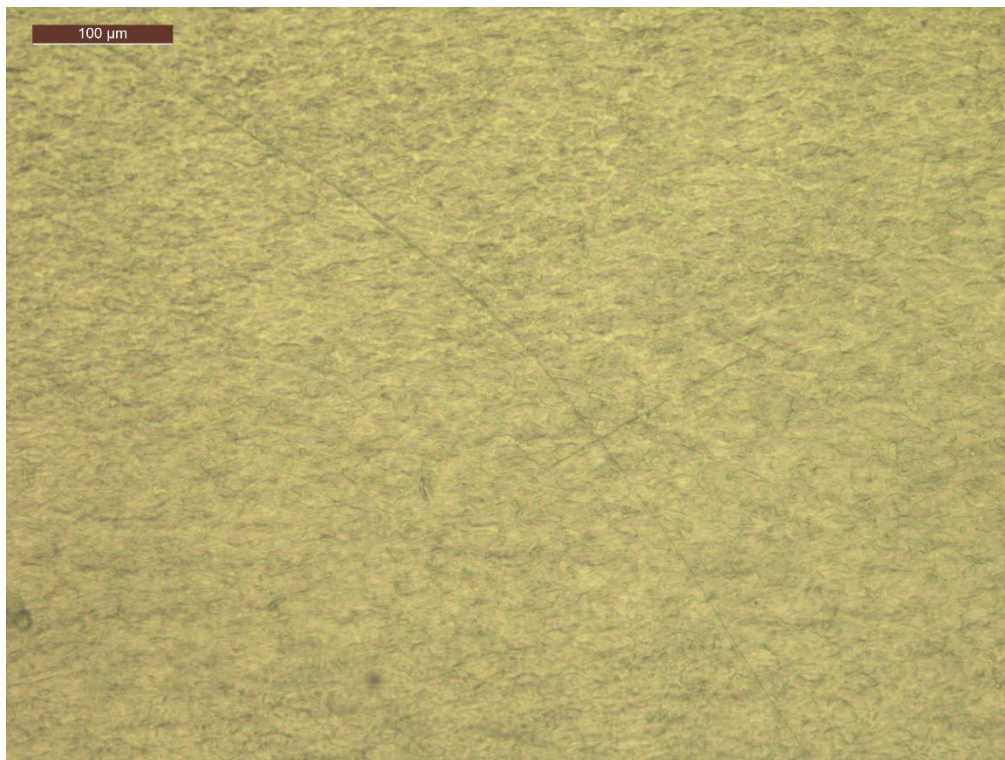
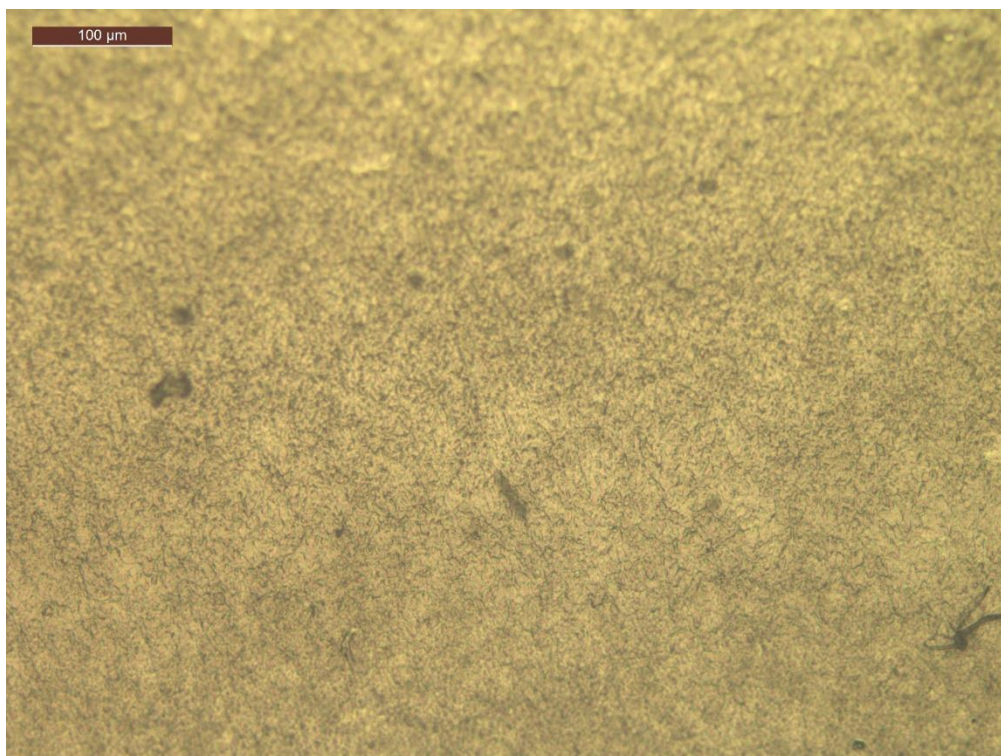


Figura 23: Amostra de revestimento de CHT de uma só camada sem EM.

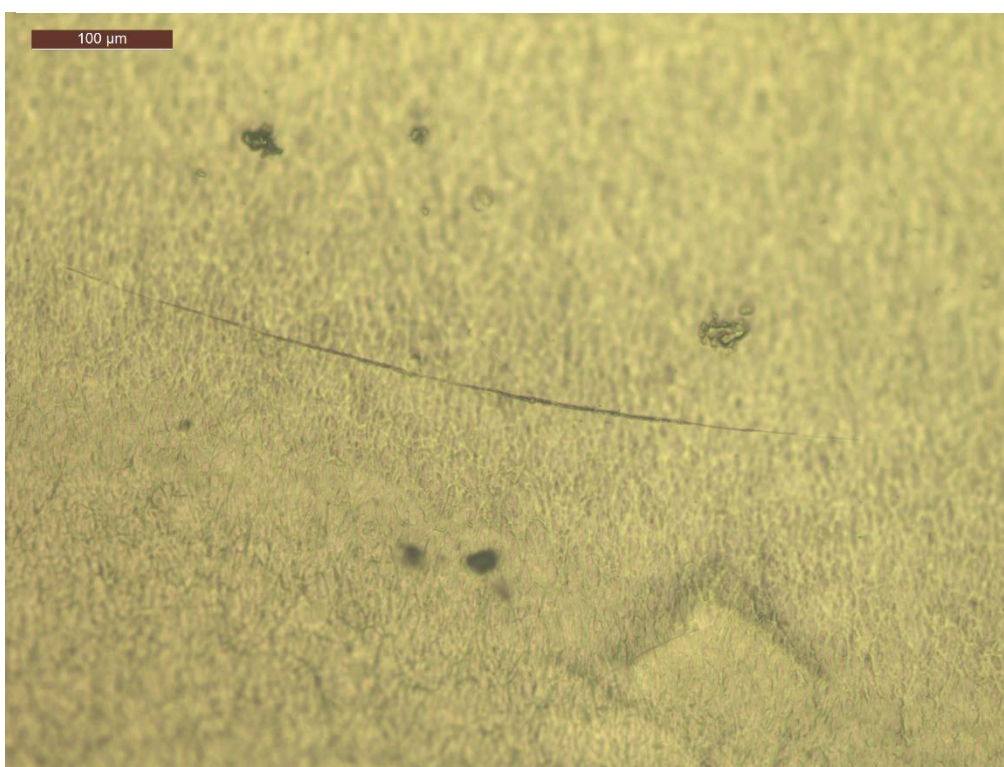
No caso da Figura 24 e Figura 25, onde estão representados os revestimentos de duas camadas, amostra com EM e amostra sem EM, pode-se observar que a amostra submetida ao ensaio mecânico não apresenta degradações visíveis nas condições escolhidas para a observação da amostra ao microscópio óptico, o que pode indicar que não houve degradação mecânica do revestimento nas condições do ensaio mecânico estabelecidas, pelo que não



houve degradação da aderência entre o revestimento de CHT e o substrato em que o mesmo foi aplicado.



*Figura 24: Amostra de revestimento de CHT de duas camadas com EM.*



*Figura 25: Amostra de revestimento de CHT de duas camadas sem EM.*



## 4.4. Estudo da Eficiência de Resposta do Revestimento à Mudança de pH

Com o objetivo de validação da eficiência da resposta do revestimento funcional desenvolvido à mudança de pH, este foi testado em diferentes condições, sendo que tanto foram feitos testes *in vitro* como *in situ*. O revestimento funcional desenvolvido foi testado para potencial utilização em alimentos líquidos e também nas embalagens de alimentos sólidos.

### 4.4.1. Estudo da Eficiência de Resposta do Revestimento em Meio Líquido.

No caso da aplicação do revestimento funcional em alimentos líquidos foi testada a resposta do mesmo em função da alteração do valor de pH. Durante este ensaio as amostras de revestimento funcional foram colocadas nas soluções tampão e foi observada a mudança da cor em função de pH. Para além das amostras de uma e de duas camadas também foram testadas amostras que foram submetidas previamente a um processo de termofixação no sentido da melhor retenção do VM na matriz polimérica do revestimento funcional.

Na Figura 26 esta representadas a mudança de cor do revestimento funcional quando submetido a soluções tampão com diferentes valores de pH. No caso da Figura 26 está representado o exemplo em que as amostras controlo de uma e de duas camadas foram comparadas com amostras de uma e de duas camadas que foram submetidas ao ensaio de termofixação, a uma temperatura igual a 40 °C, durante 1 minuto com a pressão igual a 6 bar. Na Figura 26 abaixo representada pode-se verificar que de facto existe uma mudança visível na cor entre a amostra controlo e as amostras que foram imersas em soluções tampão, no entanto, para além dessa mudança de cor também foi observada a migração da cor dos revestimentos funcionais para as soluções tampão.

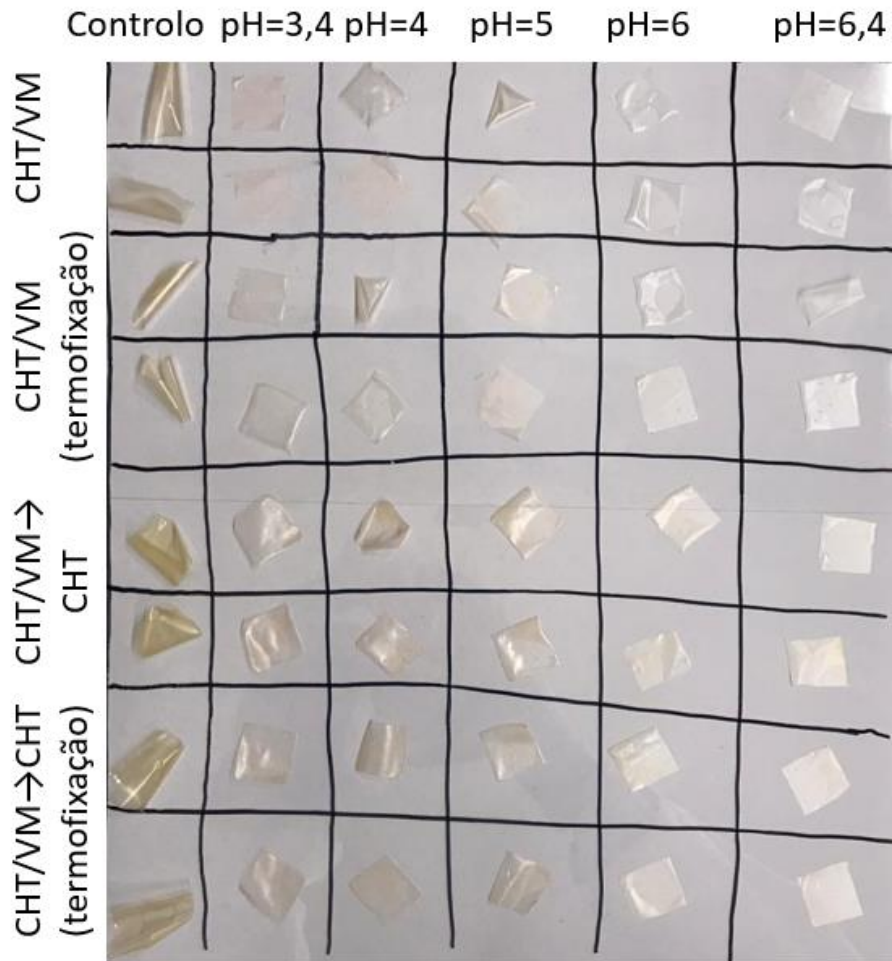


Figura 26: Mudança de cor do revestimento funcional em função da mudança de pH.

Na Figura 27 estão representadas as soluções tampão nas quais foram imersas amostras de revestimento funcional de CHT durante um certo período de tempo. É possível verificar, que existe a migração do agente sensível à alteração do pH do revestimento funcional para a solução tampão. No sentido de quantificar essa migração foi efetuado o ensaio de quantificação da migração do VM para as soluções tampão.

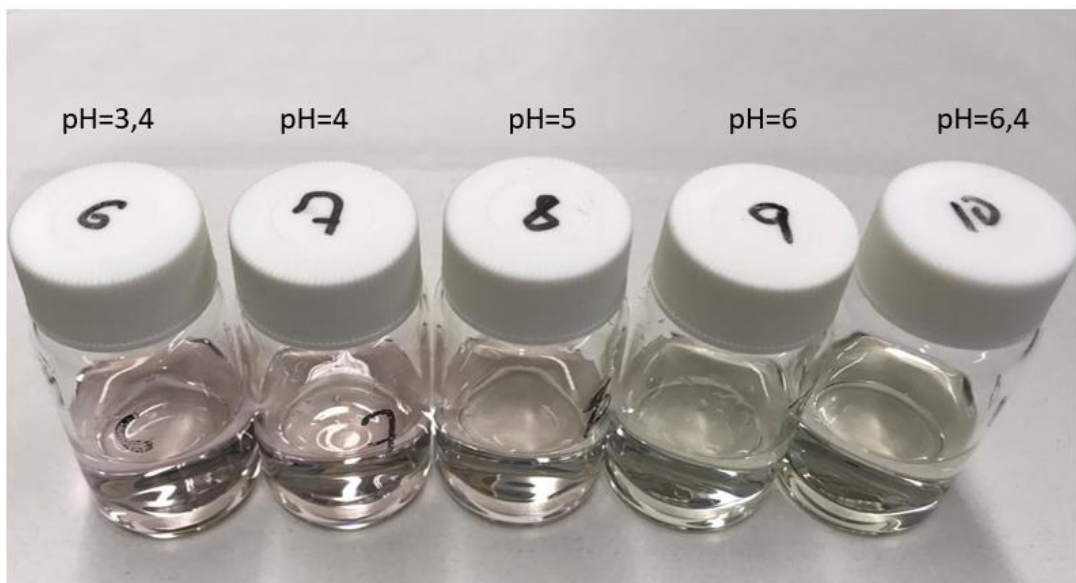


Figura 27: Mudança visual da cor das soluções tampão durante o teste dos revestimentos funcional em soluções tampão com diferentes valores de pH.

#### a) Migração do Vermelho de Metila para as Soluções Tampão

Durante este ensaio foi avaliada a migração do VM quando os revestimentos funcionais estão inseridos em meio líquido. Para além disso, foi e quantificada a quantidade do VM que migra para o líquido com o auxílio da reta de calibração previamente estabelecida.

Na Figura 28 estão representados os valores de migração do VM dos revestimentos funcional para as soluções tampão. Ao observar a Figura acima representada pode-se concluir, que de facto, o agente sensível à mudança de pH migra para as soluções tampão, sendo que a concentração do VM aumenta com o tempo que o revestimento permanece em contacto com o líquido. Também é de notar, que os revestimentos que foram submetidos à termofixação para melhorar a retenção do VM na matriz polimérica não apresentaram melhorias significativas nos valores de migração do VM para o líquido.

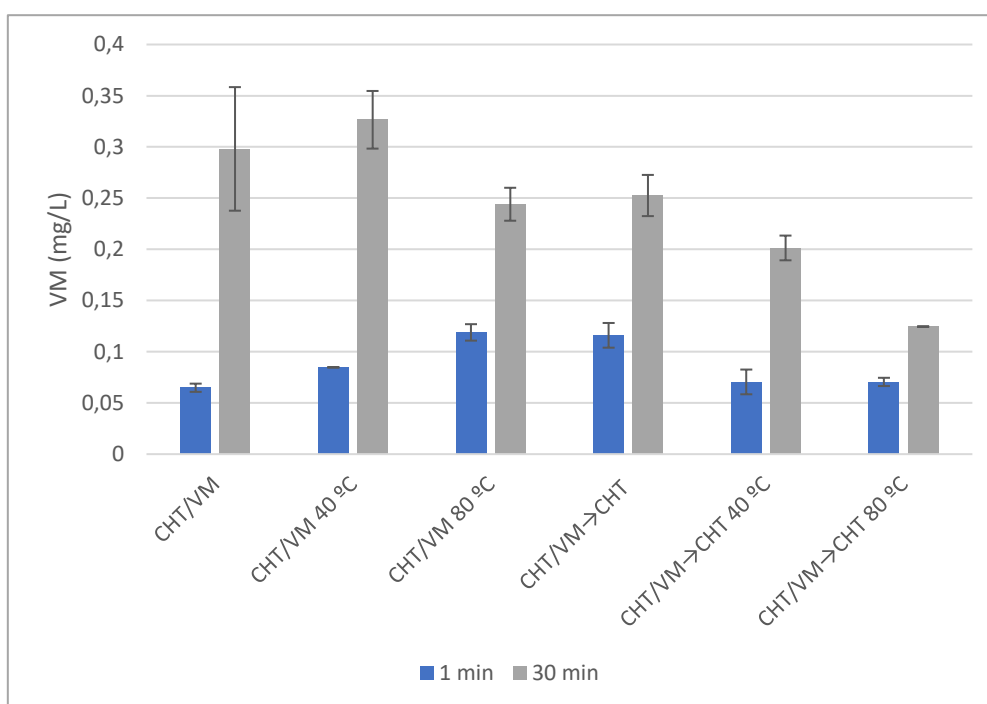


Figura 28: Avaliação da migração do VM dos revestimentos funcional para as soluções tampão.

#### 4.4.2. Estudo da Resposta dos Revestimentos Funcionais em Meio Atmosférico

Uma vez que os resultados obtidos durante a avaliação da migração do VM para o meio líquido não foram satisfatórios, optou-se por testar os revestimentos funcionais desenvolvidos em meio atmosférico. Os ensaios de colorimetria foram efetuados inicialmente para a avaliação do funcionamento do revestimento funcional *in vitro*, com o revestimento inserido numa atmosfera de amónia. A amónia foi escolhida com o agente para a alteração do pH durante a simulação de deterioração do alimento *in vitro*, uma vez que nos processos da

deterioração dos produtos de pesca são libertadas aminas voláteis como resposta a processos metabólicos que ocorrem no produto fresco durante a deterioração dos mesmos. Essa libertação da amónia vai ter impacto no valor de pH da atmosfera da embalagem, sendo que esse vai aumentando. A utilização da amónia durante os ensaios *in vitro* ajuda a simular a libertação de aminas voláteis, uma vez que apresentam estruturas semelhantes e também vai resultar no aumento do pH da atmosfera da embalagem.

Depois dos ensaios *in vitro*, avançou-se para os ensaios *in situ*, com o alimento previamente escolhido, para validar que o revestimento funcional muda de cor em resposta à deterioração do mesmo.

#### a) Estudo da Sensibilidade do Revestimento Funcional

Inicialmente foi avaliada a mudança de cor do revestimento funcional de uma e de duas camadas ao longo do tempo. Durante este ensaio foram testados dois tipos de revestimentos funcionais: revestimento de uma camada e o de duas camadas. Essa avaliação foi feita utilizando diferentes concentrações de amónia: 0,52 mol/L e 2,64 mol/L, sendo que as leituras de colorimetria foram feitas para 0 minutos de exposição a atmosfera de amónia, o que corresponde à amostra controlo, 5 minutos de exposição à atmosfera modificada, 30 minutos, 90 minutos e 180 minutos.

Ao analisar a Figura 29, onde está representada a variação da cor do revestimento de uma camada ao longo do tempo na presença de duas concentrações de amónia diferentes, pode-se concluir, que de facto o revestimento desenvolvido é sensível à mudança de pH. Sendo que o valor de  $\Delta E_{00}$  passa de aproximadamente 1 aos 5 minutos para aproximadamente 3,5 aos 180 minutos, no entanto, aos 90 minutos houve um pico para o valor de  $\Delta E_{00}$ , sendo que o valor para revestimento exposto a concentração de amónia igual a 0,52 mol/L foi de aproximadamente 5,5, enquanto para o revestimento exposto a concentração de amónia mais elevada, 2,64 mol/L, o valor de mudança de cor total foi igual a 7. Desta forma pode-se

concluir, que a mudança de cor total aumenta ao longo do tempo, sendo que atinge um ponto de saturação aos 90 minutos.

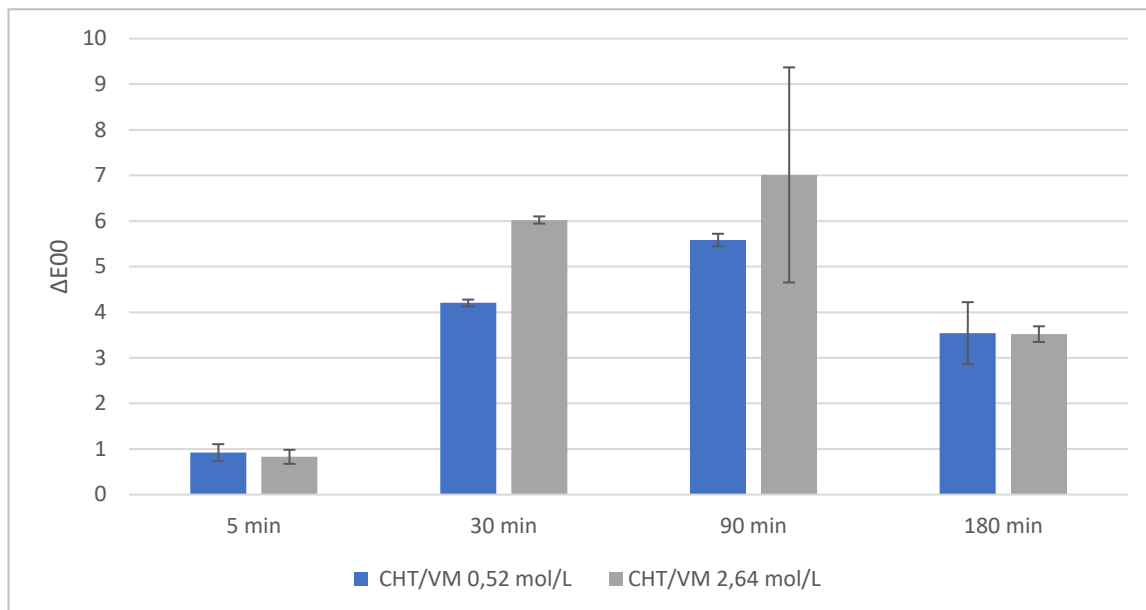


Figura 29: Resposta do revestimento funcional de uma camada a diferentes concentrações de amónia ao longo do tempo.

Na Figura 30 estão representadas as fotografias da mudança de cor do revestimento funcional de uma camada ao longo do tempo e em função da concentração da amónia utilizada no ensaio *in vitro*. Analisando esta figura é possível concluir que a mudança de cor a nível visual é máxima para as amostras relativas a 90 minutos, sendo que após esse tempo ocorre uma estagnação da cor. Também é de notar, que a cor do revestimento passa de tons laranja-acinzentados para amarelo que se torna cada vez mais intenso até aos 90 minutos quando atinge a saturação máxima da cor.

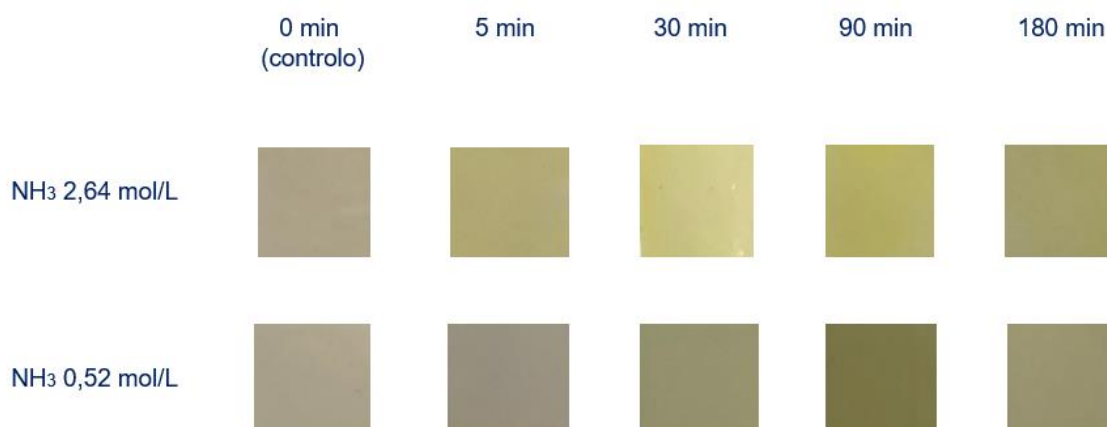


Figura 30: Foto das amostras de mudança de cor do revestimento funcional de uma camada ao longo do tempo e em função da concentração da amónia a qual o revestimento foi exposto.

Essas mudanças na cor dos revestimentos vão de encontro com o esperado, uma vez que o ambiente atmosférico dos frascos em que foram testados os revestimentos torna-se mais básico provocando a mudança da cor do VM para amarelo. Isto também vai de encontro

com a Figura 27, onde é possível observar que em soluções tampão com valores de pH mais básicos como, por exemplo, pH=6,4, a cor da solução passa para amarelo mais intenso.

No caso dos revestimentos de duas camadas, assim como no caso do revestimento de uma camada, a avaliação foi feita utilizando diferentes concentrações de amónia: 0,52 mol/L e 2,64 mol/L, sendo que as leituras de colorimetria foram feitas para 0 minutos de exposição a atmosfera de amónia, o que corresponde à amostra controlo, 5 minutos de exposição à atmosfera modificada, 30 minutos, 90 minutos e 180 minutos.

Na Figura 31 onde está representada a variação da cor do revestimento de uma camada ao longo do tempo na presença de duas concentrações de amónia diferentes, pode-se concluir, que de facto o revestimento de duas camadas desenvolvido também é sensível à mudança de pH. Sendo que o valor de  $\Delta E_{00}$  passa de aproximadamente 1 aos 5 minutos para aproximadamente 3, no caso do revestimento que foi submetido a concentração de amónia mais baixa, e aproximadamente 2, no caso do revestimento que foi submetido a concentração de amónia mais alta, aos 180 minutos. No entanto, aos 90 minutos houve um pico para o valor de  $\Delta E_{00}$ , sendo que o revestimento exposto a concentração de amónia igual a 0,52 mol/L foi de aproximadamente 7, enquanto para o revestimento exposto a concentração de amónia mais elevada, 2,64 mol/L, o valor de mudança de cor total foi igual a 4,5.

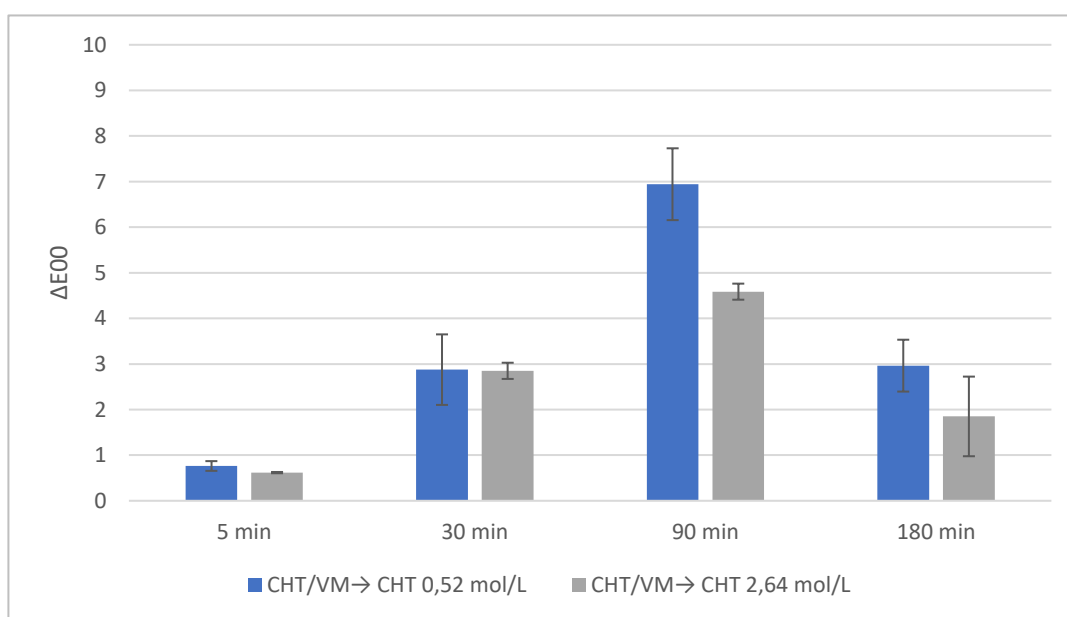


Figura 31: Resposta do revestimento funcional de duas camadas a diferentes concentrações de amónia ao longo do tempo.

Desta forma pode-se concluir, que a mudança de cor total aumenta ao longo do tempo sendo que também atinge um ponto de saturação aos 90 minutos.

Na Figura 32 estão representadas as fotografias da mudança de cor do revestimento funcional de uma camada ao longo do tempo e em função da concentração da amónia utilizada no ensaio *in vitro*. Analisando esta figura é possível concluir que a mudança de cor a nível visual é máxima para as amostras relativas a 90 minutos, sendo que após esse tempo ocorre uma estagnação da cor. Também é de notar que a cor do revestimento passa de tons laranja-acinzentados para amarelo que se torna cada vez mais intenso até aos 90 minutos quando atinge a saturação máxima da cor. Essas mudanças na cor dos revestimentos vão de encontro com o esperado, uma vez que o ambiente atmosférico dos frascos em que foram testados os revestimentos torna-se mais básico provocando a mudança da cor do VM para amarelo. Isto também vai de encontro com a Figura 28, onde é possível observar que em soluções tampão com valores de pH mais básicos como, por exemplo, pH=6,4, a cor da solução passa para amarelo mais intenso.

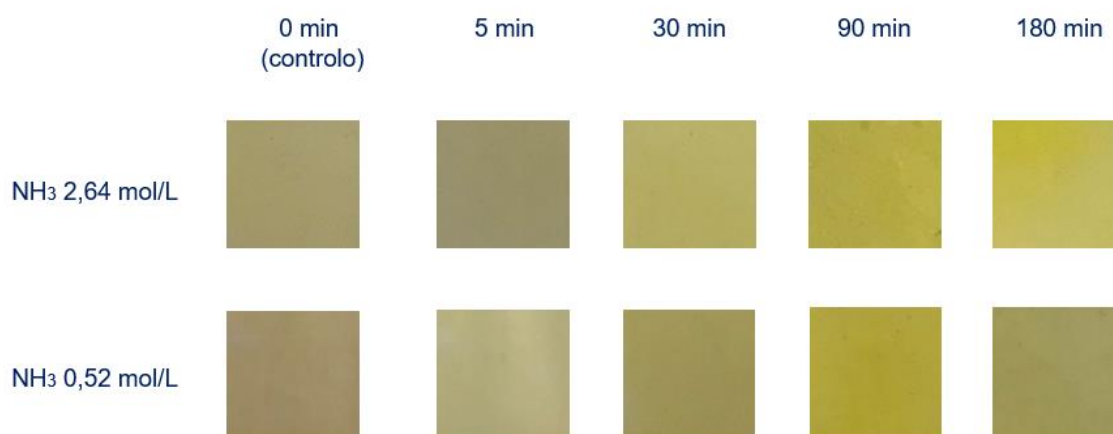


Figura 32: Foto das amostras de mudança de cor do revestimento funcional de duas camadas ao longo do tempo e em função da concentração da amónia a qual o revestimento foi exposto.

A um nível visual, a diferença de cor para os revestimentos de duas camadas pode parecer mais acentuada, no entanto as diferenças totais de cores ( $\Delta E_{00}$ ) são parecidas, tanto para o caso de revestimento de uma camada como revestimentos de duas camadas os picos de diferença total de cor variam entre 5 e 7. Isto poderá estar relacionado com o modelo atual de diferenças total de cor, de acordo com o qual, para algumas cores, o olho humano é capaz de distinguir cores para um valor de  $\Delta E_{00}$  mais baixo (Hiller, 2019).

## b) Estudo da Reversibilidade do Revestimento Funcional

É de elevada importância que a cor do revestimento funcional desenvolvido seja estável depois da primeira mudança de cor, uma vez que durante toda a cadeia alimentar pode ocorrer dano involuntário do material da embalagem e que pode prejudicar a resposta do revestimento funcional, caso a cor do mesmo seja reversível. Por outro lado, e caso a cor

do revestimento seja reversível pode ocorrer adulteração da resposta do revestimento funcional no sentido de reversão a cor para o estado inicial. Desta forma, é de elevada importância ter noção se a cor do revestimento funcional é estável depois da primeira alteração da cor. Neste sentido foram desenvolvidos dois ensaios, durante o primeiro ensaio foi testada a reversibilidade da cor do revestimento funcional, para entender se uma vez que a cor do revestimento seja alterada pode ocorrer a reversão da cor ao estado original na ausência de amónia. Durante um outro ensaio foi testado se a cor do revestimento funcional revertia na presença de um ácido.

### i) Reversibilidade da Cor na Ausência de Amónia

Para a avaliação da reversibilidade da cor dos revestimentos funcionais desenvolvidos estes inicialmente foram expostos a uma atmosfera modificada de amónia, sendo que depois disso foi efetuada a leitura da absorvância das amostras e estas foram guardadas nos frascos sem atmosfera modificada durante 6 dias, passando esse tempo foi feita mais uma leitura de colorimetria e foi calculada a diferença de cor total entre a amostra logo após à exposição a amónia e passando 6 dias em atmosfera sem amónia.

Na Figura 33 estão representados os valores de  $\Delta E_{00}$  depois da amostra ser retirada do ambiente de amónia e permanecendo 6 dias em ambiente de atmosfera não modificada. É de notar que os valores de  $\Delta E_{00}$  não variam significativamente nem em função do revestimento, nem em função da concentração de amónia a qual os revestimentos foram sujeitos inicialmente. A maior diferença de mudança total de cor acontece para o revestimento de duas camadas, no caso da concentração da amónia mais alta, mas mesmo assim o valor de  $\Delta E_{00}$  para essa amostra encontra-se abaixo de 2. No caso da concentração mais baixa, o valor

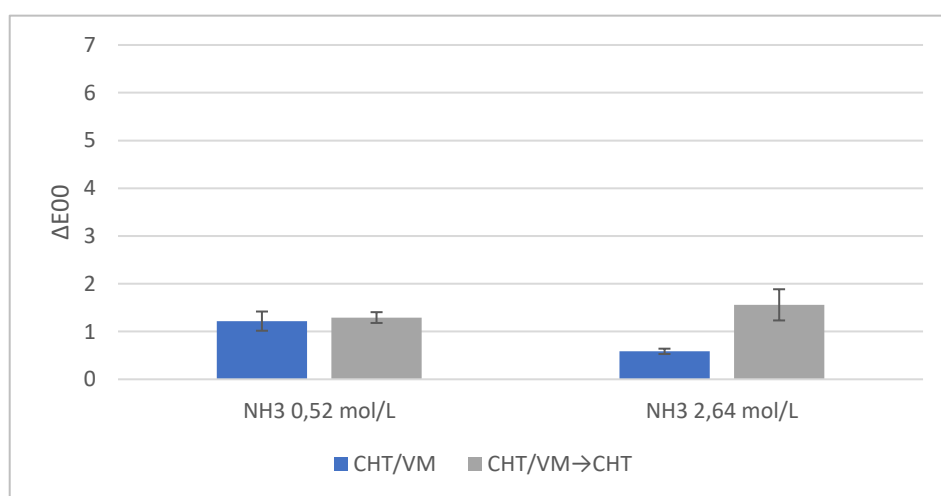


Figura 33: Mudança da cor dos revestimentos de uma e de duas camadas na ausência de amónia.



de  $\Delta E_{00}$  é aproximadamente igual a 1, tanto para revestimento de uma camada como para revestimento de duas camadas.

Na Figura 34 está representado o caso da mudança de cor do revestimento de duas camadas, que inicialmente foi submetido a um ambiente com a presença de amónia com a concentração igual a 2,64 mol/L e passando 6 dias na ausência de amónia.



Figura 34: Mudança de cor dos revestimentos funcionais na ausência de amónia.

A mudança de cor da amostra inicial, passando 3h a exposição ao ambiente de amónia é bem visível, já no caso de comparação da cor da amostra passando 3h na presença da amónia com a amostra passando 6 dias na ausência de amónia quase que não apresenta mudança de cor visível, podendo considerar, desta forma, que  $\Delta E_{00}=1,5$  não é significativa.

## ii) Reversibilidade da Cor na Presença de Ácido Acético

Para avaliar a possível reversibilidade da cor do revestimento funcional desenvolvido na presença de um ácido, foi escolhido o ácido acético por ser um ácido bastante comum e é um dos principais constituintes do vinagre, pelo que pode ser facilmente usado para manipular a cor do revestimento funcional, caso a cor do mesmo seja reversível na presença do ácido acético.

Para este ensaio os revestimentos funcionais inicialmente foram expostos a duas concentrações diferentes de amónia durante um período de 3 horas, depois disso foi feita a leitura da colorimetria e as amostras foram inseridas num ambiente de atmosfera modificada pela presença de AA com uma concentração igual a 2,64 mol/L.

Na Figura 35 está representado o gráfico relativo à mudança de cor total dos revestimentos funcionais desenvolvidos depois de serem submetidos a um ambiente de atmosfera modificada pela presença de AA a 2,64 mol/L. Ao observar essa figura é possível concluir, que a mudança de cor é mais pronunciada no caso do revestimento de uma camada. Isto pode estar relacionado com o facto de que o revestimento de duas camadas apresentar uma camada “protetora” de CHT por cima do revestimento modificado, tornando, assim, o VM menos exposto ao ambiente de atmosfera modificada pelo AA.

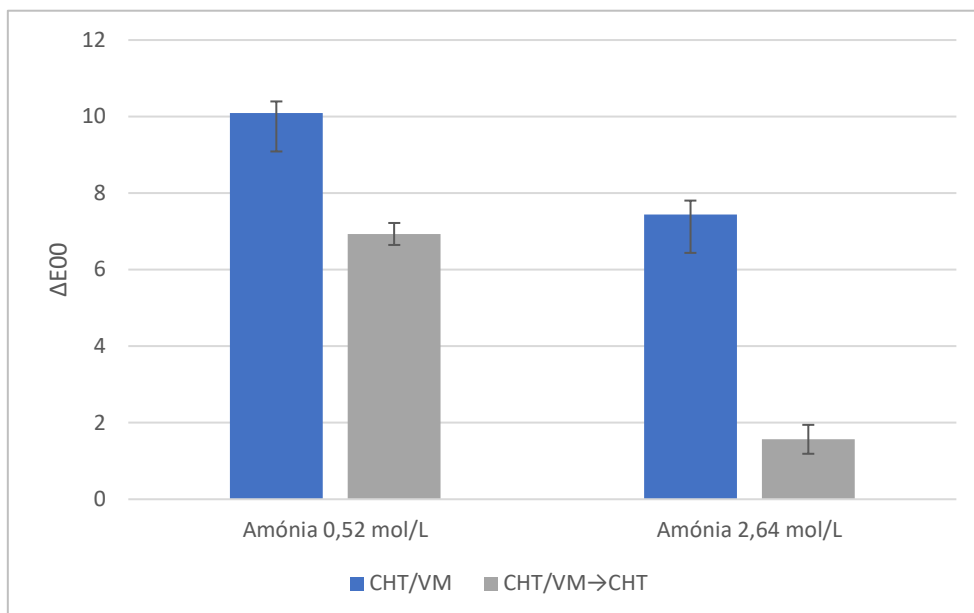


Figura 35: Mudança de cor total dos revestimentos funcionais desenvolvidos depois de serem submetidos a presença de amónia e a seguir a presença de ácido acético.

Na Figura 36 estão representadas as fotografias dos revestimentos controlo de uma e de duas camadas (revestimentos depois de estarem expostos a diferentes concentrações de amónia durante um período de 3 horas) e as mesmas amostras passando 3 horas em ambiente de atmosfera modificada com o AA a 2,64 mol/L. É de notar, que os revestimentos de duas camadas tiveram uma mudança de cor superior, apresentando uma diferença na cor bastante significativa entre as amostras controlo e as amostras passando 3 horas na presença de AA. Também é de notar, e tal como já foi esperado, os revestimentos funcionais ao serem expostas a um ambiente mais ácido passaram de uma cor amarelo intenso para avermelhado. No entanto, é de salientar que depois de revestimentos funcionais serem retirados da atmosfera de AA, a cor dos revestimentos revertia de avermelhado para o amarelo intenso.

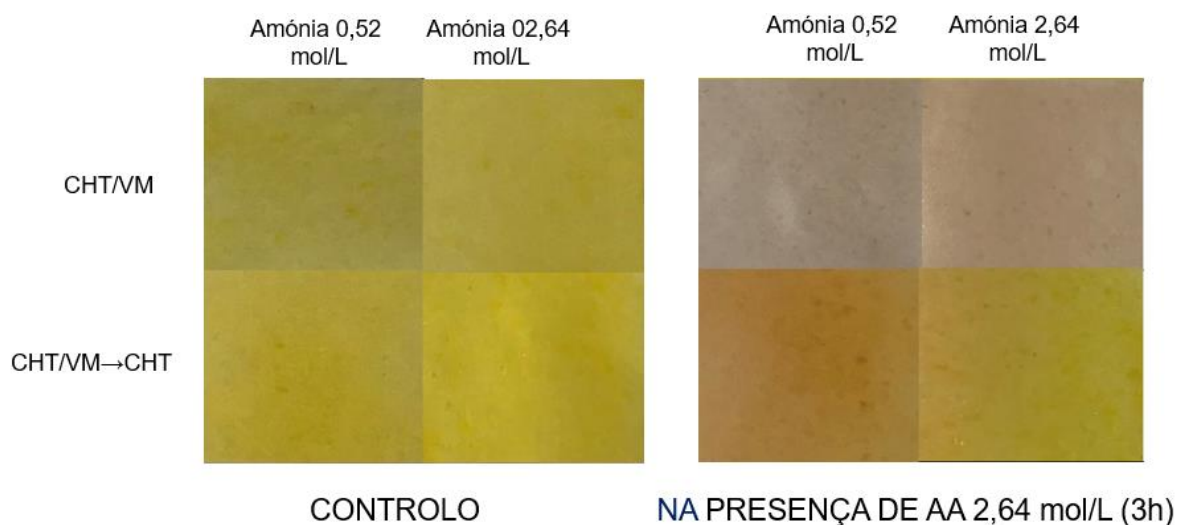


Figura 36: Foto das amostras dos revestimentos de uma e de duas camadas antes de serem submetidos ao ensaio de reversibilidade de cor na presença de AA e depois.

#### 4.4.3. Estudo da Resposta do Revestimento Funcional *In Situ*

Depois de avaliar o desempenho das amostras *in vitro* avançou-se para a avaliação da resposta do revestimento funcional desenvolvido ao longo da deterioração do alimento altamente perecível.

A nível mundial, camarão é um alimento bastante procurado uma vez que apresenta na sua constituição altos teores de proteína e baixos teores de gordura. Ao contrário de algumas carnes, o camarão apresenta a melhor qualidade logo após a colheita, sendo que a deterioração físico-química desse produto é bastante rápida. Durante a deterioração do camarão ocorre a libertação de amins voláteis que vão ter impacto no valor de pH na atmosfera da embalagem (Okpala, 2015). Desta forma seria interessante testar os revestimentos funcionais desenvolvidos num sistema de embalagens de camarão fresco cozido, sendo este produto altamente perecível.

Inicialmente, começou-se por avaliar o desempenho do revestimento de uma só camada durante o armazenamento do camarão a temperatura ambiente (22 °C) e temperatura de refrigeração (4 °C). A avaliação da resposta colorimétrica foi feita durante três dias seguidos, duas vezes por dia.

Na Figura 37 e na Figura 38 estão representadas as respostas colorimétricas de revestimento de uma camada durante a deterioração do camarão a uma temperatura de 22 °C e 4 °C, respetivamente. Avaliando essas duas figuras é possível concluir, que a resposta do revestimento funcional desenvolvida é mais rápida quando o produto está guardado à 22 °C, uma vez que o valor de  $\Delta E_{00}$  no caso do camarão guardado a temperatura ambiente nas primeiras três horas subiu para aproximadamente 4, no camarão guardado a 4 °C esse valor foi de aproximadamente 2,5. Aproximadamente às 27 horas de armazenamento tanto no caso do camarão guardados à temperatura ambiente, como no caso do camarão guardado à temperatura de refrigeração, os revestimentos funcionais atingem o valor máximo de  $\Delta E_{00}$ , o que corresponde a aproximadamente 4,5 para ambos os revestimentos. Este resultado foi previsível, uma vez que a libertação das amins voláteis que ocorre durante a degradação do camarão ocorre mais rápido à temperatura ambiente. Também é de notar que depois do pico da diferença de cor máximas às 27 horas houve estagnação da cor e perto das 39 horas de armazenamento a diferença total de cor do revestimento funcional estabilizou.

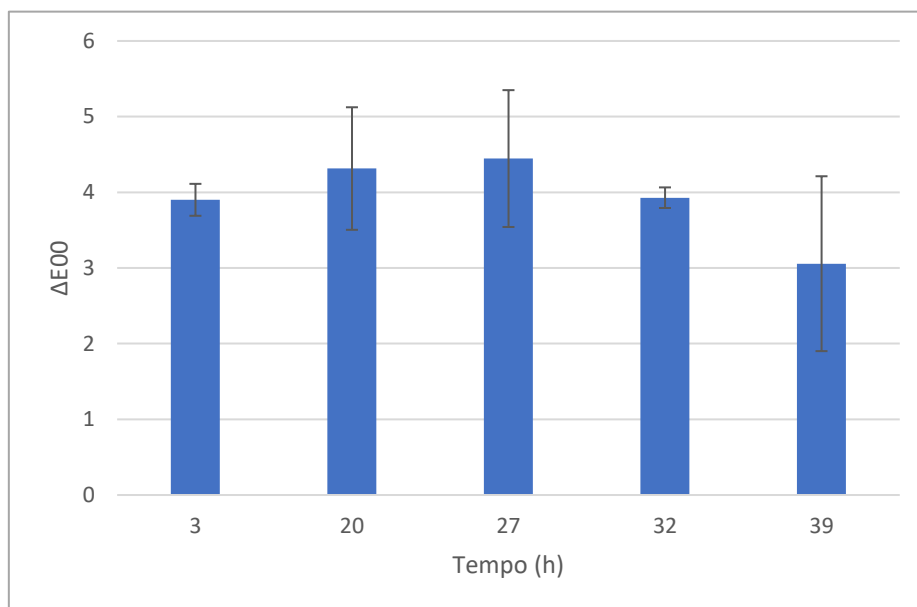


Figura 37: Resposta do revestimento funcional de uma camada à deterioração do alimento a 22 °C.

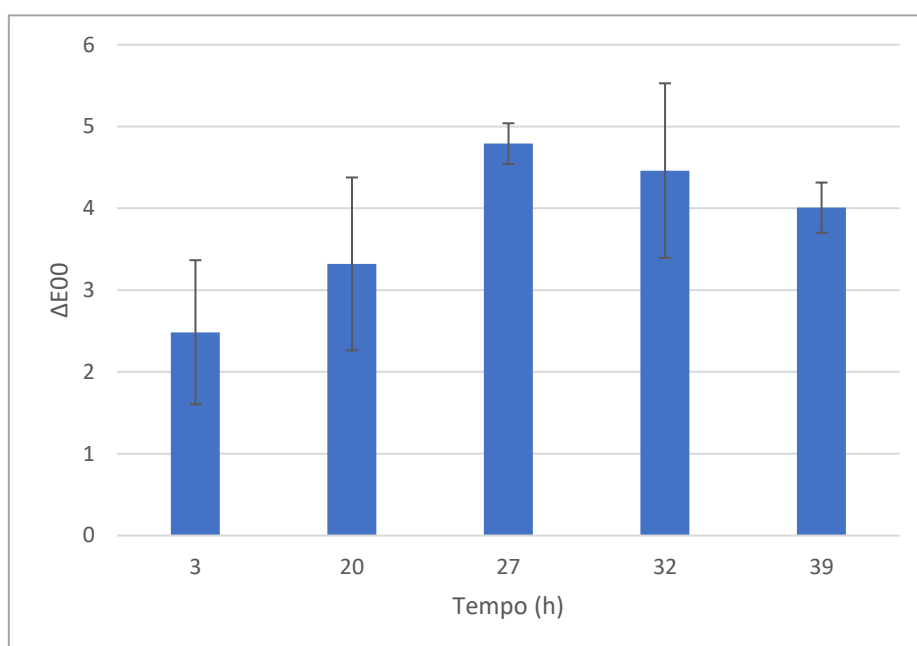


Figura 38: Resposta do revestimento funcional de uma camada à deterioração do alimento a 4 °C.

Depois do primeiro teste *in situ* onde foi só testado o revestimento funcional de uma só camada, foi efetuado o ensaio durante o qual foram testados revestimento funcional de uma camada e revestimento funcional de duas camadas. As medições da resposta colorimétrica foi feita ao longo dos cinco dias para 3 horas de armazenamento, 27 horas, 49 horas e 79 horas.

Nas Figuras 39 e 40 estão representadas as respostas à deterioração do camarão a uma temperatura igual a 4 °C do revestimento funcional de uma camada e do de duas camadas, respetivamente.

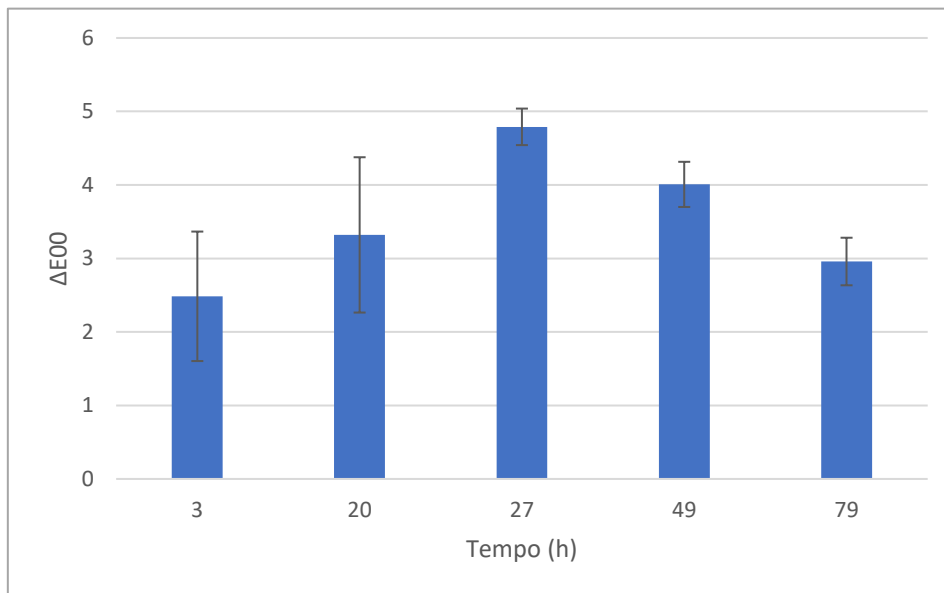


Figura 39: Resposta do revestimento funcional de uma camada à deterioração do camarão a 4 °C.

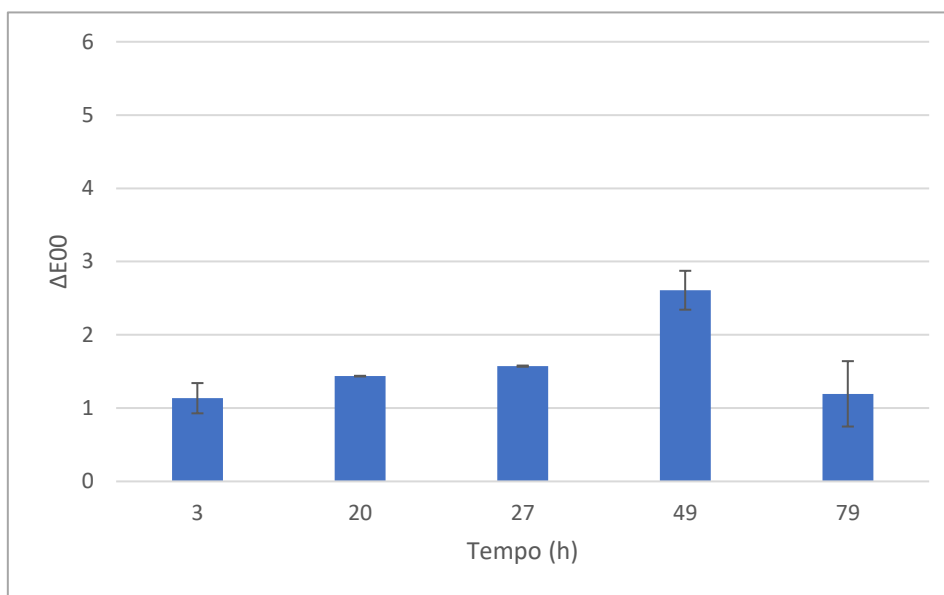


Figura 40: Resposta do revestimento funcional de duas camadas à deterioração do camarão a 4 °C

Comparando essas duas figuras é possível concluir que tanto o revestimento de uma camada como o revestimento de duas camadas são sensíveis à deterioração do camarão, no entanto o revestimento funcional de duas camadas apresenta valores de mudança total de cor mais baixos. Mais uma vez, durante a deterioração do alimento ocorre a estagnação do valor de  $\Delta E_{00}$ , sendo que para o revestimento de uma camada o pico corresponde a 27 horas, e para o revestimento de duas camadas o pico corresponde a 49 horas de armazenamento.

Na Figura 41 estão representadas as fotografias da mudança de cor dos revestimentos funcionais de uma camada e de duas camadas. É de notar, que o revestimento funcional de uma só camada tem uma mudança de cor mais pronunciada, isto vai de encontro com os valores de  $\Delta E_{00}$  dos dois gráficos. Isto pode estar relacionado com o facto do revestimento de duas camadas apresentar uma camada de CHT por cima da camada de CHT com o agente

sensível ao pH incorporado, o que torna o VM menos disponível para a mudança de cor.

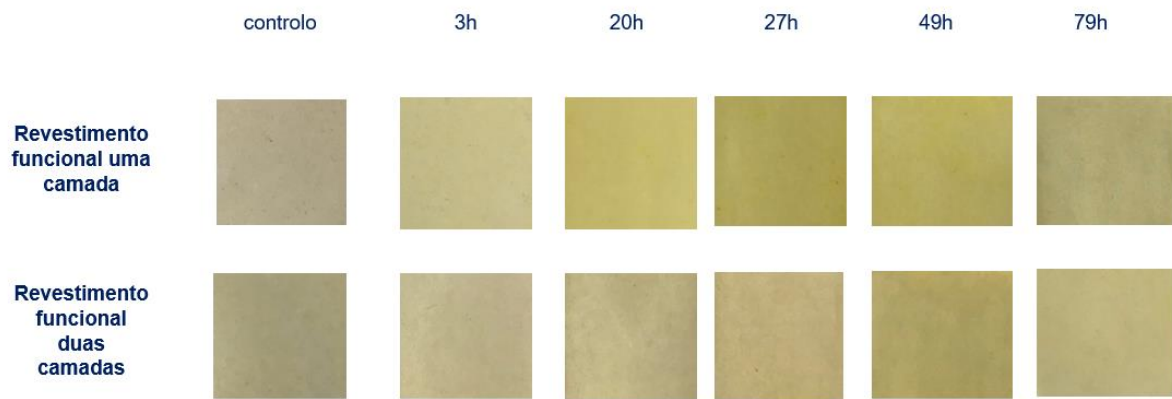


Figura 41: Fotos relativas à mudança de cor dos revestimentos funcionais de uma e de duas camadas durante a deterioração do camarão a 4 °C.

A Figura 41 também vai de encontro com a conclusão que se retirou das Figuras 39 e 40, a nível do pico de mudança de cor que, mais uma vez, no caso do revestimento funcional de uma camada corresponde a 27 horas e no caso do revestimento de duas camadas corresponde a 49 horas.

## 5. Conclusão e Perspetivas Futuras

Com o desenvolvimento deste trabalho foi possível desenvolver dois revestimentos funcionais colorimétricos sensíveis à mudança de pH, passíveis de serem utilizados nas embalagens alimentares para monitorizar o estado da frescura dos alimentos perecíveis, mais precisamente os camarões.

Dentro de todos os revestimentos funcionais testados o revestimento que se mostrou mais promissor foi o revestimento de CHT 3% (m/V) de uma camada (CHT com a incorporação do VM) e CHT 3% (m/V) de duas camadas (uma camada com a incorporação do vermelho de metila e outra camada só de CHT) aplicado em substrato previamente tratado com o plasma (tratamento com o ar, 40% da potência do equipamento máximo).

Para além do desenvolvimento dos revestimentos funcionais esses foram caracterizados a nível físico-químico e também foram efetuados os testes mecânicos para avaliar a aderência do revestimento ao substrato, durante os quais os revestimentos mostraram-se bem aderidos ao substrato nas condições do ensaio estabelecidas.

Durante este trabalho também foi testada a eficiência dos revestimentos funcionais desenvolvidos em alimentos líquidos e alimentos sólidos, *in vitro* e *in situ*. No caso dos alimentos líquidos os revestimentos desenvolvidos não se mostraram eficientes uma vez que ocorria a migração do VM do revestimento para as soluções tampão. Desta forma, optou-se por focar mais este trabalho na possível aplicação dos revestimentos desenvolvidos em embalagens de alimentos sólidos.

Durante os testes *in vitro* foi simulada a libertação de amins voláteis durante a deterioração do camarão com a adição de diferentes concentrações de amónia à atmosfera de embalagens onde estavam inseridos os revestimentos. Desta forma, foi avaliada a resposta do revestimento funcional a diferentes concentrações de amónia ao longo do tempo. Tanto o revestimento de uma camada, como o revestimento de duas camadas mostraram-se sensíveis à mudança de pH na atmosfera da embalagem. Para além disso, também foi testada a reversibilidade da cor do revestimento tanto na ausência da amónia, como na presença de ácido acético. No caso da ausência de amónia os revestimentos mostraram-se irreversíveis, já no caso dos testes com a presença de ácido acético os revestimentos mudaram de cor para vermelho, mas depois de serem retirados da atmosfera modificada com o ácido acético a cor reverteu para tons amarelo intenso.

No caso dos ensaios com os camarões os revestimentos funcionais também se mostraram eficientes sendo que durante os ensaios ocorreu a mudança de cor dos filmes de tons alaranjados para amarelo intenso.

Uma vez que os revestimentos mostraram-se sensíveis a degradação do camarão pois ocorreu a mudança de cor, seria interessante para os desenvolvimentos futuros relacionar os valores de  $\Delta E_{00}$  obtidos durante a deterioração com os valores de azoto volátil total (através da cromatografia gasosa), determinação da cadaverina e contagem de microorganismos total e comparar os valores de  $\Delta E_{00}$  com os valores legalmente estabelecidos para entender para que valores de  $\Delta E_{00}$  o camarão deixa de estar seguro para o consumo.

Para além disso, uma das melhorias possíveis para este revestimento é a melhoria de propriedades físico-químicas do revestimento no sentido de ser possível utilizar os revestimentos desenvolvidos em alimentos líquidos.

Por último, mas não menos importante, a substituição do VM por um corante natural não tóxico e apropriado para estar em contacto com os alimentos, por exemplo, as antocianinas, também é uma oportunidade de melhoria



## Referências

- Abugri, D. A., Apea, O. B., & Pritchett, G. (2012). Investigation of a Simple and Cheap Source of a Natural Indicator for Acid-Base Titration: Effects of System Conditions on Natural Indicators. *Green and Sustainable Chemistry*, 02(03), 117–122.  
<https://doi.org/10.4236/gsc.2012.23017>
- Aschemann-Witzel, J., de Hooge, I. E., & Almli, V. L. (2020). My style, my food, my waste! Consumer food waste-related lifestyle segments. *Journal of Retailing and Consumer Services*, September. <https://doi.org/10.1016/j.jretconser.2020.102353>
- Asgher, M., Qamar, S. A., Bilal, M., & Iqbal, H. M. N. (2020). Bio-based active food packaging materials: Sustainable alternative to conventional petrochemical-based packaging materials. *Food Research International*, 137(August).  
<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109625>
- Balbinot-Alfaro, E., Craveiro, D. V., Lima, K. O., Costa, H. L. G., Lopes, D. R., & Prentice, C. (2019). Intelligent Packaging with pH Indicator Potential. *Food Engineering Reviews*, 11(4), 235–244. <https://doi.org/10.1007/s12393-019-09198-9>
- Baner, O. G. P. and A. L. (2008). *Plastic Packaging* (Vol. 148).
- Benedict, J. B., Cohen, D. E., Lovell, S., Rohl, A. L., & Kahr, B. (2006). What is syncrystallization? States of the pH indicator methyl red in crystals of phthalic acid. *Journal of the American Chemical Society*, 128(16), 5548–5559.  
<https://doi.org/10.1021/ja0601181>
- Brody, A. L., Strupinsky, E. R., & Kline, L. R. (2001). *Active Packaging for Food Application*. CRC PRESS.
- Butler, P. (2012). Smarter packaging for consumer food waste reduction. *Emerging Food Packaging Technologies*, 409–434. <https://doi.org/10.1533/9780857095664.4.409>
- Canali, M., Amani, P., Aramyan, L., Gheoldus, M., Moates, G., Östergren, K., Silvennoinen, K., Waldron, K., & Vittuari, M. (2017). Food waste drivers in Europe, from identification to possible interventions. *Sustainability (Switzerland)*, 9(1).  
<https://doi.org/10.3390/su9010037>
- Cazón, P., & Vázquez, M. (2019). *Applications of Chitosan as Food Packaging Materials* (pp. 81–123). [https://doi.org/10.1007/978-3-030-16581-9\\_3](https://doi.org/10.1007/978-3-030-16581-9_3)
- Dave, D., & Ghaly, A. E. (2011). Meat spoilage mechanisms and preservation techniques: A critical review. *American Journal of Agricultural and Biological Science*, 6(4), 486–510.  
<https://doi.org/10.3844/ajabssp.2011.486.510>
- Dou, Z., & Toth, J. D. (2020). Global primary data on consumer food waste: Rate and characteristics – A review. *Resources, Conservation and Recycling*, December, 105332.

<https://doi.org/10.1016/j.resconrec.2020.105332>

- Ebrahimi Tirtashi, F., Moradi, M., Tajik, H., Forough, M., Ezati, P., & Kuswandi, B. (2019a). Cellulose/chitosan pH-responsive indicator incorporated with carrot anthocyanins for intelligent food packaging. *International Journal of Biological Macromolecules*, 136, 920–926. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.06.148>
- Ebrahimi Tirtashi, F., Moradi, M., Tajik, H., Forough, M., Ezati, P., & Kuswandi, B. (2019b). Cellulose/chitosan pH-responsive indicator incorporated with carrot anthocyanins for intelligent food packaging. *International Journal of Biological Macromolecules*, 136, 920–926. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.06.148>
- European Commission. (2017). *Food 2030: Future-Proofing our Food systems through Research and Innovation*. <https://doi.org/10.2777/249082>
- FAO. (2019). *The State of Food and Agriculture 2019. Moving forward on food loss and waste reduction*. <https://doi.org/10.4324/9781315764788>
- Gangakhedkar, N. S. (2010). Colour measurement methods for textiles. In *Colour Measurement: Principles, Advances and Industrial Applications*. Woodhead Publishing Limited. <https://doi.org/10.1533/9780857090195.2.221>
- Ghaly, a E., Dave, D., Budge, S., & Brooks, M. S. (2010). Fish Spoilage Mechanisms and Preservation Techniques : Review Department of Process Engineering and Applied Science , Dalhousie University Halifax , Nova Scotia , Canada. *American Journal of Applied Sciences*, 7(7), 859–877.
- Ghoshal, G. (2018). Recent Trends in Active, Smart, and Intelligent Packaging for Food Products. In *Food Packaging and Preservation*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-811516-9.00010-5>
- Goodman, T. M. (2012). International standards for colour. In *Colour Design: Theories and Applications: Second Edition (Second Edi)*. Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-101270-3.00018-7>
- Habekost, M. (2013). Which color differencing equation should be used? *International Circular of Graphic Education and Research*, 6(6).
- Haghighi, H., Licciardello, F., Fava, P., Siesler, H. W., & Pulvirenti, A. (2020). Recent advances on chitosan-based films for sustainable food packaging applications. *Food Packaging and Shelf Life*, 26(July), 100551. <https://doi.org/10.1016/j.fpsl.2020.100551>
- Halász, K., & Csóka, L. (2018). Black chokeberry (*Aronia melanocarpa*) pomace extract immobilized in chitosan for colorimetric pH indicator film application. *Food Packaging and Shelf Life*, 16(March), 185–193. <https://doi.org/10.1016/j.fpsl.2018.03.002>
- Haynes, M., Lide, D. R., & Bruno, T. J. (2017). *CRC handbook of chemistry and physics 97th*

edition 2016-2017.

- Hiller, G. (2019). Distâncias de cores , metamerismo e equações práticas de cores. *PRINCÍPIOS DE GERENCIAMENTO DE CORES, 11*.
- Iulietto, M. F., Sechi, P., Borgogni, E., & Cenci-Goga, B. T. (2015). Meat spoilage: A critical review of a neglected alteration due to ropy slime producing bacteria. *Italian Journal of Animal Science, 14*(3), 316–326. <https://doi.org/10.4081/ijas.2015.4011>
- Kamide, K. (2005). Cellulose and Cellulose Derivatives Molecular Characterization and Its Applications Molecular Characterization and Its Application. In *Elsevier*.
- Kargarzadeh, H., Ahmad, I., & Thomas, S. (2017). *Handbook of Cellulose Nanocomposites*. (p. 896).
- Kit L. Yam, Takhistov, P., & Miltz, J. (2005). Conceptual framework of intelligent packaging. *Journal of Food Science, 70*(1), 1–10. [http://lib3.dss.go.th/fulltext/Journal/Journal of food science/2005 v.70/no.1/23279jfsv70n1pR0001-0010ms20040382\[1\].pdf](http://lib3.dss.go.th/fulltext/Journal/Journal%20of%20food%20science/2005%20v.70/no.1/23279jfsv70n1pR0001-0010ms20040382[1].pdf)
- Korkeala, H., Alanko, T., Mäkelä, P., & Lindroth, S. (1990). Lactic acid and pH as indicators of spoilage for vacuum-packed cooked ring sausages. *International Journal of Food Microbiology, 10*(3–4), 245–253. [https://doi.org/10.1016/0168-1605\(90\)90072-D](https://doi.org/10.1016/0168-1605(90)90072-D)
- Kou, S. G., Peters, L. M., & Mucalo, M. R. (2021). Chitosan : A review of sources and preparation methods. *International Journal of Biological Macromolecules, 169*, 85–94. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.12.005>
- Lackner, M. (2015). Bioplastics - Biobased plastics as renewable and/or biodegradable alternatives to petroplastics. In *Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology* (Issue May 2015). <https://doi.org/10.1002/0471238961.koe00006>
- Mackay, R. G., & Tait, J. M. (2011). Handbook of chitosan research and applications. In *Handbook of Chitosan Research and Applications*.
- Madhu, G., Bhunia, H., Bajpai, P. K., & Chaudhary, V. (2014). Mechanical and morphological properties of high density polyethylene and polylactide blends. *Journal of Polymer Engineering, 34*(9), 813–821. <https://doi.org/10.1515/polyeng-2013-0174>
- Medtronic. (2012). Safety Data Sheet. *Material Safety Data Sheet, 4*(2), 8–10. [https://us.vwr.com/assetsvc/asset/en\\_US/id/16490607/contents](https://us.vwr.com/assetsvc/asset/en_US/id/16490607/contents)
- Moses, C. M. (2005). How do you know if your equipment is safe to use? *Biomedical Instrumentation & Technology / Association for the Advancement of Medical Instrumentation, Suppl.*
- Murray, J. C. F. (2009). Cellulosics. *Handbook of Hydrocolloids: Second Edition, mc*, 710–723. <https://doi.org/10.1533/9781845695873.710>
- Mustafa, F., & Andreescu, S. (2018). Chemical and biological sensors for food-quality

- monitoring and smart packaging. *Foods*, 7(10). <https://doi.org/10.3390/foods7100168>
- O'Grady, M. N., & Kerry, J. P. (2008). Smart packaging technologies and their application in conventional meat packaging systems. *Meat Biotechnology*, 425–451. [https://doi.org/10.1007/978-0-387-79382-5\\_19](https://doi.org/10.1007/978-0-387-79382-5_19)
- Okpala, C. O. R. (2015). The Physicochemical Changes of Farm-Raised Pacific White Shrimp (&lt;i>Litopenaeus vannamei&lt;/i>) as Influenced by Iced Storage. *Food and Nutrition Sciences*, 06(10), 906–922. <https://doi.org/10.4236/fns.2015.610095>
- Pal, P., Pal, A., Nakashima, K., & Yadav, B. K. (2020). Applications of chitosan in environmental remediation: A review. *Chemosphere*, 128934. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.128934>
- Pandey, J. K., Takagi, H., Nakagaito, A. N., & Kim., H.-J. (2015). Handbook of Polymer Nanocomposites. Processing, Performance and Application, Volume C: Polymer Nanocomposites of Cellulose Nanoparticles. In *Springer-Verlag Berlin Heidelberg*.
- Park, S. J., & Jin, J. S. (2001). Effect of corona discharge treatment on the dyeability of low-density polyethylene film. *Journal of Colloid and Interface Science*, 236(1), 155–160. <https://doi.org/10.1006/jcis.2000.7380>
- Plastics Europe, G. M. R., & Conversio Market & Strategy GmbH. (2019). *Plastics - the Facts 2019*. 14, 35. <https://www.plasticseurope.org/en/resources/market-data>
- Product specification. (1993). *Building Research & Information*, 21(1), 21–22. <https://doi.org/10.1080/09613219308727250>
- Rawat, S. (2015). Food Spoilage: Microorganisms and their prevention. *Journal of Plant Science and Research*, 5(4), 47–56. <https://www.imedpub.com/abstract/food-spoilage-microorganisms-and-their-prevention-15918.html>
- Robert, M. K., & William, M. (2016). Adding Value to OKLAHOMA The Importance of Food pH in Commercial Canning Operations. *Food & Agricultural Products Center - Oklahoma State University*, 118.
- Sajin, K., Anoobkumar, K., & Rasa, O. (2020). pH Indicators: A Valuable Gift for Analytical Chemistry. *Saudi Journal of Medical and Pharmaceutical Sciences*, 06(05), 393–400. <https://doi.org/10.36348/sjmpps.2020.v06i05.001>
- Sharma, G., Wu, W., & Dalal, E. N. (2005). The CIEDE2000 color-difference formula: Implementation notes, supplementary test data, and mathematical observations. *Color Research and Application*, 30(1), 21–30. <https://doi.org/10.1002/col.20070>
- Stancil, W. C., & Jordan, D. (1985). Precise Color Communication. *Book of Papers, National Technical Conference - AATCC (American Association of Textile Chemists An)*, 33–35.
- Subedi, D. P. (2011). *Contact Angle Measurement for The Surface Characterization of Solids*

determined from the measurement of contact angle of a pure liquid dro measurement has been used in the of surface energy , surface energy materials . In this paper , the theory of contac. 1, 1–4.

- Suman, S., Gaikwad, K. K., & Lee, Y. S. (2018). Anthocyanin – A Natural Dye for Smart Food Packaging Systems. *Korean Journal of Packaging Science and Technology*, 24(3), 167–180. <https://doi.org/10.20909/kopast.2018.24.3.167>
- Suriasih, N. K. (1983). Microbial Fish Spoilage and Its Biochemical Changes. *Fakultas Pcternakan UNUD*, 1–19.
- Tichoniuk, M., Radomska, N., & Cierpiszewski, R. (2017). The Application of Natural Dyes in Food Freshness Indicators Designed for Intelligent Packaging. *Studia Oeconomica Posnaniensia*, 5(7), 19–34. <https://doi.org/10.18559/soep.2017.7.2>
- Torres, E. F., Rodrigo, D., & Martínez, A. (2015). Preservation of Foods. *Encyclopedia of Food and Health*, 491–496. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384947-2.00566-3>
- van den Oever, M., Molenveld, K., van der Zee, M., & Bos, H. (2017). Bio-based and biodegradable plastics : facts and figures. In *Handbook of Ecomaterials* (Issue 1722). <https://research.wur.nl/en/publications/e7bc4e7b-b1aa-49f3-bde9-281ecfa09575>
- Vitale, G., Mosna, D., Bottani, E., Montanari, R., & Vignali, G. (2018). Environmental impact of a new industrial process for the recovery and valorisation of packaging materials derived from packaged food waste. *Sustainable Production and Consumption*, 14, 105–121. <https://doi.org/10.1016/j.spc.2018.02.001>
- Vunain, E., Mishra, A. K., & Mamba, B. B. (2017). Fundamentals of chitosan for biomedical applications. In *Chitosan Based Biomaterials* (Vol. 1). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100230-8.00001-7>
- Wyrwa, J., & Barska, A. (2017). Innovations in the food packaging market: active packaging. *European Food Research and Technology*, 243(10), 1681–1692. <https://doi.org/10.1007/s00217-017-2878-2>
- Yoshida, C. M. P., Maciel, V. B. V., Mendonça, M. E. D., & Franco, T. T. (2014). Chitosan biobased and intelligent films: Monitoring pH variations. *LWT - Food Science and Technology*, 55(1), 83–89. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2013.09.015>
- Zeng, T., Durif, F., & Robinot, E. (2021). Can eco-design packaging reduce consumer food waste? an experimental study. *Technological Forecasting and Social Change*, 162(June 2020), 120342. <https://doi.org/10.1016/j.techfore.2020.120342>
- Zennifer, A., Senthivelan, P., Sethuraman, S., & Sundaramurthi, D. (2021). Key advances of carboxymethyl cellulose in tissue engineering & 3D bioprinting applications. *Carbohydrate Polymers*, 256(October 2020), 117561.

<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.117561>

Zhang, L., Zhang, Z., Chen, Y., Ma, X., & Xia, M. (2021). Chitosan and procyanidin composite films with high antioxidant activity and pH responsivity for cheese packaging. *Food Chemistry*, 338(February 2020), 128013.

<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.128013>