



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ  
INSTITUTO DE TECNOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE  
ALIMENTOS

**RAÍRA SÁ DE BRITO**

**ESTUDO DA INFLUENCIA DO EXTRATO PURIFICADO DO AÇAÍ (*Euterpe  
oleracea*) EM FILMES DE GELATINA E SEU COMPORTAMENTO COMO  
INDICADOR DE pH**

**BELÉM – PA**

**2019**



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ  
INSTITUTO DE TECNOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE  
ALIMENTOS

**RAÍRA SÁ DE BRITO**

**ESTUDO DA INFLUÊNCIA DO EXTRATO PURIFICADO DO AÇAÍ (*Euterpe  
oleracea*) EM FILMES DE GELATINA E SEU COMPORTAMENTO COMO  
INDICADOR DE pH**

Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal do Pará, como requisito para a obtenção do Título de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Orientadora: Prof. Dr<sup>a</sup>. Lúcia de Fátima Henriques Lourenço

**BELÉM – PA**

**2019**

**RAÍRA SÁ DE BRITO**

**ESTUDO DA INFLUÊNCIA DO EXTRATO PURIFICADO DO AÇAÍ (*Euterpe oleracea*) EM FILMES DE GELATINA E SEU COMPORTAMENTO COMO INDICADOR DE pH**

Data da avaliação: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

Nota: \_\_\_\_\_ Conceito: \_\_\_\_\_

**BANCA EXAMINADORA:**

---

Prof<sup>ª</sup>. Dra. Lúcia de Fátima Henriques Lourenço  
(FEA/ITEC/UFPA - Orientadora)

---

Prof<sup>ª</sup>. Dra. Consuelo Lúcia de Sousa Lima  
(FEA/ITEC/UFPA – Membro Interno)

---

Prof<sup>ª</sup>. Dra. Suezilde da Conceição Amaral Ribeiro  
(IFPA/UEPA – Membro Externo)

---

Prof. Dr. Raul Nunes de Carvalho Junior  
(FEA/ITEC/UFPA – Suplente interno)

---

Prof. Dr. Éder Augusto Furtado Araújo  
(FEA/ITEC/UFPA – Suplente externo)

*Dedico a Deus, meus pais, minha irmã e  
minhas tias, por serem tudo na minha  
vida.*

## AGRADECIMENTOS

A Deus primeiramente, que sempre me deu forças, sabedoria e sempre me abençoou e nunca deixou eu esquecer os verdadeiros motivos para eu seguir em frente e nunca desistir.

Aos meus pais que são minha base. Agradeço imensamente pelo incentivo, pelas palavras de apoio e por acreditarem mais em mim, do que muitas vezes eu acreditei. Em especial a minha mãe que nunca mediu esforços para eu chegar aonde cheguei. Que Deus abençoe sempre vocês.

As minhas tias, Maria e Creusa, e minha irmã Julianne que mesmo de longe me dão apoio e oram por mim. Agradeço pelo amor, o carinho e a força.

Aos meus familiares que de alguma forma tornaram essa caminhada menos difícil, e a minha madrasta Socorro pelo carinho, apoio e por muitas vezes ser como uma mãe para mim.

A Professora Dr<sup>a</sup> Lúcia de Fátima Henriques Lourenço, pela orientação, pela paciência e apoio. Sou imensamente grata a Deus pela pessoa que é, e pela orientação durante esses últimos 5 anos durante a graduação e mestrado.

Aos professores da banca, pelas valiosas contribuições ao longo do trabalho.

A família Lapesca pela amizade no decorrer desses anos, que só se multiplicou. Em especial a uma pessoa que nunca mede esforços para ajudar quem precisa, muito obrigada Cleidiane Araújo, pela amizade, ajuda e pelas palavras de otimismo nas horas que batia o desespero e desculpa pelas perturbações ao longo desses anos. A Gleice, Glauce, Jaíra e Maria pelas aparentemente pequenas ajudas neste trabalho, mas que foram de grande valor para mim. A Gleyca pela amizade que mesmo nesse pouco tempo, foi de grande importância, e pela companhia nas idas e vindas de Castanhal/Belém.

Aos meus amigos de todas as horas, Robson, Rafaella e Priscila que estão ao meu lado desde a graduação, os quais eu pude dividir as alegrias e tristezas desta caminhada. E ao meu amigo Willen, onde em algum momento dessa correria nossa amizade se fortaleceu, meu muito obrigado amigo pelas risadas, caronas e companhia.

A minha melhor amiga Verediana pelos 10 anos de amizade, pelas centenas de histórias e loucuras compartilhadas e pela companhia nesse último ano do mestrado, onde a amizade se fortaleceu, nas idas ao supermercado, nas conversas antes de dormir,

idas a academia, aprendendo sempre a respeitar uma o espaço da outra, saibas que você foi muito importante nesta caminhada.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos (PPGCTA/UFPA) e a CAPES pela concessão da bolsa de estudo.

## LISTA DE FIGURAS

### CAPÍTULO I

<b>Figura 1.</b> Estrutura da gelatina	6
<b>Figura 2.</b> Estrutura da antocianina	14
<b>Figura 3.</b> Representação da via biossintética da antocianina	15
<b>Figura 4.</b> Principais Antocianidinas	16
<b>Figura 5.</b> Estrutura química das antocianinas encontradas no açáí ( <i>Euterpe oleracea</i> )	17

### CAPÍTULO II

<b>Figura 1.1</b> Gráfico de superfície de resposta e curva de nível para permeabilidade ao vapor de água (PVA) relacionando as concentrações de gelatina de peixe (%) e extrato do açáí (%) para obtenção do filme	40
<b>Figura 1.2.</b> Gráfico de superfície de resposta e curva de nível para solubilidade, relacionando as concentrações de gelatina de peixe (%) e extrato do açáí (%) para a obtenção do filme	41
<b>Figura 2.</b> Perfis de desejabilidade para concentrações de gelatina de peixe e Extrato do açáí na obtenção do filme biodegradável.	42
<b>Figura 4. (a)</b> Filme biodegradável sem adição de extrato do açáí (controle) <b>(b)</b> Filme indicador de pH com extrato do açáí	45

### CAPÍTULO III

<b>Figura 1.</b> Alteração dos parâmetros de cor ( $L^*$ , $a^*$ , $b^*$ , $C^*$ , $h$ e $\Delta E$ )	59
<b>Figura 2.</b> Filme indicador de pH incorporado com extrato do açáí ao longo dos nove dias de armazenamento. a) Temperatura ambiente com incidência de luz b) Temperatura de refrigeração sem incidência de luz	60
<b>Figura 3.</b> Imagens do filme inteligente durante a monitorização da deterioração do filé de peixe armazenado à temperatura de refrigeração	64

## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO II

- Tabela 1.** Definição dos níveis das variáveis estudadas na obtenção do filme 35
- Tabela 2.** Resultados experimentais para PVA e Solubilidade obtida sob diferentes condições do delineamento 2<sup>2</sup>. 37
- Tabela 3.** Efeito estimado, erro puro, grau de significância estatística para permeabilidade ao vapor de água (PVA) e solubilidade. 38
- Tabela 4.** Análise de variância (ANOVA) do modelo ajustado para Permeabilidade ao vapor de água (PVA) e Solubilidade 39
- Tabela 5.** Caracterização física e química do filme indicador de pH e controle 43

### CAPÍTULO III

- Tabela 1.** Análise físico-química e microbiológica realizada no filé de pescada amarela (*Cynoscion acoupa*) armazenado sob temperatura de refrigeração ( $\pm 5^{\circ}\text{C}$ ) 60
- Tabela 2.** Parâmetros de cor dos filmes durante o monitoramento da deterioração dos filés de pescada amarela (*Cynoscion acoupa*) 62

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO GERAL.....</b>	<b>1</b>
<b>2 OBJETIVO.....</b>	<b>4</b>
2.1 OBJETIVO GERAL.....	4
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	4
<b>3 ESTRUTURA DA DISSERTAÇÃO.....</b>	<b>5</b>
<b>CAPÍTULO I.....</b>	<b>6</b>
<b>1 REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>6</b>
1.1 APROVEITAMENTO DE RESÍDUOS DA INDÚSTRIA DE PESCADO.....	6
2.2 GELATINA DE PEIXE .....	7
2.3 POLÍMEROS E FILMES BIODEGRADÁVEIS .....	8
2.4 EMBALAGENS INTELIGENTES.....	12
2.4.1 Indicadores de frescor e pH.....	13
2.5 ANTOCIANINAS .....	14
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>21</b>
<b>CAPÍTULO II.....</b>	<b>32</b>
<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>33</b>
<b>2 MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>35</b>
2.1 MATERIAL .....	35
2.2 MÉTODOS.....	35
2.2.1 Extração da gelatina de pele de pescada amarela ( <i>Cynoscion acoupa</i> ).....	35
2.2.2 Elaboração dos filmes.....	35
2.2.3 Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR).....	36
2.2.4 Determinação das propriedades dos filmes.....	36
2.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	38
<b>3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>38</b>
3.1 DELINEAMENTO COMPOSTO CENTRAL ROTACIONAL 2 <sup>2</sup> (DCCR).....	38
3.2 OBTENÇÃO DAS CONDIÇÕES ÓTIMAS POR DESEJABILIDADE .....	44
<b>4. CONCLUSÃO.....</b>	<b>47</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>49</b>
<b>CAPÍTULO III.....</b>	<b>53</b>
<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>54</b>
<b>2 MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>56</b>
2.1 MATERIAL .....	56
2.2 MÉTODOS.....	56

2.2.1	<i>Determinação do teor total de antocianinas</i> .....	56
2.2.2	<i>Extração da gelatina de pele de pescada amarela (Cynoscion acoupa)</i> .....	56
2.2.3	<i>Caracterização da Gelatina Liofilizada</i> .....	57
2.2.4	<i>Elaboração do filme indicador de pH</i> .....	57
2.2.5	<i>Estabilidade da cor do filme em função do tempo, temperatura e luz</i> .....	58
2.2.6	<i>Teste de aplicação do filme em filés de pescada amarela (Cynoscion acoupa)</i> .....	58
<b>3</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>59</b>
3.1	DETERMINAÇÃO DO TEOR TOTAL DE ANTOCIANINAS .....	59
3.2	CARACTERIZAÇÃO DA GELATINA DE PEIXE .....	59
3.3	ESTABILIDADE DA COR DO FILME EM FUNÇÃO DO TEMPO, TEMPERATURA E LUZ .....	60
3.4	APLICAÇÃO DO FILME INTELIGENTE EM FILÉS DE PESCADA AMARELA (Cynoscion acoupa).....	63
<b>4</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	<b>68</b>
	<b>REFERENCIAS</b> .....	<b>69</b>
	<b>APENDICE A</b> .....	Erro! Indicador não definido.

## ESTUDO DA INFLUÊNCIA DO EXTRATO PURIFICADO DO AÇAÍ (*Euterpe oleracea*) EM FILMES DE GELATINA E SEU COMPORTAMENTO COMO INDICADOR DE pH

**RESUMO GERAL:** Devido a grande quantidade de resíduos gerados pelas indústrias de alimentos, as mesmas vêm sendo pressionadas a se tornarem mais responsáveis com o meio ambiente, sendo obrigadas a viabilizarem diferentes formas de utilização destes resíduos. Uma dessas formas que vem sendo cada vez mais estudada é a produção de filmes biodegradáveis a partir desses resíduos, e mais recentemente a adição de compostos naturais para produção de embalagens biodegradáveis ativas e/ou inteligentes. Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi estudar a ação da antocianina contida no extrato purificado seco do açaí como indicadora de pH em filmes de gelatina da pele de peixe e seu potencial de ação como embalagem inteligente. Deste modo, um filme de gelatina, glicerol e extrato do açaí foi elaborado segundo a técnica de *casting*. A gelatina utilizada foi caracterizada quanto ao ponto de fusão (PF) e força do gel (FG), e o extrato de açaí quanto ao teor total de antocianina. Para a produção do filme foi realizado um Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) 2<sup>2</sup> para obter o filme com as melhores propriedades de barreira através do perfil de desejabilidade (PD), onde o filme otimizado foi comparado com um filme sem extrato quanto a suas propriedades físicas, mecânicas e de cor. Também foi avaliado a estabilidade do filme com extrato quanto a luz, tempo e temperatura ao longo de 9 dias coletando parâmetros de cor dos filmes, e sua ação como embalagem inteligente indicadora de pH, onde porções de filé de peixe foram colocadas em bandejas de poliestireno e cobertas com o filme e armazenadas a  $\pm 5$  °C. Durante seis dias, a cada 72 horas foram realizadas análises microbiológicas e o pH no filé. Paralelamente, os filmes foram submetidos à análise colorimétrica. As concentrações ótimas obtidas pelo PD foram de 1,79% de gelatina de peixe e 0,097% de extrato de açaí, obtendo resultados satisfatórios quanto a suas propriedades. A gelatina obteve valores satisfatórios de PF e FG, e o extrato apresentou alto teor de antocianinas. O filme indicador apresentou boa estabilidade nas diferentes condições em que foi armazenado, e durante sua aplicação como embalagem de filés de peixe, apresentou elevação do pH e mudanças na cor do filme, também foi observado um decréscimo na população microbiana ao longo dos dias. No entanto, o filme não apresentou boa aparência no fim da aplicação, sendo mais indicado seu uso como etiqueta indicadora de pH.

**Palavras-chaves:** gelatina de peixe, açaí (*Euterpe oleracea*), filme inteligente, indicador de pH

## 1 INTRODUÇÃO GERAL

Nas diversas etapas da cadeia produtiva da indústria de alimentos, desde a produção até a comercialização, é gerada uma quantidade significativa de resíduos. Diante disso, as indústrias de alimentos de origem animal ou vegetal vêm sendo pressionadas a se tornarem mais responsáveis com o meio ambiente, sendo obrigadas a viabilizarem diferentes formas de utilização destes resíduos (AGUIAR; GOULART, 2013).

No Brasil as indústrias de beneficiamento de pescado geram grandes quantidades de resíduos, que além do alto valor biológico, são fontes de proteínas e lipídeos, que podem ser utilizados para a elaboração de produtos, e ainda contribuir para minimizar os impactos ambientais (SIMÕES et al. 2011). Por exemplo, a pele de peixe ou cartilagem de algumas espécies pode ser uma excelente matéria-prima para a produção de gelatina ou sulfato de condroitina útil nos setores alimentício, cosmético e farmacêutico (KARIM; BHAT, 2009).

A gelatina é uma proteína derivada do colágeno por termo-hidrólise, e dependendo da aplicação é fortemente influenciada não apenas pela espécie da qual foi extraído seu colágeno, mas também pelo pré-tratamento utilizado, e dos parâmetros do processo como temperatura e pH que podem influenciar nas suas propriedades reológicas (KOLODZIESJSKA et al. 2008). Existem muitos estudos sobre a utilização da gelatina na produção de filmes biodegradáveis, sejam em blendas (ARFAT et al. 2014), com a adição de óleos e extratos (GÓMEZ-GUILLÉN et al. 2007; SILVA et al. 2018) ou de antocianinas (GOLASZ et al. 2013; ZHAI et al. 2018; URANGA et al. 2018).

Uma grande quantidade de compostos antioxidantes como óleos, extratos e antocianinas podem ser utilizados em materiais de embalagem de alimentos (YILDIRIM et al., 2018), sejam eles com a função de tornar a embalagem ativa ou inteligente. A antocianina, um conhecido flavonóide, é um dos seis subgrupos comuns de pigmentos vegetais encontrados em plantas, especialmente em flores, frutas e tubérculos (GÓMEZ-ESTACA et al. 2014). No entanto, este pigmento natural possui alta sensibilidade a reações de degradação, afetando assim sua estabilidade e cor (QIU et al. 2018). Esta estabilidade da cor deve ser considerada quando as antocianinas são utilizadas, por exemplo, como materiais em filmes biodegradáveis, sejam eles ativos ou inteligentes.

As embalagens inteligentes podem ser utilizadas em filmes como indicadores de pH, onde é utilizado algum sensor capaz de fornecer informações visuais ao consumidor, como transformação da aparência ou da cor, detectando o nível de contaminação bacteriana e o frescor do produto, ou seja, a embalagem inteligente pode mostrar ao consumidor se o alimento está ou não adequado para consumo (HUANG et al. 2015; GHAANI et al. 2016; LIU et al. 2017). Sem dúvida, essa característica pode diminuir o índice de desperdício de alimentos e as despesas com transporte e logística em toda a cadeia produtiva (POURJAVAHER et al. 2017).

Diante disso, o objetivo deste trabalho foi adicionar extrato purificado do açaí rico em antocianinas em filmes biodegradáveis de gelatina de peixe e verificar seu comportamento como indicador de pH.

## **2 OBJETIVO**

### **2.1 OBJETIVO GERAL**

Estudar a ação da antocianina contida no extrato purificado seco do açaí como indicadora de pH em filmes de gelatina da pele de peixe e seu potencial de ação como embalagem inteligente.

### **2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Otimizar o processo de elaboração de filmes biodegradáveis de gelatina de peixe com antocianinas obtidas do extrato purificado de açaí;
- Verificar a influência do extrato purificado do açaí adicionado no filme através do estudo das propriedades físicas dos filmes;
- Avaliar o comportamento do filme como embalagem inteligente indicadora de pH quando utilizado como indicador da deterioração de filés de peixe, durante armazenamento.

### **3 ESTRUTURA DA DISSERTAÇÃO**

O presente estudo foi organizado em capítulos que estão descritos da seguinte forma:

**CAPÍTULO I** – REVISÃO DA LITERATURA.

**CAPÍTULO II** – DESENVOLVIMENTO E OTIMIZAÇÃO DE FILME INDICADOR DE pH COMPOSTO DE GELATINA DE PELE DE PEIXE E EXTRATO PURIFICADO DO AÇAÍ (*Euterpe oleracea*).

**CAPÍTULO III** –FILME DE GELATINA COM EXTRATO PURIFICADO DO AÇAÍ (*Euterpe oleracea*) COMO INDICADOR DA DETERIORAÇÃO DE FILÉS DE PEIXE.

# CAPÍTULO I

## 1 REVISÃO DE LITERATURA

### 1.1 APROVEITAMENTO DE RESÍDUOS DA INDÚSTRIA DE PESCADO

No Brasil, o aproveitamento dos resíduos de pescado é restrito, e milhares de toneladas desse subproduto são produzidos e descartados pelas unidades beneficiadoras anualmente em razão, principalmente, da falta de reconhecimento deste recurso como matéria-prima e fonte para outros produtos e também pela falta de um destino adequado, levando ao descarte no meio ambiente gerando sérios problemas de poluição ambiental (BORGHESI, 2008). A região Norte é uma das regiões com maior participação quanto ao volume produzido no Brasil, sendo fortemente influenciada por possuir um ecossistema bem característico quanto ao clima (PINHEIRO; FRÉDON, 2004).

De acordo com Tchoukanova et al. (2012) uma grande quantidade de resíduos de peixe é descartada no oceano, e as bactérias aeróbias presentes na água, que realizam a quebra da matéria orgânica na presença de oxigênio, acabam utilizando mais oxigênio, o que acarreta na redução considerável do mesmo na água. A redução no teor de oxigênio da água cria condições anaeróbicas, ocasionando a liberação de gases poluentes, como amônia, ácidos orgânicos e sulfeto de hidrogênio assim como gases de efeito estufa, como o metano e o dióxido de carbono. Sendo assim, o aproveitamento dos resíduos de pescado, além de diminuir o problema de resíduos orgânicos, reduziria os impactos ambientais e traria vantagens econômicas para as indústrias, visto que seu aproveitamento pode agregar valor comercial (AGUIAR et al. 2014).

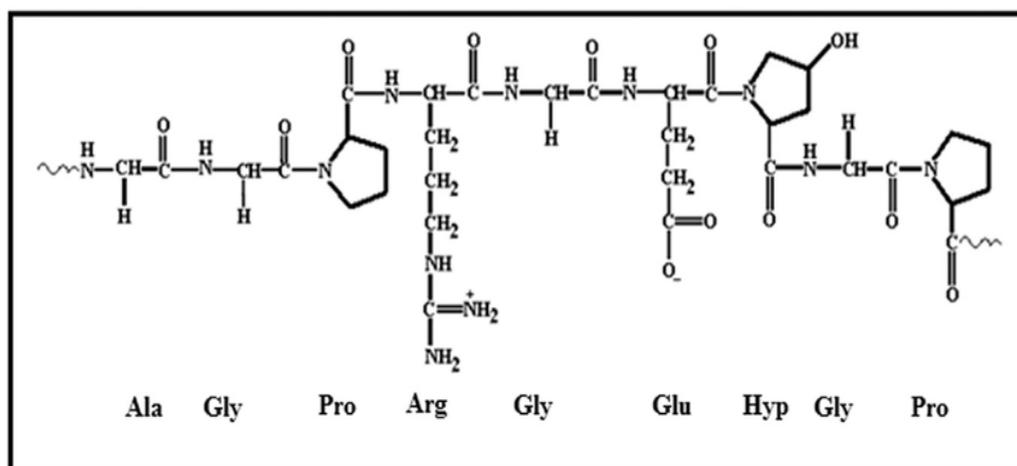
Os resíduos de peixe são constituídos em maioria por pele, cauda cabeça, barbatanas entre outros. Esses subprodutos podem ser fonte de proteínas e aminoácidos, óleo, enzimas, colágeno e gelatina. Em relação ao valor nutricional desses resíduos, eles contêm alto teor de proteínas, gordura e minerais. Além disso, possuem também os ácidos monoinsaturados, ácido palmítico e ácido oleico são abundantes nos resíduos de peixe (GHALY et al. 2013).

Com relação a gelatina, ela pode ser utilizada em diversas aplicações e os últimos anos, em especial na obtenção de filmes biodegradáveis (HOQUE et al. 2011; NUR HANANI et al. 2014; SILVA et al. 2018).

## 2.2 GELATINA DE PEIXE

A gelatina (Figura 1) é uma proteína derivada da hidrólise parcial do colágeno, que pode formar três cadeias  $\alpha$  independentes, uma cadeia  $\beta$  e uma  $\alpha$ , ou apenas uma cadeia  $\gamma$ . A principal diferença entre as formas  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$  da gelatina é o seu peso molecular (KARIM; BHAT, 2009). A desnaturação térmica ou degradação física e química do colágeno envolve a quebra da estrutura de tripla hélice em espirais aleatórias que formam a gelatina. Essa estrutura de rede e as propriedades físicas das gelatinas ocorrem principalmente devido sua fonte e as condições de extração. De modo geral, a gelatina quando extraída em temperaturas baixas se torna mais rígida, exibindo maior força de gel (BIGI et al. 2004).

A gelatina é composta por aproximadamente 19 aminoácidos; e caracterizada pelo alto conteúdo de glicina, prolina e hidroxiprolina. A variação do conteúdo desses aminoácidos, principalmente os aminoácidos (prolina e hidroxiprolina) ocasionará uma menor formação de pontes de hidrogênio da gelatina em soluções aquosas, com a consequente redução da temperatura de geleificação (NORLAND, 1990).



**Figura 1.** Estrutura da gelatina.

Fonte: Devi et al. (2016).

A funcionalidade da gelatina está diretamente relacionada com suas propriedades físico-químicas e estruturais, sendo estas determinantes para definir sua aplicação (WARDS, COURTS, 1977). Uma das propriedades mais importante da gelatina é a força do gel, e esta característica indica seu valor comercial (CHO et al. 2004). Outras propriedades também importantes são a viscosidade, a gelificação e o

ponto de fusão, que são afetadas por fatores, como composição e peso molecular dos aminoácidos, concentração da solução de gelatina, tempo e temperatura de maturação do gel, pH e teor de sal (CHOI; REGENSTEIN, 2000; GÓMEZ-ESTACA et al. 2009).

As proteínas de peixe, incluindo a gelatina de peixe, têm sido amplamente utilizadas como materiais formadores de filmes para serem utilizados como embalagens biodegradáveis de alimentos (JRIDI et al. 2013; BLANCO-PASCUAL; FERNANDEZ-MARTÍN; MONTERO, 2014; ATHAILLAH; PARK, 2016). A gelatina é capaz de formar uma matriz contínua e coesa de filme (GARCIA; SOBRAL, 2005), como também filmes claros e flexíveis (LIMPISOPHON et al. 2009). Além disso, os filmes obtidos da gelatinapodem ser usados como portadores de componentes bioativos (ETXABIDE, 2017).

Para obtenção da gelatina de peixe, a pele de peixe deve passar por pré-tratamentos, que podem utilizar meios ácidos, alcalinos ou um processo misto (ácidos e básicos). A extração da gelatina, propriamente dita, só ocorre em temperaturas acima de 40°C, o que provoca a desnaturação parcial do colágeno, dando origem à quebra da molécula de colágeno em pequenos fragmentos e as triplas hélices são separadas, fazendo com que o peso molecular varie dependendo da preparação e fonte da matéria prima (GOMEZ-GUILLÉN et al. 2007; WANG et al. 2008).

A extração da gelatina também é diretamente influenciadapelo pH do meio, e dependendo do pré-tratamento do colágeno, dois diferentes tipos de gelatina podem ser produzidos, com diferentes características: gelatina do tipo A (ponto isoelétrico a pH 6-9) produzida por tratamento ácido do colágeno; e a do tipo B (ponto isoelétrico a pH 5) a partir de tratamento alcalino do colágeno (STAINSBY, 1987).

A gelatina de peixe tem se tornado a matéria prima preferida na produção de embalagens biodegradáveis, pois além de ser bastante abundante na natureza, muitas pesquisas demonstraram que possui excelentes propriedades para formar filmes, com relativa solubilidade em água e alta extensibilidade (JONGJAREONRAK et al. 2006; GÓMEZ-GUILLÉN et al. 2007; ZHANG et al. 2007; CARVALHO et al. 2008; WENG; ZHENG, 2015).

### 2.3 POLIMEROS E FILMES BIODEGRADÁVEIS

Os materiais utilizados em embalagens plásticas nem sempre podem ser reciclados, visto quesão frequentemente contaminados com alimentos e/ou substâncias

biológicas. Consequentemente, menos de 3% dos 500 bilhões de embalagens plásticas distribuídas no mercado a cada ano são recicladas (MALATHY et al. 2014). Os plásticos possuem como vantagem sua ampla disponibilidade a um custo relativamente baixo, e também apresentam boas características mecânicas e químicas adequadas para sistemas de embalagem de alimentos (SIRACUSA et al. 2008).

Os materiais poliméricos são compostos sólidos, não metálicos, de pesos moleculares elevados (CALLISTER, 1999). Eles são compostos de macromoléculas repetidas e possuem características variadas dependendo da sua composição. Cada macromolécula que compreende um material polimérico é conhecida como uma unidade mer. Um único mero é chamado de monômero, enquanto as unidades de repetição são conhecidas como polímeros. Uma variedade de materiais (renováveis e não renováveis) é utilizada como fontes de matéria-prima para materiais plásticos modernos. Os plásticos que são formados a partir de matérias prima não renováveis são geralmente a base de petróleo e reforçados com fibras de vidro ou carbono (WILLIAMS et al. 2000).

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

No entanto, pode-se dizer que o uso de polímeros de longa duração para aplicações de curta duração (embalagem, restauração, higiene) não é inteiramente adequado (AVÉROUS, 2000). Uma quantidade enorme de lixo é gerada diariamente, sendo que as embalagens de alimentos desempenham um papel considerável nisso. Este desperdício é composto de muitos tipos diferentes de materiais, alguns não-biodegradáveis e permanecerão sem se decompor por centenas, às vezes milhares de anos. Neste contexto, o desenvolvimento de filmes biodegradáveis para materiais de embalagem que podem ser utilizados como substituto dos polímeros petroquímicos é uma perspectiva interessante, fornecendo alternativa aos produtos não degradáveis (SOUZA; DITCHFIELD; TADINI, 2010).

Um filme biodegradável pode ser designado como uma embalagem primária elaborada a partir de polímeros biodegradáveis e aditivos de qualidade alimentar (GALUS; KADZIŃSKA, 2015; HAN, 2005). Os biopolímeros tornaram-se

alternativas aos materiais de embalagem sintética que acarretam grande impacto negativo no meio ambiente. Os filmes de biopolímero podem melhorar a qualidade do alimento, servindo como barreiras seletivas à transferência de umidade, absorção de oxigênio, oxidação lipídica e perdas de compostos de aroma voláteis (CAMPOS, GERSCHENSON; FLORES, 2011).

Os filmes biodegradáveis podem ser feitos de biopolímeros, incluindo proteínas, polissacarídeos e lipídios ou sua combinação, esses biopolímeros são considerados como potenciais substitutos para filmes plásticos não biodegradáveis tradicionais por apresentarem baixo custo, fácil disponibilidade de recursos renováveis e biodegradabilidade (JANJARASSKU; KROCHTA, 2010; ARFAT et al. 2014).

Em comparação com polissacarídeos e lipídios, filmes comestíveis à base de proteínas possuem características valiosas para a produção de embalagens de alimentos devido a sua boa capacidade de formação de filme, propriedades mecânicas e transparência (ARFAT et al. 2014, LACROIX; VU, 2014). As propriedades de filmes à base de proteínas dependem de vários fatores, como a fonte das proteínas, o pH da solução proteica, os plastificantes, as condições de preparação e as substâncias incorporadas nas soluções de formação do filme. No entanto, possuem propriedades relevantes de barreira de oxigênio e dióxido de carbono em condições de baixa umidade relativa em comparação com os filmes sintéticos (CUQ et al. 1995; GERRARD, 2002; PRODPRAN et al. 2007).

Um dos processos mais amplamente utilizados na elaboração de biofilmes é a técnica denominada “*casting*”, que compreende no preparo de uma solução coloidal da macromolécula adicionada ou não de aditivos, aplicação dessa solução num suporte adequado, seguida de secagem em condições estritamente controladas (MONTERREY-QUINTERO; SOBRAL, 2000).

A produção do filme se inicia com a formação do gel, envolvendo ligações inter e intra-moleculares cruzadas entre as cadeias de polímeros, criando uma matriz tridimensional semi-rígida que envolve e imobiliza o solvente utilizado (KESTER; FENNEMA, 1986). O grau de coesão depende da estrutura do polímero, do solvente usado, da temperatura, e da presença de outras moléculas, como os plastificantes (THARANATTHAN, 2003).

### 2.3.1 Propriedades dos filmes biodegradáveis

Define-se como propriedade de barreira a capacidade de resistir à absorção ou à evaporação de gases e vapores, a passagem de luz e à permeação de lipídeos (SARANTÓPOULOS,2002). Filmes à base de gelatina não atuam apenas como barreiras ao oxigênio, dióxido de carbono e compostos voláteis, mas também servem como carreadores de uma grande variedade de aditivos, como antimicrobianos, antifúngicos, antioxidantes, corantes e outros nutrientes (RHIM; NG, 2007; AHMADet al. 2012).

Em relação a permeabilidade ao vapor da água, esta é muito importante pois influência na proteção contra a ação de gases, luz, odores e vapor da água, constituindo assim, uma barreira entre o ambiente externo e o produto(SARANTÓPOULOS, 2002).

De acordo com Müller et al. (2008) e Tongnuanchan et al. (2014), os filmes a base de gelatina de peixe são considerados hidrofílicos e desse modo a permeabilidade ao vapor da água é uma das propriedades mais discutidas, sendo essa propriedade influenciada pelas características intrínsecas do material, pelo teor do plastificante e pelas condições ambientais de umidade relativa e temperatura, às quais se encontram expostos.

Filmes muito permeáveis ao vapor da água não podem ser utilizados para embalar produtos que não possam absorver água como, por exemplo, os desidratados (MORAES et al. 2008; NUNEZ-FLORES et al. 2012).

As propriedades mecânicas dos filmes são parâmetros muito importantes, pois estão relacionadas com a resistência do filme biodegradável, e os obtidos de gelatina são menos resistentes que os sintéticos (GENNADIOS et al. 1994; ZAVAREZE et al. 2012; TONGNUANCHAN et al. 2014). De acordo com Cuq (2002) as propriedades mecânicas dos filmes são influenciadas pela hidrofobicidade da película, comprimento da cadeia do polímero, ligações de hidrogênio e agente plastificante. Além disso, as propriedades mecânicas dos filmes de gelatina são relacionadas com o nível de renaturação da proteína, sendo avaliado através da calorimetria diferencial de varredura (DSC)(BIGI et al. 2000).No entanto, os filmes de gelatina têm baixa propriedade mecânica e térmicas, o que pode limitar seu uso como embalagem de alguns tipos de alimentos (GOMEZ-ESTACA et al. 2009).

A alta solubilidade em filmes biodegradáveis pode ser interessante para embalagens de alimentos desidratados que precisampassar por uma hidratação prévia ao

consumo. No entanto, a maioria das aplicações requer embalagens resistentes à água, como no caso de alimentos com alta atividade de água, ou mesmo para evitar a transpiração de produtos frescos, e para o armazenamento é necessária uma baixa solubilidade do filme(MONTERREY-QUINTERO; SOBRAL,2000; CARVALHO et al. 2008).

## 2.4 EMBALAGENS INTELIGENTES

As embalagens de alimentos tradicionais destinam-se a proteção, comunicação, conveniência e armazenamento (PAINÉ 1991; ROBERTSON 2006). Elas também se comunicam com o consumidor através dos textos escritos nas embalagens, gráficos e logotipos das marcas e se acomodam ao estilo de vida do cliente, se tornando mais conveniente, e armazenam produtos de diferentes formatos e tamanhos, com o objetivo de aperfeiçoar a eficiência logística (YAM; LEE, 2012). A segurança e a preservação do alimento embalado antes do consumo são os principais objetivos em toda a cadeia de fornecimento de alimentos, sendo a preservação da qualidade dos alimentos um alvo importante de pesquisa, pois está intimamente ligada ao objetivo maior, que é de melhorar a qualidade de nossas vidas (SANDULESCU et al. 2011).

Nesse contexto, uma das embalagens que tem contribuído bastante para alcançar um conceito avançado para a obtenção de alimentos mais seguros e saudáveis é o conceito de embalagem inteligente(European Commission, 2004).Embalagens inteligentes são aquelas que, além de proteger, reagem de alguma forma às mudanças em algumas das propriedades do alimento embalado, ou do ambiente no qual está exposto(DAINELLI et al. 2008).

Ao contrário dos componentes ativos, os componentes inteligentes não têm a intenção de liberar seus constituintes para os alimentos. A embalagem inteligente também pode contribuir para melhorar a Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC), que são desenvolvidos para a identificação de alimentos não seguros, apontando possíveis riscos para a saúde e estabelecendo estratégias para reduzir ou eliminar suas ocorrências. A embalagem também ajuda a identificar processos que afetam fortemente os atributos de qualidade e melhorando eficientemente a qualidade final dos alimentos (VANDERROOST et al. 2014; HEISING et al. 2014).

Os sistemas de embalagem inteligente podem ser realizados por três tecnologias principais que são os indicadores, que visam informar os consumidores sobre a

qualidade dos alimentos e trazer uma maior conveniência; suportes de dados, tais como códigos de barras e etiquetas de identificação por radiofrequência, que são mais destinados a questões de armazenamento, distribuição e a rastreabilidade do produto; e os sensores, que permitem uma rápida e definitiva quantificação dos analitos nos alimentos (KERRY et al.,2006). Geralmente, os aplicados em embalagens de produtos cárneos são indicadores de tempo e temperatura, de oxigênio e integridade, ou os de frescor (YAM et al. 2005).

#### **2.4.1 Indicadores de frescor e pH**

Os indicadores podem ser definidos como substâncias que detectam a presença, ausência ou concentração de outra substância ou o grau de reação entre duas ou mais substâncias por meio da mudança de característica. Estas alterações visuais imediatas podem ser detectadas por meio de diferentes intensidades de cor ou outra coloração (HOGAN; KERRY, 2008).

O desenvolvimento de indicadores de frescor é resultado da crescente demanda dos consumidores por alimentos saudáveis e frescos, principalmente nas últimas duas décadas. Estes dispositivos devem ser planejados para que possam permitir o monitoramento da qualidade dos produtos alimentícios durante o armazenamento e o transporte (SIRO, 2012).

Os indicadores de frescor fornecem informações da qualidade do produto resultante do crescimento microbiano ou alterações químicas dentro de um alimento. Essa reação entre os metabólitos de crescimento microbiano e os indicadores integrados dentro da embalagem é o que fornece visualmente a informação sobre a qualidade microbiana do produto (KERRY et al. 2006; KUSWANDI et al. 2014). Devido à deterioração dos alimentos geralmente estar acompanhada por mudança do pH e a inviabilidade de sua detecção no alimento, um sistema de embalagem que muda de cor com a alteração do pH permitiria ao consumidor avaliar o frescor e qualidade no local da compra (VEIGA-SANTOS; DITCHFIELD; TADINI, 2011). A característica fundamental dos corantes indicadores de pH que mudam de cor quando colocados em ambiente ácido ou básico é o elemento-chave desse sensor (PACQUIT et al. 2006). Os indicadores de frescor destinados ao pescado, por exemplo, se baseiam no teor de nitrogênio básico volátil total (NBVT), ou seja, na desaminação, que podem ser detectadas por variações de pH (KUSWANDI et al. 2014)

Pesquisas realizadas com indicadores de pH encontradas na literatura estão baseadas na detecção da variação do pH, devido ao crescimento microbiano (GOLASZ et al. 2013; CHOI et al. 2017; PRIETTO, et al. 2017), e materiais que adquirem ou perdem sua fluorescência com a variação de pH (TSIEN; MIYAWAKI; LLOPIS, 2003). Aminas biogênicas, tais como histamina, putrescina, tiramina e cadaverina têm sido identificadas como indicadores de decomposição de produtos cárneos de origem animal (KANIOU et al. 2001). Yoshida et al. (2014) desenvolveram um indicador de pH colorimétrico que consiste em um filme de quitosana contendo antocianina. Este tipo de indicadores de pH oferece potencial para ser utilizado como indicadores de metabólitos derivados do crescimento microbiano, como n-butirato, ácido L-láctico, D-lactato e ácido acético (KERRY et al. 2006). Outros autores se concentraram na detecção de aminas voláteis, como indicadores de frescor em peixes. As aminas voláteis resultam da degradação do óxido de trimetilamina e são responsáveis pelo odor e sabor de peixe comumente usado como critérios para avaliar a qualidade em peixes (ETIENNE, 2005).

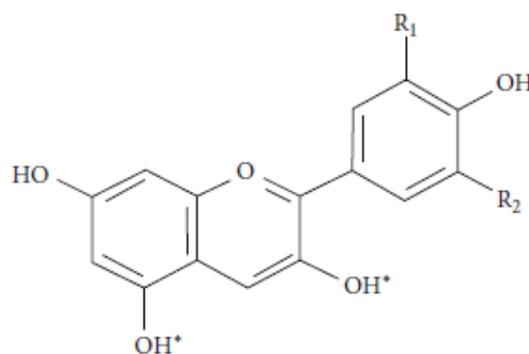
O uso de corantes (por exemplo, azul de bromotimol) como indicadores de pH para indicar a formação de dióxido de carbono, devido ao crescimento microbiano é uma das aplicações mais frequentes na indústria de embalagens de alimentos (HAN; HO; RODRIGUES, 2005). O aumento nos níveis de dióxido de carbono pode ser usado para detectar a contaminação microbiana em alguns produtos devido aos corantes indicadores de pH que reagem com a presença deste subproduto. Outros corantes reagentes indicadores de pH incluem o azul de xilenol, púrpura de bromocresol, vermelho de cresol, vermelho de fenol e alizarina. Além do dióxido de carbono, outros metabólitos (tais como  $\text{SO}_2$ ,  $\text{NH}_4$ , aminas voláteis e ácidos orgânicos) têm sido utilizados como moléculas alvo de monitoração para indicadores de pH (AHVENAINEN, 2003). No entanto, considerando que os corantes sintéticos de pH tradicionais apresentam potenciais efeitos nocivos para os seres humanos, não sendo ideais para embalagens de alimentos, mais recentemente foi dada atenção a pigmentos naturais e seguros, como antocianinas (ZHANG; LU; CHEN, 2014).

## 2.5 ANTOCIANINAS

As antocianinas são flavonóides, um importante subgrupo, dentre os grupos de substâncias orgânicas dos compostos fenólicos (YAO et al. 2004). São pigmentos azuis,

vermelhos ou roxos encontrados em plantas, especialmente flores, frutas e tubérculos. Como as antocianinas são pigmentos hidrossolúveis, sua tonalidade, uma propriedade de cor, é bastante influenciada pelo ambiente em que ela se encontra (SMERIGLIO et al., 2016). Em condição ácida, a antocianina aparece como pigmento vermelho enquanto que a antocianina pigmentada de azul existe em condições alcalinas (LALEH et al. 2006; STOMMEL et al., 2009).

As antocianinas são formadas por dois anéis aromáticos de benzeno que são separados por um heterociclo oxigenado (TANAKA et al., 2008) (Figura 2).

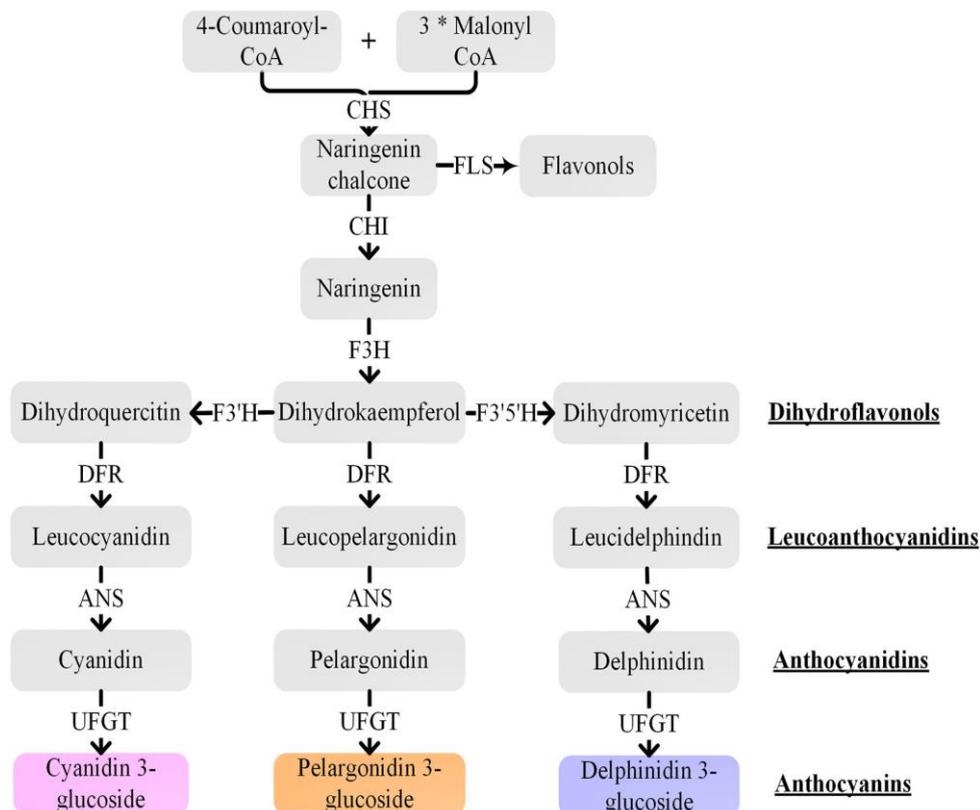


**Figura 2.** Estrutura da Antocianina.

Fonte: KHOO et al. (2017).

A via biossintética da antocianina (Figura 3) ocorre em geral a partir de uma extensão da via dos flavonóides (LIU et al. 2018). Essa via se inicia com uma síntese mediada pela chalcona sintase (CHS) a partir do 4-coumaroil-CoA e malonil-CoA, onde é formada a naringenina chalcona que em seguida é isomerizada pela chalcona isomerase (CHI) se tornando naringenina. A flavanona 3-hidroxilase (F3H) converte naringenina em diidrokaempferol que pode ser hidroxilado ou pelo flavonóide 3'-hidroxilase (F3'H) ou pelo flavonóide 3',5'-hidroxilase (F3'5'H) em dois outros di-hidroflavonóis, que são a di-hidroquercetina ou di-hidromicetina, respectivamente. Logo em seguida, os três di-hidroflavonóis são convertidos em leucoantocianidinas incolores pela enzima di-hidroflavonol 4-redutase (DFR) e depois, através da antocianidina sintase (ANS) em antocianidinas coloridas. Por fim, moléculas de açúcar se ligam as antocianidinas por vários membros da família de enzimas glicosiltransferases, como por exemplo, o flavonóide 3-O-glicosiltransferase (UFGT), podendo ser ainda mais aciladas com grupos acila aromáticos por aciltransferases. A enzima chave inicial da biossíntese de flavonóides é a chalcona sintase, e as principais

enzimas responsáveis pela diversificação da antocianina, determinando sua cor são o F3'H e F3'5'H (TANAKA; BRUGLIERA, 2013).

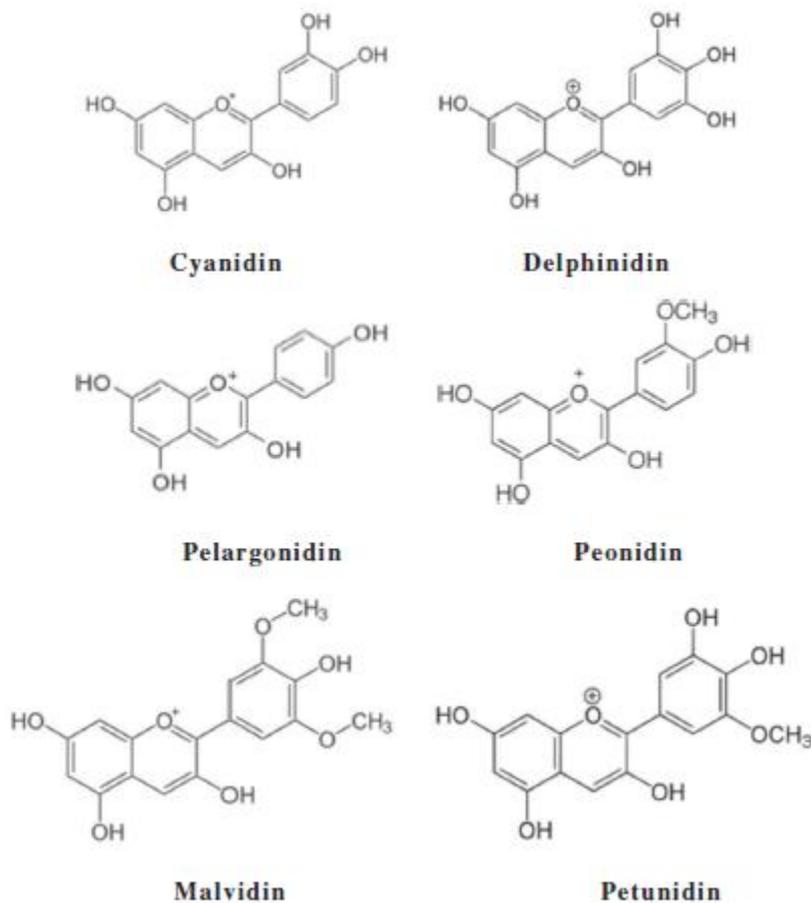


**Figura 3.** Representação da via biossintética da antocianina.

O “\*” significa multiplicação.

Fonte: LIU et al. (2018).

São conhecidos mais de 20 tipos de antocianidinas, no entanto apenas seis são prevalentes nas plantas, sendo elas a cianidina, delfinidina, pelargonidina, peonidina, malvidina e petunidina, sendo a distribuição dessas antocianidinas em frutas e vegetais é de 50%, 12%, 12%, 12%, 7% e 7%, respectivamente (CASTAÑEDA-OVANDO et al. 2009; ZHAO et al., 2014; KHOO et al. 2017) (Figura 4).

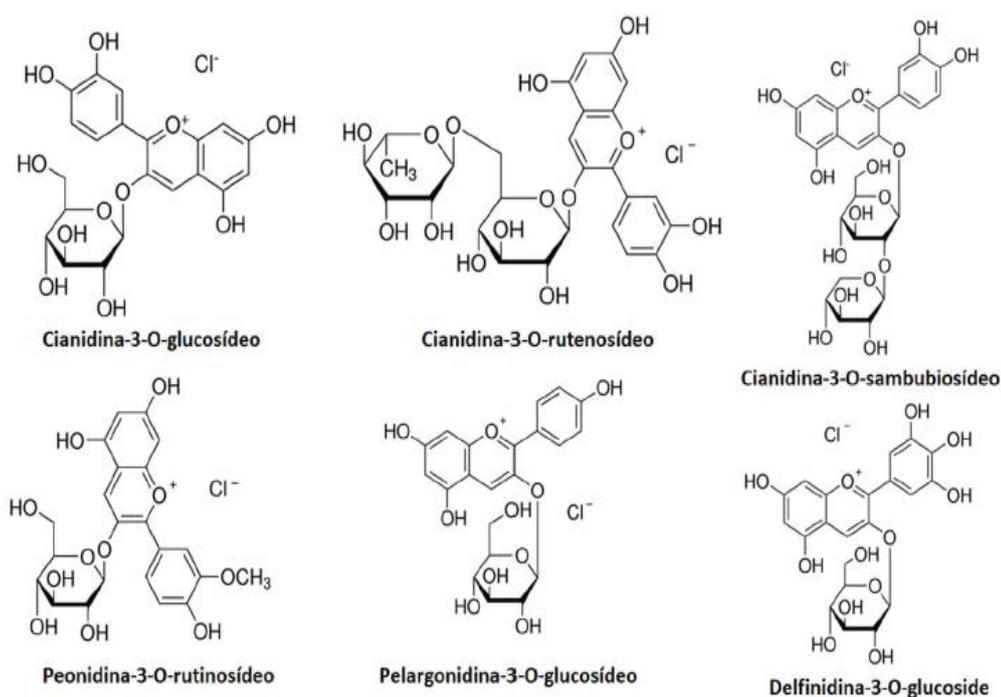


**Figura 4.** Principais Antocianidinas.

Fonte: KHOO et al. (2017).

A cianidina é um pigmento roxo-avermelhado e na natureza é mais encontrada em vegetais da cor vermelha (CEVALLOS-CASALS; CISNEROS-ZEVALLOS 2003). O pigmento que possui maior semelhança química com a maioria das antocianidinas é a delphinidina, sendo um pigmento azul-avermelhado ou roxo nas plantas (KATSUMOTO et al. 2007). A pelargonidina aparece como pigmento vermelho em algumas frutas, e de uma tonalidade laranja a algumas flores (JAAKOLA, 2013). A peonidina é uma antocianidina metilada, bastante encontrada nas plantas, e possui uma cor magenta visível, sendo encontrada em uvas e vinho tinto (BAKOWSKA-BARCZAK, 2005). A malvidina possui uma cor roxa visível, sendo abundante em flores de cor azul, e também o principal pigmento vermelho do vinho tinto (MAZZA; FRANCIS, 1995). A petunidina é um pigmento vermelho escuro ou roxo, solúvel em água, sendo encontradas em pétalas de flores roxas (YABUYA, 1997).

A cor da antocianina é uma característica sensorial importante e muitas vezes um parâmetro de qualidade importante para uma variedade de produtos de frutas. O açaí (*Euterpe oleracea*), uma palmeira nativa da Amazônia brasileira, tem sido foco de crescente atenção internacional pelo seu potencial de antocianinas (PACHECO-PALENCIA; HAWKEN; TALCOTT, 2007). Em um estudo realizado, foram identificadas seis antocianinas (Figura 5) presentes no fruto, sendo elas: cianidina 3-glucosídeos; cianidina 3-rutinosídeo; cianidina-3-sambubiosídeo; peonidina-3-rutinosídeo; pelargonidina-3-glucosídeos, e delphinidina-3-glucosídeos (CARDOSO et al., 2015).



**Figura 5.** Estrutura química das antocianinas encontradas no açaí (*Euterpe oleracea*).

Fonte: CEDRIM et al. (2018).

Outros estudos realizados para determinar o teor de antocianinas presentes no fruto obtiveram valores da quantidade desses flavonóides variando de 12,05 a 24,98 mg/100g segundo Coutinho et al. (2017), e em maior quantidade por Pacheco-Palencia et al. (2009) encontrando um valor de 205,6 mg/100g.

No entanto, uma grande parte das antocianinas presentes nos vegetais são suscetíveis ao calor, luz, pH, oxigênio e algumas enzimas, como a polifenoloxidase, que restringe sua aplicação comercial no processamento de alimentos (CAVALCANTI et al.

2011).Estudos recentes buscam a estabilização química da antocianina devido suas várias aplicações, seus efeitos benéficos e seu uso como alternativa aos corantes artificiais (REIN, 2005).

A estabilidade das antocianinas é dependente do tipo de pigmento da antocianina, co-pigmentos, luz, temperatura, pH, íons metálicos, enzimas, oxigênio e antioxidantes (TURTURICĂ, 2015). Sua estabilidade também é influenciada pelo anel B da estrutura da antocianina epela presença de grupos hidroxila ou metoxila(CASTAÑEDA-OVANDO, 2009).A respeito disso, a condensação ou a interação química das antocianinas foi descrita como um mecanismo de co-pigmentação que aumenta a estabilidade da cor (BIMPILAS et al. 2016).

A cor das antocianinas depende do pH da solução, e isto ocorre devido à estrutura molecular das antocianinas possuir uma natureza iônica (TURTURICĂ, 2015).A sensibilidade ao pH é o principal fator limitante no processamento e utilização das antocianinas, afetando a sua cor e a estabilidade química (CABRITA; FOSSEN; ANDERSEN, 2000).As antocianinas têm quatro estruturas diferentes, que estão em equilíbrio e incluem cátion flavilium, base quinoidal, pseudobase de carbinol e chalcona. As quantidades relativas destas estruturas em equilíbrio são variadas e dependem do pH e estrutura de antocianina (MAZZA; MINITIATI,1993).

Em condições ácidas, algumas das antocianinas aparecem na cor vermelha. As antocianinas têm uma tonalidade roxa em pH neutro enquanto que a cor muda para o azul em pH básico. Os pigmentos de antocianinas de cor vermelha são predominantemente na forma de cátions flavilium (BAKOWSKA-BARCZAK, 2005). Essas antocianinas são mais estáveis em solução de pH ácida, ou seja, em pH baixo o cátionflavilium formado permite que a antocianina seja altamente solúvel em água. A diminuição da concentração de água aumenta a taxa de desprotonação do cátionflavilium, reduzindo a estabilidade da cor (COUTINHO, 2015).

A peonidina (antocianina 3-O-metilada) que possui um tom vermelho cereja em pH baixo, e azul em pH alto, é diferente da maioria das antocianidinas por possuir maior estabilidade em pH alto que a cianidina, pelargonidina e delfidina. Por ser estável em pH alto a peonidina dar uma tonalidade azul as flores, e também é encontrada em frutos vermelhos arroxeados, porém em condições de pH baixo (SEN et al. 1991; CHO et al. 2004). A maioria dos pigmentos de antocianina tem uma alta estabilidade em condições ácidas em comparação com as alcalinas, e a degradação ocorre em pH mais alto.

Cianidina e delphinidina são os exemplos de antocianidina que são estáveis em condições ácidas (KATSUMOTO et al. 2007).

Além das diferentes condições de pH, a co-pigmentação e a temperatura influenciam na mudança de cor das antocianinas. A copigmentação é um fenômeno que acontece quando as antocianidinas são reforçadas por íons metálicos ou flavonóide, ajudando a estabilizar a cor das folhas, flores e frutos da planta (TROUILLAS et al. 2016).

Em relação a temperatura, as antocianinas se mostram mais estáveis em temperaturas mais baixas. Um estudo realizado relatou que em 35° C foi reduzido o teor total de antocianinas na uva para menos da metade da quantidade observada na amostra controle a 25° C (MORI et al. 2007). No entanto, em soluções ricas em antocianinas, o tratamento térmico suave, em torno de 50° C, não pode causar a degradação dos pigmentos de antocianina devido a inativação da enzima polifenoloxidase que oxida as antocianinas (PATRAS et al. 2010).

A estabilização química das antocianinas é o principal foco de estudos recentes, devido às suas aplicações abundantes, potencial, seus efeitos benéficos e sua utilização como alternativa a corantes artificiais (REIN, 2005). Vários tipos de antocianinas têm sido utilizados como indicadores colorimétricos da qualidade dos alimentos por diversos autores (GOLASZ et al. 2013; PEREIRA et al, 2015; CHOI et al. 2017; PRIETTO et al, 2017). Portanto, compostos naturais como as antocianinas apresentam potencial indicador de pH e devem ser estudados (TERCI; ROSSI, 2002).

## REFERENCIAS

AGUIAR, G. P. S.; GOULART, G. A. S. (2013). Utilização de material residual da indústria de pescado para obtenção de óleo e farinha. **Tecnologia & Ciência Agropecuária**, v. 7, 55-60.

AGUIAR, G.P. S.; LIMBERGER, G.M.; SILVEIRA, E.L. (2014). Alternativas Tecnológicas para o Aproveitamento de Resíduos Provenientes da Industrialização de Pescados: **Revista Eletrônica Interdisciplinar**, v. 1, 229-225.

AHMAD, M.; BENJAKUL, S.; PRODPRAN, T.; AGUSTINI, T. W. (2012). Physico mechanical and antimicrobial properties of gelatin film from the skin of unicorn leatherjacket incorporated with essential oils. **Food Hydrocolloids**, v. 28, 189-199.

AHVENAINEN, R. (2003). **Novel Food Packaging Techniques**, Wood head Publishing, Cambridge, p. 11-12.

ARFAT, Y. A.; BENJAKUL, S.; PRODPRAN, T.; OSAKO, K. (2014). Development and characterisation of blend films on fish protein isolate and fish gelatin. **Food Hydrocolloids**, v. 39, 58-67.

ATHAILLAH, Z. A.; PARK, J. W. (2016). Characterization of surimi slurries and their films derived from myofibrillar proteins with different extraction methods. **Food Bioscience**, v.15, 118-125.

AVÉROUS, L.; FAUCONNIER, N.; MORO, L.; FRINGANT, C. (2000). Blends of thermoplastic starch and polyestaramide: processing and properties. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 76, 1117-1128.

BAKOWSKA-BARCZAK A. (2005). Acylated anthocyanins as stable, natural food colorants – A review. **Polish Journal Food Nutrition Science**, v. 2, 107–116.

BIGI A.; BORGHI M.; COJAZZI G.; FICHERA A. M.; PANZAVOLTA S.; ROVERI N. (2000). Structural and mechanical properties of crosslinked drawn gelatin films. **Journal Thermal Analysis**, v. 61, 451.

BIGI, A.; PANZAVOLTA, S.; RUBINI, K. (2004). Relationship between triple-helix content and mechanical properties of gelatin films. **Journal of Biomaterials**, v. 25, 5675-5680.

BIMPILAS, A.; PANAGOPOULOU, M.; TSIMOGIANNIS, D.; OREOPOULOU, V. (2016). Anthocyanin co-pigmentation and color of wine: The effect of naturally obtained hydroxycinnamic acids as cofactors. **Food Chemistry**, v. 197, 39–46.

BLANCO-PASCUAL, N.; FERNANDEZ-MARTÍN, F.; MONTERO, P. (2014). Jumbo squid (*Dosidicus gigas*) myofibrillar protein concentrate for edible packaging films and storage stability. **LWT -Food Science and Technology**, v. 55, 543-550.

BORGHESI, R.; PORTZ, L.; OETTERER, M.; ZYRINO, J. E. P. (2008). Apparent digestibility coefficient of protein and aminoacids of acid, biological and enzymatic silage for Nile tilapia (*Oreochromis Niloticus*). **Aquaculture Nutrition**, v. 14, 242-248.

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

CALLISTER, W.D. (1999). **Materials Science and Engineering: An Introduction**. New York, N.Y.: John Wiley and Sons.

CAMPOS, C. A.; GERSCHENSON, L. N.; FLORES, S.K. (2011) "Development of edible films and coatings with antimicrobial activity". **Food and Bioprocess Technology**, v. 4, 849-875.

CARDOSO, L. M.; NOVAES, R. D.; CASTRO, C. A.; NOVELLO, A. A.; GONÇALVES, R. V.; RICCI-SILVA, M. E.; RAMOS, H. J. O.; ELUZIO, M. C. G.; LEITE, J. P. V. (2015). Chemical composition, characterization of anthocyanins and antioxidant potential of *Euterpe edulis* fruits: applicability on genetic dyslipidemia and hepatic steatosis in mice. **Nutrición Hospitalaria**, v. 32, 702-709.

CARVALHO, R. A.; SOBRAL, P. J. A.; THOMAZINE, M.; HABITANTE, A. M. Q. B.; GIMÉNEZ, B.; GÓMEZ-GUILLÉN, M. C. (2008). Development of edible films based on differently processed Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) skin gelatin. **Food Hydrocolloids**, v. 22, 1117-1123.

CASTAÑEDA-OVANDO A, DE LOURDES PACHECO-HERNÁNDEZ M, PÁEZ-HERNÁNDEZ E. et al. (2009). Chemical studies of anthocyanins: a review. **Food Chemistry**, v. 113, 859– 871.

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

CEDRIM, P. C. A. S.; Barros, E. M. A.; Nascimento, T. G. (2018). Antioxidant properties of acai (*Euterpe oleracea*) in the metabolic syndrome. **Brazilian Journal Food Technology**, v. 21. DOI: dx.doi.org/10.1590/1981-6723.09217.

CEVALLOS-CASALS B. A.; CISNEROS-ZEVALLOS L. (2003). Stoichiometric and kinetic studies of phenolic antioxidants from Andean purple corn and red-fleshed sweetpotato. **Journal Agriculture Food Chemistry**, v. 51, 3313–3319.

CHO, M. J.; HOWARD, L. R.; PRIOR, R. L.; CLARK, J. R. (2004). Flavonoid glycosides and antioxidant capacity of various blackberry, blueberry and red grape genotypes determined by high-performance liquid chromatography/mass spectrometry. **Journal Science Food and Agriculture**, v. 84, 1771–1782.

CHO, S. M.; KWAK, K. S.; PARQUE, D. C.; GU, Y. S.; JI, C. I.; JANG, D. H.; LEE, Y. B.; KIM, S. B. (2004). Processing optimization and functional properties of gelatin from shark (*Isurus oxyrinchus*) cartilage. **Food Hydrocolloids**, v.18, 575-579.

CHOI, S. S.; REGENSTEIN J. M. (2000). Physicochemical and sensory characteristics of fish gelatin. **Journal of Food Science**, v. 65, 194-199.

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

COUTINHO, R. M. P.; FONTES, E. A. F.; VIEIRA, L. M.; BARROS, F. A. R. D.; CARVALHO, A. F. D.; STRINGHETA, P. C. (2017). Physicochemical and microbiological characterization and antioxidant capacity of açai pulps marketed in the states of Minas Gerais and Pará, Brazil. **Ciência Rural**, v. 47. DOI: dx.doi.org/10.1590/0103-8478cr20151172.

COUTINHO, I. B.; FREITAS, A.; MAÇANITA, A. L.; LIMA, J. C. (2015). Effect of water content on the acid–base equilibrium of cyanidin-3-glucoside. **Food Chemistry**, v. 172, 476–480.

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

CUQ, B. (2002). Formation and Properties of Fish Myofibrillar Protein Films and Coating. Em **Protein-Based Film and Coating** (ed. Gennadios, A.). p. 213- 224. New York: ed. CRC Press.

DAINELLI, D.; GONTARD, N.; SPYROPOULOS, D.; ZONDERVAN-VAN DEN BEUKEN AND, E.; TOBBACK, P. (2008). Active and intelligent food packaging: legal aspects and safety concerns. **Trends in Food Science & Technology**, v. 19, S103-S112.

DEVI N.; SARMAH M.; KHATUN B.; MAJI T. K. (2016). Encapsulation of active ingredients in polysaccharide-protein complex coacervates. **Advances in Colloid and Interface Science**. DOI: 10.1016/j.cis.2016.05.009.

ETIENNE, M. (2005). Volatile amines as criteria for chemical quality assessment. Seafood plus Traceability. Project 6.3. **Valid methods for chemical quality assessment**.

ETXABIDE, A.; URANGA, J.; GUERRERO, P.; DE LA CABA, K. (2017). Development of active gelatin films by means of valorisation of food processing waste: A review. **Food Hydrocolloids**, v. 68,192-198.

EUROPEAN COMMISSION (2004). Commission Regulation (EC) No 1935/2004 of 27 October 2004 on materials and articles intended to come into contact with food. **Official Journal of the European Union**.

GALUS, S.; KADZI\_NSKA, J. (2015). Food applications of emulsion-based edible films and coatings. **Trends in Food Science & Technology**, v. 45, 273-283.

GARCIA, F. T.; SOBRAL, P. J. A.(2005).Effect of the thermal treatment of the filmogenic solution on the mechanical properties, color and opacity of films based on muscle protein of two varieties of Tilapia. **LWT –Food Science and Technology**, v. 38, 289-296.

GENNADIOS, A.; MCHUGH, T.H.; WELLER, C.L.; KROCHTA, J.M. (1994). **Edible Coatings and Films Based on Protein**. Em *Edible Coating and Films to Improve Food Quality*. (editado por Krochta, J.M.; Baldivin, E.A. e Nisperos-Carriedo, M.). p. 210-278.

GERRARD, J. A. (2002). Protein–protein crosslinking in food: methods, consequences, applications. **Trends in Food Science and Technology**, v. 13, 391–399.

GHALY A. E.; RAMAKRISHNAN V. V.; BROOKS M. S.; BUDGE S. M.; DAVE D. (2013) Fish Processing Wastes as a Potential Source of Proteins, Amino Acids and Oils: A Critical Review. **Journal Microbial Biochemical Technology**, v. 5, 107-129.

GHAANI, M.; COZZOLINO, C.A.; CASTELLI, G.; FARRIS, S.(2016). An overview of the intelligent packaging technologies in the food sector. **Trends Food Science Technology**, v. 51, 1-11.

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

GÓMEZ-ESTACA, J.; BRAVO, L.; GÓMEZ-GUILLÉN, M. C.; ALEMÁN, A.; MONTERO, P. (2009). Antioxidant properties of tuna-skin and bovine-hide gelatin films induced by the addition of oregano and rosemary extracts. **Food Chemistry**, v.112, 18-25.

GÓMEZ-ESTACA, J.; LÓPEZ-DE-DICASTILLO, C.; HERNANDEZ-MUNOS, P.; CATALÁ, R.; GAVARA, R.(2014). Advances in antioxidant active food packaging. **Trends Food Science Thecnology**, v. 35, 42-51.

GÓMEZ-GUILLÉN, M. C.; IHL, M.; BIFANI, V.; SILVA, A.; MONTERO, P. (2007). Edible films made from tuna-fish gelatin with antioxidant extracts of two different murta ecotypes leaves (*Ugni molinae*). **Food Hydrocolloids**, v. 21, 1133–1143.

HAN, J.; HO, C.; RODRIGUES, E. (2005). **Innovations in Food Packaging**. Elsevier Science & Technology Books, Cap. 9, 138-153.

HEISING J. K.; DEKKER M.; BARTELS P. V.; VAN BOEKEL M. A. (2014). Monitoring the quality of perishable foods: opportunities for intelligent packaging. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 54, 645–654.

HOGAN S. A.; KERRY J. P. (2008). Smart packaging of meat and poultry products. In: KERRY J, BUTLER P (eds) **Smart packaging technologies for fast moving consumer goods**. John Wiley & Sons Ltd. p, 33–59.

HOQUE, S.; BENJAKUL, S.; PRODPRAN, T. (2011). Properties of film from cuttlefish (*Sepia pharaonis*) skin gelatin incorporated with cinnamon, clove and star anise extracts. **Food Hydrocolloids**, v.25, 1085–1097.

HUANG, J. Y.; LI, X.; ZHOU, W. (2015). Safety assessment of nanocomposite for food packaging application. **Trends in Food Science & Technology**. DOI: 10.1016/j.tifs.2015.07.002.

JAAKOLA, L. (2013). New insights into the regulation of anthocyanin biosynthesis in fruits. **Trends Plant Science**, v. 18, 477–483.

JANJARASSKUL, T.; KROCHTA, J.M. (2010). Edible packaging materials. **Annual Review of Food Science and Technology**, p. 415–448.

JONGJAREONRAK, A.; BENJAKULA, S.; VISESSANGUANB, W.; PRODPRANC., T.; TANAKA, M. (2006). Characterization of edible films from skin gelatin of brownstripe red snapper and bigeye snapper. **Food Hydrocolloids**, v. 20, 492–501.

JRIDI, M.; SOUISSI, N.; MBAREK, A.; CHADEYRON, G.; KAMMOUN, M.; NASRI, M. (2013). Comparative study of physico-mechanical and antioxidant properties of edible gelatin films from the skin of cuttlefish. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 61, 17–25.

KANIOU, I.; SAMOURIS, G.; MOURATIDOU, T.; ELEFThERiADOU, A.; ZANTOPOLOUS, N. (2001). Determination of biogenic amines in fresh and unpacked and vacuum-packed beef during storage at 4 °C. **Food Chemistry**, v. 74, 515–519.

KARIM, A. A.; BHAT, R. (2009) Fish gelatin: properties, challenges, and prospects as an alternative to mammalian gelatins. **Food Hydrocolloids**, v. 23, 563–576.

KATSUMOTO, Y.; FUKUCHI-MIZUTANI, M.; FUKUI, Y.; BRUGLIERA, F.; HOLTON, T. A.; KARAN, M.; NAKAMURA, N.; YONEKURA-SAKAKIBARA, K.; TOGAMI, J.; PIGEARE, A.; TAO, G.; NEHRA, N. S.; LU, C.; DYSON, B. K.; TSUDA, S.; ASHIKARI, T.; KUSUMI, T.; MASON, J. G.; TANAKA, Y. (2007). Engineering of the rose flavonoid biosynthetic pathway successfully generated blue-hued flowers accumulating delphinidin. **Plant and Cell Physiologic**, v. 48, 1589–1600.

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

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

KHOO, H. E.; AZLAN, A.; TANG, S. T.; LIM, S. M. (2017) Anthocyanidins and anthocyanins: colored pigments as food, pharmaceutical ingredients, and the potential health benefits, **Food & Nutrition Research**, v. 61. DOI: 10.1080/16546628.2017.1361779.

KOŁODZIESKA, I.; SKIERKA, E.; SADOWSKA, M.; KOŁODZIEJSKI, W.; NIECIKOWSKA, C. (2008). Effect of extracting time and temperature on yield of gelatin from different fish offal. **Food Chemistry**, v. 107, 700–706.

KUSWANDI, B.; JAYUS, OKTAVIANA, R.; ABDULLAH, A.; HENG, L. Y. (2014). A novel on package sticker sensor based on methyl red for real-time monitoring of broiler chicken cut freshness. **Packaging Technology and Science**, v. 27, 69–81.

LACROIX, M.; VU, K. D. (2014). Edible coating and film materials: Proteins. In J. H. HAN (Ed.), **Innovations in food packaging**, p. 277–294.

LALEH, G. H.; FRYDOONFAR, H.; HEIDARY, R.; JAMEEI, R.; ZARE, S. (2006). The effect of light, temperature, pH and species on stability of anthocyanin pigments in four Berberis species. **Pakistan of Journal Nutrition**, v. 5, 90–92.

LIMPISOPHON, K.; TANAKA, M.; WENG, W. Y.; ABE, S.; OSAKO, K. (2009). Characterization of gelatin films prepared from under-utilized blue shark (*Prionaceglauca*) skin. **Food Hydrocolloids**, v. 23, 1993–2000.

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

LIU, Y.; TIKUNOV, Y.; SCHOUTEN, R.E.; MARCELIS, L.F.M.; VISSER, R.G.F.; BOVY, A. (2018). Anthocyanin Biosynthesis and Degradation Mechanisms in Solanaceous Vegetables: A Review. **Frontiers in Chemistry**, v. 6, 52.

MALATHY, A. N.; SANTHOSH, K. S.; NIDONI, U.; (2014). Recent trends of biodegradable polymer: biodegradable films for food packaging and application of nanotechnology in biodegradable food packaging. **Currents Trends in Technogy and Science**, v. 3, 73–79.

MAZZA, G.; FRANCIS, F.J. (1995). Anthocyanins in grapes and grape products. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 35, 341–371.

MAZZA, G.; MINITIATI, E. (1993). **Introduction. In Anthocyanin in Fruits, vegetables, and grains.** Chapter 1, 1-28.

MONTERREY-QUINTERO, E.S.; SOBRAL, P.J. A. (2000). Preparo e caracterização de proteínas miofibrilares de tilápia-do-nylo (*Oreochromis niloticus*) para elaboração de biofilmes. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.35, 179-189.

MORAES, I. C. F.; SILVA, G. G. D.; CARVALHO, R. A.; HABITANTE, A. M. Q. B., BERGO, P. V. A.; SOBRAL, P. J. A. (2008). Influência do grau de hidrólise do poli(vinil álcool) nas propriedades físicas de filmes à base de blendas de gelatina e poli(vinil álcool) plastificados com glicerol. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 28, 738-745.

MORI, K.; GOTO-YAMAMOTO N.; KITAYAMA M.; HASHIZUME, K. (2007). Loss of anthocyanins in red-wine grape under high temperature. **Journal of Experimental Botany**, v. 58, 1935–1945.

MÜLLER, C.; YAMASHITA, F.; LAURINDO, J. B. (2008) Evaluation of effects of glycerol and sorbitol concentration and water activity on the water barrier properties of cassava starch films through a solubility approach. **Carbohydrate Polymer**, v. 72, 82-87.

NORLAND, R. R. (1990). Fish gelatin. Advances in fisheries technology and biotechnology for increased profitability (pp. 325-333). Lancaster: Technomic Publishing Co.

NUNEZ-FLORES, R.; GIMÉNEZ, B.; FERNÁNDEZ-MARTÍN, F.; LÓPEZ-CABALLERO, M. E.; MONTERO, M.P.; Gómez-Guillén, M. C. (2012). Role of lignosulphonate in properties of fish gelatin films. **Food Hydrocolloids**, v.27, 60–71.

NUR HANANI, Z. A.; ROOS, Y. H.; KERRY, Y. H. (2014). Use and application of gelatin as potential biodegradable packaging materials for food products. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 71, 94–102.

PACHECO-PALENCIA, L. A.; DUNCAN, C. E.; TALCOTT, S. T. (2010). Phytochemical composition and thermal stability of two commercial açai species, *Euterpe oleracea* and *Euterpe precatoria*. **Food Chemistry**, v. 115, 1199-1205.

PACHECO-PALENCIA, L.; HAWKEN, P.; TALCOTT, S. (2007). Phytochemical, antioxidant and pigment stability of açai (*Euterpe oleracea* Mart.) as affected by clarification, ascorbic acid fortification and storage. **Food Research International**, v. 40, 620–628.

PACQUIT, A.; LAU, K.T.; MCLAUGHLIN, H.; FRISBY, J.; QUILTY, B.; DIAMOND, D. (2006). Development of a volatile amine sensor for the monitoring of fish spoilage. **Talanta**, v. 69, 515–520.

PAINE, F. A. (1991). **The packaging users handbook**. AVI, Van Nostrand Reinhold, New York, USA.

PATRAS, A.; BRUNTON, N. P.; O'DONNELL, C.; TIWARI, B. K. (2010). Effect of thermal processing on anthocyanin stability in foods; mechanisms and kinetics of degradation. **Trends Food Science Technology**, v. 21, 3–11.

PEREIRA, V. A.; ARRUDA, I.N. Q.; STEFANI, R. (2015). Active chitosan/PVA films with anthocyanins from *Brassica oleracea* (Red Cabbage) as Time-Temperature Indicators for application in intelligent food packaging. **Food Hydrocolloids**, v. 43, 180-188.

PINHEIRO, L. S.; FRÉDON, F. L. (2004). Caracterização geral da pesca industrial desembarcada no estado do Pará. **Revista Científica da UFPA**, v. 4.

POURJAVAHER, S.; ALMASI, H.; MESHKINI, S.; PIRSA, S.; PARANDI, E. (2017). Development of a colorimetric pH indicator based on bacterial cellulose nanofibers and red cabbage (*Brassica oleracea*) extract. **Carbohydratos Polimeros**, v. 156, 193-201.

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

PRODPRAN, T.; BENJAKUL, S.; ARTHAN, A. (2007). Properties and microstructure of protein-based film from round scad (*Decapterus maruadsi*) muscle as affected by palm oil and chitosan incorporation. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 41, 605–614.

QIU, G.; WANG, D.; SONG, X.; DENG, Y.; ZHAO, Y. (2018). Degradation kinetics and antioxidant capacity of anthocyanins in air-impingement jet dried purple potato slices. **Food Research International**, v. 105, 121–128.

REIN, M. (2005). **Copigmentation reactions and color stability of berry anthocyanins**, University of Helsinki, Helsinki, p. 10–14.

RHIM, J. W.; NG, P. K. W. (2007). Natural biopolymer-based nanocomposite films for packaging applications. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 47, 411–433.

ROBERTSON, G. (2006). **Food Packaging Principles and Practices** (Taylor & Francis, Boca Raton).

SANDULESCU, R.; CRISTEA, C.; HARCEAGA, V.; BODOKI, E. (2011). Electrochemical sensors and biosensors for the pharmaceutical and environmental analysis. **Environmental Biosensors**, v. 5, 277–304.

SARANTÓPOULOS, C.I.G.L.; OLIVEIRA, L.M.; PADULA, M. (2002). **Embalagens Plásticas Flexíveis: principais polímeros e avaliação das propriedades**. Campinas: CETEA/ITAL.

SEM, L.T.; SAITO, N.; YOKOI, M.; SHIGIHARA, A.; HONDA, T. (1991). An acylated peonidin glycoside in the violet-blue flowers of *Pharbitis nil*. **Phytochemistry**, v. 30, 2387–2390.

SILVA, N. S.; HERNÁNDEZ, E. J. G. P.; ARAÚJO, C. S.; JOELE, M. R. S. P., LOURENÇO, L. F. H. (2018). Development and optimization of biodegradable fish gelatin composite film added with buriti oil, **CyTA - Journal of Food**, v. 16, 340–349.

SIMÕES, A.S.; MORI, R. Y.; FARIA, R.; CASTRO, H.F. (2011). Desempenho da matriz híbrida Sio<sub>2</sub>-quitosana na imobilização da lipase microbiana de *Candida rugosa*. **Quimica Nova**, v. 34, 33–38.

SIRACUSA, V.; ROCCULI, P.; ROMANI, S.; DALLA ROSA, M. (2008). Biodegradable polymers for food packaging: a review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 19, 634–643.

SIRO, I. (2012). Active and intelligent packaging of food. In Bhat, R., Alias, A. K., & Paliyath, G. **Progress in Food Preservation**, p. 23–48.

SMERIGLIO, A.; BARRECA, D.; BELLOCCO, E.; TROMBETTA, D. (2016). Chemistry, pharmacology and health benefits of Anthocyanins. **Phytotherapy Research**, v. 30, 1265–1286.

SOUZA, A. C.; DITCHFIELD, C.; TADINI, C. C. (2010). Biodegradable films based on biopolymers for food industries. In M. L. PASSOS, C. P. RIBEIRO (Eds), **Innovation in Food Engineering: New techniques and products**, Boca Raton, FL: CRC, p. 511–537.

STAINSBY, G. (1987). Gelatin gels. In A. M. PEARSON, T. R. DUTSON; A. J. BAILEY. Collagen as food. **Advances in meat research**, v. 4, 209–222.

STOMMEL, J. R.; DUMM, J. M. (2015). Coordinated regulation of biosynthetic and regulatory genes coincides with Anthocyanin Accumulation in developing eggplant fruit. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v. 140, 129–135.

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

TANAKA, Y.; BRUGLIERA, F. (2013). Flower colour and cytochromes P450. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**.

TCHOUKANOVA, N.; GONZÁLEZ, M.; POIRIER, S. (2012). Best Management Practices: Marine Products Processing. **The Fisheries and Marine Products Division of the Coastal Zones Research Institute Inc.**

TERCI, D.; ROSSI, A. (2002). Indicadores naturais de pH: Usar papel ou solução? **Química Nova**, v. 4, 684 – 688.

THARANATHAN, R.N. (2003). Biodegradable films and composite coatings: past, present and future. **Trends in Food Science & Technology**, v.14, 71-78.

TONGNUANCHAN, P.; BENJAKUL, S.; PRODPRAN, T. (2014). Comparative studies on properties and antioxidative activity of fish skin gelatin films incorporated with essential oils from various sources. **International Aquatic Research**, v.6, 62.

TROUILLAS, P.; SANCHO-GARCÍA, J. C.; DE FREITAS, V.; GIERSCHNER, J.; OTYEPKA, M.; DANGLES, O. (2016) Stabilizing and modulating color by copigmentation: insights from theory and experiment. **Chemical Review**, v. 116, 4937–4982.

TSIEN, R. Y.; MIYAWAKI, A.; LLOPIS, J. (2003). “**Fluorescent protein sensors for measuring the pH of a biological sample**”, U.S. Patent 6,627,449.

TURTURICĂ, M.; OANCEA, A. M.; RÂPEANU, G.; BAHIRM, G. (2015). Anthocyanins: naturally occurring fruit pigments with functional properties. Ann UnivDunarea de Jos Galati. Fascicle VI: **Food Technology**, v. 39, 9–24.

URANGA, J.; ETXABIDE, A.; GUERRERO, P.; DE LA CABA, K. (2018). Development of active fish gelatin films with anthocyanins by compression molding. **Food Hydrocolloids**, v. 84, 313–320.

VANDERROOST, M.; RAGAERT, P.; DEVLIEGHERE, F.; MEULENAER, B. D. (2014). Intelligent food packaging: The next generation. **Trends Food Science and Technology**, v. 39, 47–62.

VEIGA-SANTOS, P.; DITCHFIELD, C.; TADINI, C. (2011). Development and Evaluation of a Novel pH Indicator Biodegradable Film Based on Cassava Starch. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 120, 1069–1079.

WANG, Y.; YANG, H.; REGENSTEIN, J. M. (2008). Characterization of fish gelatin at nanoscale using atomic force microscopy, **Food Biophysics**, v. 3, p. 269-272.

WARDS, A.G.; COURTS, A. (1977). **The science and technology of gelatin**. New York: Academic, 580p.

WENG, W.; ZHENG, H. (2015). Effect of transglutaminase on properties of tilapia scalegelatin films incorporated with soy protein isolate. **Food Chemistry**, v.169, 255–60.

WILLIAMS, G.; POOL, R. (2000). Composites from natural fibers and soy oil resins. **Applied Composite Materials**, v. 7, 421-432.

YABUYA, T.; NAKAMURA, M.; IWASHINA, T.;YAMAGUCHI, M.; TAKEHARA, T. (1997) Anthocyanin-flavone copigmentation in bluish purple flowers of Japanese garden iris (*Iris ensata* Thunb). **Euphytica**, v. 98, 163–167.

YAM, K. L.; LEE, D. S. (2012). Emerging food packaging technologies: An overview. In Yam, K. L.; Lee, D. S. (Eds.), **Emerging Food Packaging Technologies: Principles andPractice**, p 1–9.

YAM, K. L.; TAKHISTOV, P. T.; MILTZ, J. (2005). Intelligent packaging: concepts and applications. **Journal of Food and Science**, v. 70, 1–10.

YAO, L. H.; JIANG, Y. M.; SHI, J. F. A.; TOMAS-BARBER, D. R. N.; SINGANUSONG, C.; CHEN S. S. (2004). **Plant Foods for Human Nutrition**,v. 59, 113–122.

YILDIRIM, S.; RÖCKER, B.; PETTERSEN, M. K.; NILSEN-NYGAARD, J.; AYHAN, Z.; RUTKAITE, R.; RADUSIN, T.; SUMINSKA, P.; MARCOS, B.; COMA, V. (2018). Active packaging applications for food. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 17, 165–199.

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

ZAVAREZE, E. R.; HALAL, S.L.M.; TELLES, A. C.; HERNANDES, P. (2012). Biodegradable films based on myofibrillar proteins of fish. **Brazilian Journal of Food Technology**,v.15, 53-57.

ZHAI, X.; LI, Z.; ZHANG, J.; SHI, J.; ZOU, X.; HUANG, X.; ZHANG, D.; SUN, Y.; YANG, Z.; HOLMES M.; GONG Y.; POVEY M. (2018). Natural Biomaterial Based Edible and pH-Sensitive Films Combined with Electrochemical Writing for Intelligent Food Packaging. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. DOI: 10.1021/acs.jafc.8b04932.

ZHANG, S.; WANG, Y.; HERRING, J. L.; OH, J. H. (2007). Characterization of edible film fabricated with channel catfish (*Ictalurus punctatus*) gelatin extract using selected pretreatment methods. **Journal of Food Science**, v. 72, 498-503.

ZHANG, X.; LU, S.; CHEN, X. (2014). A visual pH sensing film using natural dyes from *Bauhinia blakeana* Dunn.**Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 198, 268–273.

ZHAO, C. L.; CHEN, Z. J.; BAI, X. S.; DING, C.; LONG, T. J.; WEI, F. G.; MIAO, K. R. (2014). Structure-activity relationships of anthocyanidin glycosylation. **Molecular Diversity**, v. 18, 687–700.

## CAPITULO II

DESENVOLVIMENTO E OTIMIZAÇÃO DE FILME INDICADOR DE pH COMPOSTO DE GELATINA DE PELE DE PEIXE E EXTRATO PURIFICADO DE AÇAÍ (*Euterpe Oleracea*).

**RESUMO:** Este estudo teve como objetivo determinar as melhores concentrações de gelatina de peixe e extrato de açaí (*Euterpe oleracea*), para preparar filme biodegradável indicador de pH. Um Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) 2<sup>2</sup> foi empregado para avaliar duas variáveis independentes (concentração de gelatina e extrato do açaí) e duas variáveis dependentes (permeabilidade ao vapor de água e solubilidade). Os resultados indicaram que as melhores concentrações para preparar o filme foram 1,79% (p / v) gelatina de peixe e 0,097% (p /v) de extrato do açaí. O filme controle foi preparado com 1,79% (p / v) de gelatina. A adição do extrato do açaí resultou no escurecimento dos filmes, no aumento da elongação, e reduziu a solubilidade, no entanto houve um aumento da permeabilidade ao vapor de água. Esses resultados indicam que o extrato de açaí é capaz de melhorar algumas propriedades dos filmes de gelatina de peixe, sendo importante considerar o estudo da aplicação desse filme como embalagem inteligente indicadora de pH.

**Palavras-chaves:**gelatina; otimização; filme biodegradável; extrato do açaí.

## 1 INTRODUÇÃO

Uma das principais preocupações dos países industrializados é a grande quantidade de resíduos biológicos principalmente devido ao desperdício de alimentos causados por produtores, varejistas e consumidores. Este desperdício além dos impactos ambientais tem implicações econômicas, pois os resíduos podem ser utilizados em diversas aplicações como, por exemplo, como embalagem biodegradável, que pode ser uma alternativa para diminuir o uso de plásticos derivados do petróleo (WU et al. 2014; GUERRERO et al. 2015; CAO et al. 2018; SILVA et al. 2018).

A tecnologia de embalagem de alimentos tem evoluído devido aos grandes desafios impostos pela sociedade moderna, que além das funções tradicionais das embalagens, buscam alimentos com maior durabilidade, seguros e saudáveis (REALINI; MARCOS, 2014; BENBETTAÏEB et al. 2015). Neste contexto, a criação de embalagens de alimentos inteligentes e/ou ativas com materiais inteligentes e/ou ativos, aliadas ao uso de resíduos biopoliméricos como matéria prima, é uma tentativa de garantir maior segurança e qualidade aos produtos embalados, sem afetar o meio ambiente (DAINELLI et al. 2008; RESTUCCIA et al., 2010).

Embalagem inteligente é definida como um sistema de embalagem que pode monitorar e informar as condições dos alimentos aos consumidores em tempo real (PEREIRA; DE ARRUDA; STEFANI, 2015). Dispositivos inteligentes geralmente estão contidos nestas embalagens, como por exemplo, o indicador de pH (KERRY et al., 2006).

Indicadores de pH colorimétrico possuem diversas vantagens como sua facilidade de utilização e o baixo custo, podendo serem utilizados em embalagens de alimentos para monitorar as mudanças que ocorrem no produto embalado (CO<sub>2</sub>, aminas, amônia) indicando ao consumidor se o alimento está ou não próprio para uso (SILVA-PEREIRA et al. 2015; GHAANI et al. 2016). Normalmente esses indicadores fundamentam-se em corantes sintéticos sensíveis ao pH e uma matriz sólida para reter o corante, no entanto, o uso de compostos sintéticos devem ser evitados por seus potenciais efeitos nocivos à saúde (ZHANG; LU; CHEN, 2014). Em contrapartida, corantes naturais são vantajosos devido à sua segurança e característica ecológica, sendo alternativas para o uso em materiais de embalagens biodegradáveis (MA; WANG, 2016; MA et al. 2017).

As antocianinas são um grande grupo de corantes naturais usados para monitorar variações de pH devido à presença de substâncias fenólicas ou conjugadas que são apresentam mudanças estruturais quando há uma variação no pH (SHAHID; MOHAMMAD, 2013). Neste contexto, diversos vegetais são fonte de antocianinas e ricos em antioxidantes, como os polifenóis, que são usados em aplicações farmacêuticas, médicas e alimentícias (GOMEZ-GUILLÉN et al. 2009; FREILE-PELEGRÍN; ROBLEDO, 2014).

O açaí (*Euterpe olerarea*) é uma palmeira nativa da floresta amazônica brasileira, sendo uma das principais árvores que produzem o palmito. Além disso, o açaizero também produz um fruto com grandes propriedades nutricionais e alto valor para as indústrias de alimentos e de cosméticos. Tem sido descrito como uma fruta calórica e rica em proteínas, ácidos graxos poliinsaturados, açúcares, assim como carotenóides e antocianinas que estão entre seus principais componentes (DARNET et al. 2011; PERIS et al. 2018). Existe na literatura diversos estudos do uso de biopolímeros e antocianinas para a produção de indicadores de pH (PEREIRA et al. 2015; MUSSO et al. 2016; PRIETTO et al 2017; CHOI et al. 2017), porém o uso do açaí como material para a produção de embalagens indicadores de pH ainda não foi estudado.

Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi estabelecer as condições ótimas para desenvolver filme biodegradável de gelatina de peixe com adição de extrato purificado do açaí como indicador de pH, utilizando Delineamento Composto Central Rotacional  $2^2$  (DCCR).

## 2 MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1 MATERIAL

Foi utilizada pele de peixe da espécie pescada amarela (*Cynoscion acoupa*), proveniente do processo de filetagem, da indústria de pesca Ecomar (Vigia-PA, Brasil), para a produção da gelatina. O extrato purificado seco do açai (*Euterpe oleracea*) (Amazon Dreams, Brasil) foi utilizado como indicador de pH.

### 2.2 MÉTODOS

#### 2.2.1 Extração da gelatina de pele de pescada amarela (*Cynoscion acoupa*)

A extração da gelatina foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Silva et al. (2018) com adaptações do tempo e temperatura de imersão, obtidas em ensaios preliminares. As peles foram cortadas 4cm x 4cm, lavadas em água corrente e imersas em solução de cloreto de sódio 0,6 M 1:5 (peso/volume) por 15 minutos, sob agitação de 85 rpm a 25°C em incubadora Shaker (Luca-223, Brasil). Em seguida o material foi submerso em solução de hidróxido de sódio a 0,3M 1:5 (peso/volume) por 15 minutos, sob agitação constante e lavada em água corrente. Posteriormente foi imerso em solução de ácido acético 0,02 M 1:5 (peso/volume) por uma hora sob agitação e lavado em água corrente. A fase seguinte de extração foi realizada com água destilada em banho maria (Tecnal, Te-057, Brasil) por 6 h a 60 °C, mantendo 1:5 (peso/volume). Após a extração, o filtrado obtido foi colocado em bandejas de inox, congelado em freezer a -23°C e liofilizado a -50°C/36 horas (Liotop- L101, Brasil). Finalmente a gelatina obtida foi embalada a vácuo (Embaladora Fastvac, F200, Brasil) e armazenada a -23°C até a realização dos filmes.

#### 2.2.2 Elaboração dos filmes

Os biofilmes foram obtidos de acordo com Silva et al. (2018) com modificação do material adicionado. As concentrações de extrato seco do açai utilizada no delineamento foram definidas a partir de ensaios preliminares, evitando filmes muito claros ou muito escuros, conforme Veiga-Santos; Datchfield; Tadini (2010).

Diferentes concentrações de gelatina de peixe e extrato seco do açai foram misturadas com água destilada (p/v) por suspensão, de acordo com o Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) fixando a concentração do plastificante (glicerol)

em 15% em relação a massa de gelatina de peixe. As soluções filmogênicas contendo gelatina em diferentes concentrações, plastificante e água destilada foram colocadas em banho-maria por 20 minutos a 60°C para solubilizar a gelatina. Após atingir a temperatura ambiente ( $\pm 25^\circ$ ), o pH das soluções foi ajustado para 4,5 com ácido cítrico 2M. Em seguida, diferentes concentrações de extrato seco do açaí foram misturadas às soluções e foram homogeneizadas (Turratec/Tecnal, TE-102) a 10.000 rpm durante 5 minutos. De acordo com o método *casting*, 130mL das soluções filmogênicas obtidas foram adicionadas em suporte de silicone (22cm de diâmetro x 3cm de altura), e secas a 35°C por 16hs em estufa com circulação e renovação de ar (Tecnal, TE 394/7). Após a secagem, os filmes foram acondicionados em embalagem de polietileno, selados (Embaladora Fastvac, F200, Brasil) e armazenados a temperatura ambiente até serem analisados. O mesmo procedimento foi realizado para o filme controle (sem adição de extrato do açaí).

### 2.2.3 Delineamento Composto Central Rotacional

Para estabelecer a melhor combinação de gelatina e antocianina no filme obtido, foi realizado um Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) de segunda ordem (2<sup>2</sup>). O delineamento foi composto de 11 experimentos, sendo 4 ensaios fatoriais (combinação entre os níveis  $\pm 1$ ), 4 ensaios com pontos axiais -  $\alpha$  e +  $\alpha$ , e 3 repetições no ponto central (Tabela 1). As variáveis independentes foram as concentrações de gelatina e antocianina; e as variáveis dependentes foram permeabilidade a vapor de água (PVA) e solubilidade.

**Tabela 1.** Definição dos níveis das variáveis estudadas na obtenção do filme.

FATORES (%)	$-\alpha$ (-1,414)	-1	0	+1	$+\alpha$ (1,414)
Gelatina de peixe (GP)	1,79	2	2,5	3	3,20
Extrato do açaí (EA)	0,065	0,075	0,097	0,120	0,128

### 2.2.4 Determinação das propriedades dos filmes

As espessuras dos biofilmes foram medidas utilizando um micrômetro digital com resolução de 0,001 mm (Insize, modelo IP54) em oito locais aleatórios obedecendo um afastamento da borda de 60 mm (LIMPAN et al. 2010).

A permeabilidade a vapor de água foi realizada utilizando o método modificado ASTM (American Society for Testing and Materials, 1989) descrito por Arfat et al. (2014). Os filmes foram colocados em recipiente de permeação de vidro com 4,5 cm de diâmetro e 7,0 cm de altura contendo 10g de sílica gel seca (0% UR; 0 Pa de pressão de vapor de água a 30 °C) com adesivo de silicone. Em seguida, os recipientes de permeação foram colocados em dessecadores com água destilada a 30 °C (99% de UR; 4244,9 Pa de pressão de vapor a 30 °C) e pesados após 17 horas. A PVA dos filmes foi calculada com a Equação 2.1 e a análise foi realizada em triplicata.

$$PVA = W.X/A.t.\Delta P \quad (2.1)$$

Onde: PVA: permeabilidade ao vapor de água ( $\text{g. m}^{-2}.\text{s}^{-1}.\text{Pa}^{-1}$ ); W: ganho de peso pelo dessecante (g); X: espessura do filme (mm); A: área da superfície do biofilme exposto ( $\text{m}^2$ ) t: tempo de incubação (segundos);  $\Delta P$ : diferença de pressão parcial (Pa).

A resistência à tração (RT) e a alongação (%E) dos filmes foram determinadas em temperatura ambiente, empregando a metodologia ASTM D882-91 (ASTM, 1996) descrita por Limpan et al. (2010), utilizando texturômetro (CT3, Brookfield), na qual a separação inicial das garras e a velocidade da probe foram de 20 mm e  $1 \text{ mm.s}^{-1}$ , respectivamente. Os filmes foram cortados em pedaços de 60 mm x 25 mm (comprimento x largura) e a RT e %E foram calculadas conforme as Equações 2.2 e 2.3, respectivamente. A análise foi realizada em triplicata.

$$RT = F_m/A \quad (2.2)$$

Onde: RT: Resistência à tração (MPa);  $F_m$ : Força máxima no momento da ruptura do filme (N); A: área da secção transversal do filme ( $\text{m}^2$ ).

$$E = d_t/d_{\text{inicial}} \times 100 \quad (2.3)$$

Onde: E: alongação (%);  $d_t$ : distância total no momento da ruptura (mm);  $d_{\text{inicial}}$ : distância inicial de separação das garras.

Para avaliar a solubilidade, os filmes foram recortados em discos de 2 cm de diâmetro e determinada a matéria seca inicial em estufa a 105°C por 24 horas. Após a primeira pesagem, as amostras foram imersas em recipientes contendo 50 mL de água. O sistema foi agitado em Incubadora shaker refrigerada (Cielab, modelo CE-725B) com velocidade de 70 rpm por 24 horas, a 25°C. Após este período, as amostras foram removidas e secas (105°C por 24 horas), para determinar a matéria seca não dissolvida em água (GONTARD et al. 1994). A análise foi realizada em triplicata.

A cor dos filmes foi determinada em colorímetro (Konica Minolta, CR 410) usando um fundo branco para a obtenção dos parâmetros de  $L^*$  (luminosidade),  $a^*$  (intensidade do vermelho),  $b^*$  (intensidade do amarelo),  $C^*$  (valor do croma) e  $h^*$  (ângulo de tonalidade), sendo realizadas em 4 locais próximo ao centro do filme.

### 2.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados das análises foram avaliados com o auxílio do software Microsoft Office Excel 2007. A análise estatística dos resultados foi realizada por meio do programa Statistica versão 7.0 (STATSOFT Inc., 2004).

## 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 3.1 DELINEAMENTO COMPOSTO CENTRAL ROTACIONAL 2<sup>2</sup>

Na tabela 2 encontra-se a matriz codificada e seus respectivos níveis juntamente com os valores experimentais dos parâmetros permeabilidade ao vapor de água (PVA) e solubilidade.

**Tabela 2.** Resultados experimentais para permeabilidade ao vapor de água e Solubilidade obtidas sob diferentes condições do delineamento 2<sup>2</sup>.

Ensaio	Valores Codificados		Valores Experimentais	
	GP (%)	EA (%)	PVA ( $\times 10^{-11}$ g.m <sup>-1</sup> . s <sup>-1</sup> . Pa <sup>-1</sup> )	Solubilidade (%)
1	-1	-1	3,84	27,87
2	1	-1	6,83	26,01
3	-1	1	4,34	24,93
4	1	1	7,17	32,73
5	-1,414	0	2,65	25,01
6	1,414	0	7,48	28,92
7	0	-1,414	5,02	25,04
8	0	1,414	5,98	28,05
9	0	0	5,40	30,84
10	0	0	5,18	29,85
11	0	0	5,16	29,09

GP (%): Gelatina de peixe; EA (%): Extrato do Açai; PVA: Permeabilidade ao vapor de água ( $\times 10^{-11}$  g.m<sup>-1</sup>. s<sup>-1</sup>. Pa<sup>-1</sup>).

Os resultados obtidos para os 11 ensaios realizados apresentaram como valores máximo e mínimo 7,48 e 2,65  $\times 10^{-11}$  g.m<sup>-1</sup>. s<sup>-1</sup>. Pa<sup>-1</sup> para permeabilidade ao vapor de água e 32,73 e 24,93% para solubilidade demonstrando que houve influência da concentração dos componentes utilizados nas propriedades dos filmes de gelatina de

peixe. Os resultados da análise estatística, aplicados aos dados experimentais de permeabilidade a vapor de água e solubilidade, foram determinados através do erro puro e são mostrados na Tabela 3 abaixo. Os efeitos significativos ( $p \leq 0,05$ ) dos fatores lineares, quadráticos e interação são mostrados em negritos.

**Tabela 3.** Efeito estimado, erro puro, grau de significância estatística para permeabilidade ao vapor de água (PVA) e solubilidade.

<b>PVA</b>				
Variáveis	Efeito estimado	Erro puro	t(2)	Significancia estatística (p)
<b>Gelatina de Peixe (L)</b>	<b>3,166</b>	<b>0,094</b>	<b>33,586</b>	<b>0,000</b>
Gelatina de Peixe (Q)	-0,049	0,112	-0,449	0,701
<b>Extrato do Açaí (L)</b>	<b>0,572</b>	<b>0,094</b>	<b>5,834</b>	<b>0,026</b>
Extrato do Açaí (Q)	0,381	0,113	3,432	0,078
Gelatina x Extrato	-0,085	0,133	-0,600	0,585
<b>Solubilidade</b>				
Variáveis	Efeito estimado	Erro puro	t(2)	Significancia estatística (p)
<b>Gelatina de Peixe (L)</b>	<b>2,871</b>	<b>0,289</b>	<b>9,917</b>	<b>0,010</b>
Gelatina de Peixe (Q)	1,057	0,344	3,067	0,091
<b>Extrato do Açaí (L)</b>	<b>2,011</b>	<b>0,289</b>	<b>6,945</b>	<b>0,020</b>
Extrato do Açaí (Q)	0,634	0,344	1,841	0,206
<b>Gelatina x Extrato</b>	<b>4,827</b>	<b>0,409</b>	<b>11,790</b>	<b>0,007</b>

De acordo com Barros Neto et al. (2001) o efeito indica o quanto cada fator irá influenciar nas respostas estudadas. Um efeito positivo indica que quando se aumenta a variável, a resposta também aumenta, ou seja, são diretamente proporcionais. Já no efeito negativo ocorre o contrário, sendo inversamente proporcionais, já em relação ao valor t, seu valor é diretamente proporcional a probabilidade da variável ser significativa. O coeficiente p é normalmente escolhido como intervalo de confiança, com um valor de 95%, podendo-se afirmar que, para valores de P inferiores 0,05, a influência da variável é considerada estatisticamente significativa.

Como observado na Tabela 3, os parâmetros gelatina de peixe (L) e extrato do açaí (L) da resposta permeabilidade a vapor de água e gelatina de peixe (L), extrato do açaí (L) e a interação Gelatina x Extrato da resposta solubilidade apresentaram efeito positivo indicando que um aumento em qualquer um desses fatores implica em um aumento das respostas. Já os parâmetros (Q) de permeabilidade e solubilidade, assim como a interação da permeabilidade apresentaram efeito negativo, mostrando que um

aumento nesses fatores implicaria em uma diminuição na permeabilidade e solubilidade. Os valores de t e coeficiente p também mostram valores coerentes com relação ao que foi dito acima. Verifica-se também que a gelatina de peixe (L) e a interação Gelatina x Extrato são os que apresentam maior efeito sobre as respostas permeabilidade e solubilidade, respectivamente.

Desprezando-se os fatores não significativos para a permeabilidade a vapor de água (PVA) e solubilidade, realizou-se a análise de variância (ANOVA) para verificar a significância da regressão e da falta de ajuste ao nível de 95% de confiança, utilizando o teste F para o planejamento estudado (Tabela 4).

**Tabela 4:** Análise de variância (ANOVA) do modelo ajustado para Permeabilidade ao vapor de água (PVA) e Solubilidade.

PVA						
Fonte de variação	SQ	GL	MQ	Fcalculado	Ftabelado ( $p \leq 0,05$ )	R <sup>2</sup>
Regressão	20,661	2	10,330	153,48	4,46	0,98
Resíduo	0,538	8	0,067			
Falta de ajuste	0,503	6	0,083	4,73	19,3	
Erro puro	0,035	2	0,017			
<b>Total</b>	21,199	10				
Solubilidade						
Fonte de variação	SQ	GL	MQ	Fcalculado	Ftabelado ( $p \leq 0,05$ )	R <sup>2</sup>
Regressão	47,481	3	15,827	12,43	6,59	0,90
Resíduo	5,093	4	1,273			
Falta de ajuste	4,757	2	2,378	14,19	19	
Erro puro	0,335	2	0,167			
<b>Total</b>	52,574	10				
SQ: Soma Quadrática		GL: Grau de Liberdade		MQ: Média Quadrática		

A ANOVA mostrou que os modelos ajustados para as respostas PVA e Solubilidade apresentaram regressão significativa ( $F_{cal} > F_{tab}$ ), porém preditiva apenas para a resposta PVA, e a falta de ajuste não significativa. De acordo com Barros Neto et al. (2001), uma regressão, embora seja significativa do ponto de vista do teste F, pode não ser útil para realizar previsões por cobrir faixa de variação pequena dos fatores estudados. Box e Wetz (1973) sugeriram que para uma regressão ser significativa estatisticamente e útil para fins preditivos, o valor do F calculado para a regressão deve ser mínimo quatro a cinco vezes maior que o tabelado. No caso deste estudo somente a resposta PVA apresentou o F calculado 34 vezes maior que o tabelado. No entanto o F da falta de ajuste em relação ao erro puro deve apresentar o menor valor possível, pois alto valor de F indica que há grande falta de ajuste dos dados ao modelo.

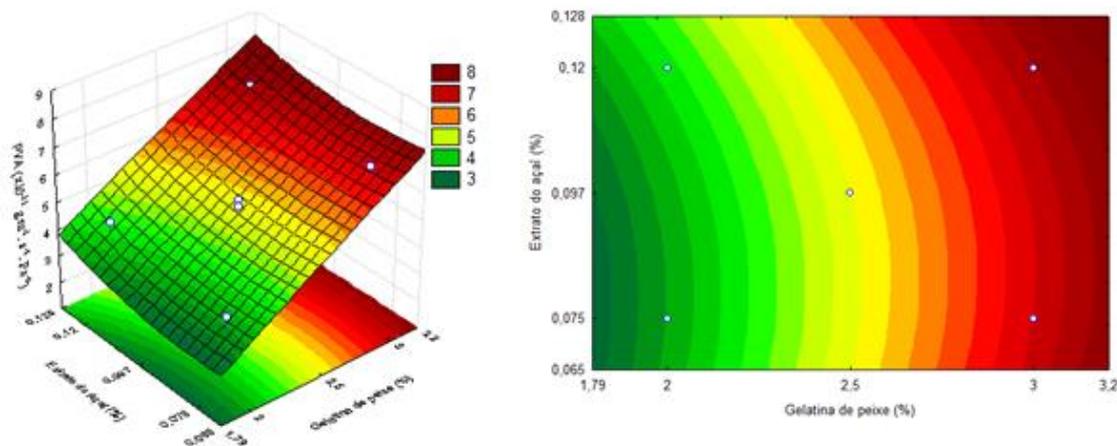
O coeficiente de determinação ( $R^2$ ) obtido para as respostas de PVA e solubilidade através do erro puro foi de 0,98 e 0,90 indicando que o modelo explicou 98% da variação dos dados experimentais para PVA, e 90% para a solubilidade. O modelo proposto para representar as respostas permeabilidade a vapor de água e solubilidade na obtenção do filme de gelatina e extrato do açai é mostrado abaixo:

$$\text{PVA (x10}^{-11} \text{ g.m}^{-1} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{Pa}^{-1}) = 5,24 + 1,58\text{GP} + 0,28\text{EA} \quad (3.1)$$

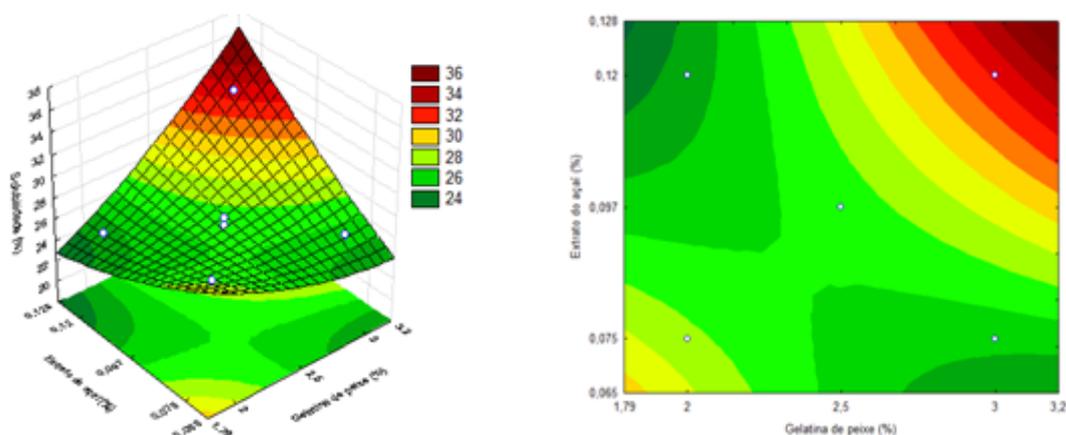
$$\text{S (\%)} = 26,47 + 1,43\text{GP} + 1\text{EA} + 2,41\text{GE} \quad (3.2)$$

Onde: PVA: Permeabilidade a vapor de água; S: Solubilidade; GP: Gelatina de peixe; EA: Extrato do açai

Na Figuras 1.1 e 1.2 são mostrados os gráficos de superfície de resposta e curvas de níveis geradas através do modelo proposto para as respostas PVA e Solubilidade, confirmando a análise dos efeitos realizados anteriormente, sendo melhor a visualização da variação das respostas.



**Figura 1.1.** Gráfico de superfície de resposta e curva de nível para permeabilidade ao vapor de água (PVA) relacionando as concentrações de gelatina de peixe (%) e extrato do açai (%) para obtenção do filme.



**Figura 1.2.**Gráfico de superfície de resposta e curva de nível para solubilidade, relacionando as concentrações de gelatina de peixe (%) e extrato do açaí (%), para a obtenção do filme.

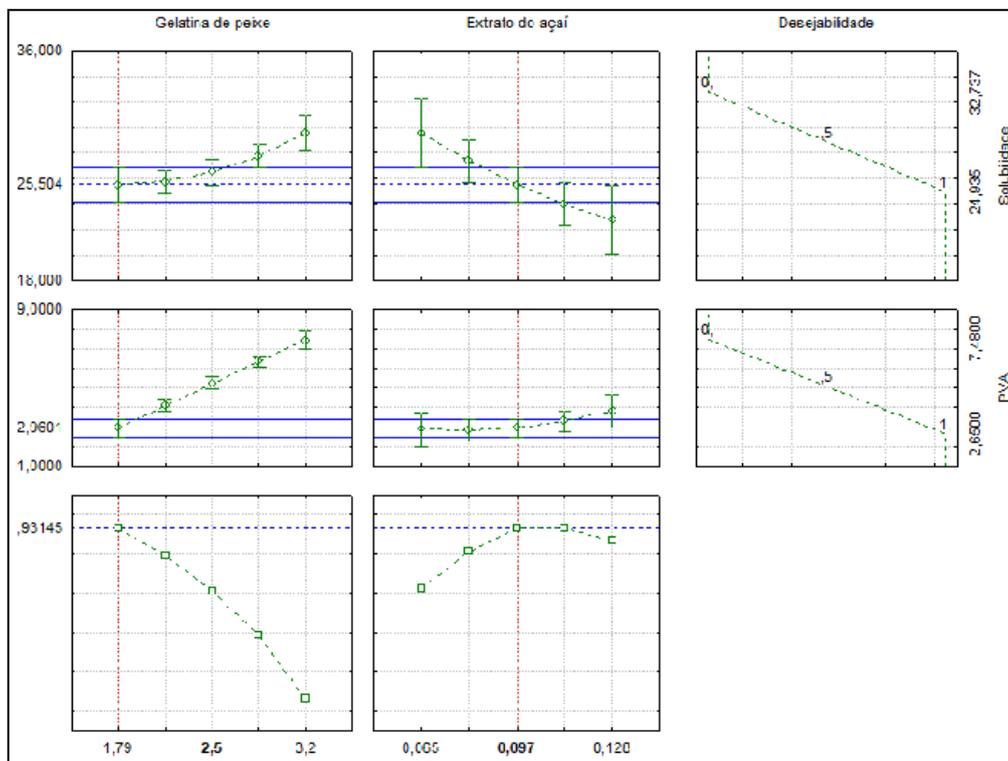
Na Figura 1.1 é possível observar que ocorre o aumento da permeabilidade a vapor de água ao aumentar a concentração de gelatina e extrato do açaí. O gráfico de curva de nível mostra que a região de 2,1 % em diante de concentração de gelatina resulta em maior PVA. Esse comportamento é justificado pelas características hidrofílicas da gelatina devido a sua composição de aminoácidos, particularmente os teores de prolina e hidroxiprolina (LIU et al. 2012). O efeito da antocianina sobre a resposta foi em menor intensidade que a gelatina de peixe como mostrado na Tabela 3.

A Figura 1.2 mostra os gráficos de superfícies de resposta e curvas de nível da resposta solubilidade. A interação gelatina x extrato apresentou maior efeito sobre a solubilidade e segundo Barros Neto et al. (2001) quanto maior for o efeito, maior é a sua influência sobre a resposta, confirmado pela Tabela 4. Essa interpretação também pode ser observada no gráfico de curvas de nível, onde a interação desses componentes mostra regiões de maior solubilidade nas concentrações mais altas dos dois componentes. De acordo com Maciel et al. (2012) quando uma interação apresenta efeito significativo, as considerações a respeito de uma variável devem ser feitas dentro do limite de outra variável.

Gómez-Estaca et al. (2008a) relata que ao adicionar extratos antioxidantes à gelatina de pele de atum aumentou na solubilidade do filme, devido à quebra ou degradação de cadeias alfa ligadas covalentemente ou mesmo agregados de alto peso molecular induzidos pelos compostos fenólicos presentes.

### 3.2 OBTENÇÃO DAS CONDIÇÕES ÓTIMAS POR DESEJABILIDADE

A estimativa das condições ótimas para a obtenção do filme biodegradável com extrato de açaí como indicador de pH foi realizada por meio da Função Desejabilidade (Figura 2).



**Figura 2.** Perfis de Desejabilidade para concentrações de gelatina de peixe e extrato de açaí no filme biodegradável. GP: gelatina de peixe; EA: extrato do açaí.

Na Figura 2, os quatro primeiros gráficos superiores apresentam o perfil de desejabilidade individual e os valores preditos para as respostas, PVA e solubilidade, onde a linha azul tracejada representa os valores ótimos para cada resposta. Os dois últimos gráficos, apresentam as concentrações ótimas de gelatina de peixe e extrato do açaí, indicados pelas linhas tracejadas em vermelho.

Com base nos resultados da função desejabilidade foi possível verificar que para se obter filmes com o máximo valor da função desejabilidade global (igual a 93%) deve-se utilizar concentrações de gelatina de peixe e extrato do açaí com valores de 1,79% e 0,097% respectivamente, conforme o DCCR aplicado. Portanto, o filme elaborado com essas concentrações, poderá apresentar valores médios em torno de  $2,96 \times 10^{-11} \text{ g.m}^{-1} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{Pa}^{-1}$  para PVA e 25,5% para solubilidade.

Os resultados obtidos no perfil desejabilidade, são compatíveis com os dados experimentais avaliados através da superfície de resposta, que mostra uma tendência,

para utilização de baixas concentrações de gelatina de peixe e concentrações de extrato do açaí próximas a região do ponto central.

### 3.3 CARACTERIZAÇÃO DOS FILMES BIODEGRADÁVEIS

O filme indicador de pH obtido com as concentrações ótimas indicadas pelo perfil de desejabilidade foi avaliado através das determinações da espessura, PVA, solubilidade, resistência a tração (RT), alongação e parâmetros de cor ( $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$ ,  $C^*$  e  $h$ ) e comparado com um filme controle sem a adição do extrato do açaí. Os resultados das análises são mostrados na Tabela 5.

**Tabela 5.** Caracterização física e química do filme indicador de pH e controle.

Determinações	Controle*	FI
<b>Espessura (mm)</b>	0,062±0,008 <sup>a</sup>	0,066±0,002 <sup>a</sup>
<b>PVA</b> ( $\times 10^{-11} \text{ g.m}^{-1} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{Pa}^{-1}$ )	6,73±0,109 <sup>a</sup>	7,11±1,506 <sup>a</sup>
<b>Solubilidade (%)</b>	28,96±2,234 <sup>a</sup>	23,28±2,522 <sup>b</sup>
<b>RT (MPa)</b>	11,4±1,03 <sup>a</sup>	9,38±1,16 <sup>b</sup>
<b>E (%)</b>	35,50±0,21 <sup>a</sup>	41,50±0,45 <sup>b</sup>
<b>Parâmetros de Cor</b>		
<b>L*</b>	89,03±0,217 <sup>a</sup>	36,52±0,628 <sup>b</sup>
<b>a*</b>	0,87±0,017 <sup>a</sup>	35,21±0,754 <sup>b</sup>
<b>b*</b>	4,52±0,177 <sup>a</sup>	19,12±1,077 <sup>b</sup>
<b>C*</b>	4,60±0,097 <sup>a</sup>	40,06±0,035 <sup>b</sup>
<b>h</b>	79,13±0,097 <sup>a</sup>	28,50±0,035 <sup>b</sup>

\*Sem adição do extrato do açaí. FI: Filme indicador de pH. Média ± Desvio Padrão. Letras diferentes na mesma linha indicam diferença estatística significativa entre as amostras ( $p \leq 0.05$ ).

Com relação à espessura os resultados não apresentaram diferença entre o filme padrão e o indicador de pH. De acordo com Prietto et al. (2018) a espessura dos filmes é diretamente proporcional à concentração de sólidos na formulação, a adição do extrato de açaí aumentou ligeiramente a espessura, sem diferença. De acordo com Sobral (2000), nem sempre o efeito das variações nas propriedades do filme é consequência de variação na espessura, no entanto, é crucial levar isso em conta, visto que ela pode definir o tipo de aplicação. De acordo com Silva et al. (2016) filmes com maior espessura degradam mais lentamente. Henrique et al. (2008) relata que o controle da espessura é difícil, principalmente nos processos do tipo *casting*, como o utilizado neste trabalho.

Com relação a PVA pode-se observar que o filme com antocianina não apresentou diferença em relação ao filme padrão. No entanto, a adição do extrato de açaí acarretou em

pequeno aumento do PVA do filme, não obtendo o valor indicado pelo perfil de desejabilidade. De acordo com os autores Veiga-Santos; Datchfield; Tadini (2010) que incorporaram extrato de uva em filmes biodegradáveis de amido, os compostos naturais presentes nos extratos naturais podem ser a razão desse aumento, visto que eles podem atuar como plastificantes, criando regiões com maior mobilidade, permitindo maior interação com a água. Gómez-Guillén et al. (2007) incorporaram extrato de murta (*Ugni molinae*) em filmes de gelatina de atum e descobriram que o extrato causou aumento da permeabilidade a vapor de água, atribuído às interações polifenol-proteína.

A solubilidade do filme indicador de pH e o padrão foi de 28,967 e 23,281 respectivamente, (Tabela 5) com diferença ( $p \leq 0.05$ ). Ahmad et al. (2015) trabalhou com filmes de gelatina de peixe e encontrou solubilidade de 94,9%, superior ao encontrado neste trabalho. De acordo com Hoque et al. (2010) isso se dá devido a presença de aminoácidos altamente hidrofílicos, que facilitam a solubilização dos filmes. Segundo Borkowski et al. (2005), a glicosilação de antocianinas aumenta a solubilidade em água, enquanto a acilação diminui a solubilidade, o que pode justificar os valores menores de solubilidade encontrados nesse trabalho.

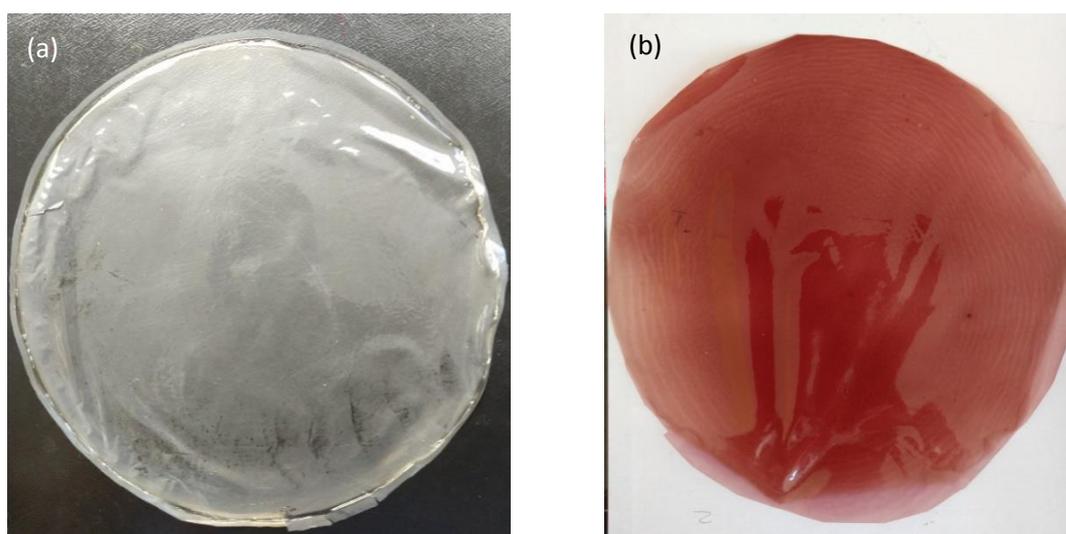
As propriedades mecânicas dos filmes em geral estão amplamente associadas à natureza e à estrutura química dos materiais de formação de filmes (AHMAD et al. 2015). A adição do extrato de açaí reduziu a resistência à tração do filme, e aumentou sua elongação quando comparado com o filme controle, apresentando diferença ( $p \leq 0,05$ ). A resistência à tração foi inversamente proporcional ao PVA, possivelmente devido ao efeito de plastificação causada pelos compostos do extrato, como relatado por (VEIGA-SANTOS; DATCHFELD; TADINI, 2010) que aumentaram sua elongação e diminuiu a resistência a tração, o mesmo comportamento foi observado Prietto et al. (2017), e de acordo com o autor, a presença de antocianinas pode enfraquecer as interações intermoleculares e, assim, afetar as propriedades mecânicas dos filmes. Pereira et al. (2015) relata que a resistência à tração dos filmes contendo antocianinas diminuiu quando comparados com o filme controle, mostrando que as interações entre antocianinas e polímeros influenciam a resistência do filme.

Na Figura 3 pode-se observar que a cor do filme controle foi diferente quando comparado ao filme com extrato do açaí que apresentou cor avermelhada.

De acordo com a Tabela 5, o filme contendo extrato do açaí era mais escuro, mais avermelhado e amarelo com relação aos parâmetros  $L^*$ ,  $a^*$  e  $b^*$  quando comparado com o filme controle, apresentando diferença ( $p \leq 0.05$ ). Isso ocorre devido

aos pigmentos hidrossolúveis presentes nas antocianinas do extrato do açaí, e que variações de cor dos filmes indicadores de pH estão relacionadas a diferentes estruturas moleculares das antocianinas, dependendo do pH das soluções (HE et al. 2015; DE MOURA et al. 2018). De acordo com Terci; Rossi, (2002) a cor vermelha é atribuída ao cátion flavilium, que surge quando a antocianina está em meio ácido, visto que a solução filmogênica tinha um pH de 4,5 ajustado com ácido cítrico.

Com relação aos valores de croma e ângulo de tonalidade ( $C^*$  e  $h$ ) do filme controle e do filme indicador de pH, eles apresentaram diferença ( $p \leq 0.05$ ). O filme controle se mostrou acromático em relação ao filme indicador que apresentou cor mais intensa. O valor do ângulo de tonalidade do filme controle confirmou sua tendência a cor amarela, que pode ser justificada devido ao tom levemente amarelado da solução filmogênica de gelatina. Em relação ao filme indicador de pH com extrato do açaí, o ângulo de tonalidade confirmou a cor vermelha, atribuída ao cátion flavilium da antocianina presente no extrato do açaí em meio ácido.



**Figura 3.** (a) Filme biodegradável sem adição de extrato do açaí (controle) (b) Filme indicador de pH com extrato do açaí.

#### 4. CONCLUSÃO

A utilização de gelatina da pele de peixe e extrato de açaí é alternativa para o desenvolvimento de filmes biodegradáveis, cujas propriedades podem ser modificadas controlando as concentrações dos componentes utilizados. A adição do extrato de açaí no filme aumentou a elasticidade, diminuiu a solubilidade e modificou sua cor

mostrando boa aparência, no entanto, houve aumento da permeabilidade a vapor de água. De acordo com isso, é interessante considerar o estudo da aplicação desse filme como embalagem inteligente.

## REFERENCIAS

AHMAD, M.; HANI, N. M.; NIRMAL, N. P.; FAZIAL, F. F.; MOHTAR, N. F.; ROMLI, S. R. (2015). Optical and thermo-mechanical properties of composite films based on fish gelatin/rice flour fabricated by casting technique. **Progress in Organic Coatings**, v. 84, 115–127.

AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS – ASTM. (1996). **D882-91: Standard Test Methods for Tensile Properties of Thin Plastic Sheeting**. Philadelphia (Annual Book of ASTM Standards).

ARFAT, Y. A.; BENJAKUL, S.; PRODPRAN, T.; OSAKO, K. (2014). Development and characterisation of blend films on fish protein isolate and fish gelatin. **Food Hydrocolloids**, v. 39, 58-67.

BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. (2001). **Como fazer experimentos pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria**. Campinas: Editora da UNICAMP.

BENBETTAÏEB, N.; KARBOWIAK, T.; BRACHAIS, C. H.; DEBEAUFORT, F. (2015). Coupling tyrosol, quercetin or ferulic acid and electron beam irradiation to cross-link chitosan – gelatin films: A structure – function approach. **European Polymer Journal**, v. 67, 113–127.

BORKOWSKI, T.; SZYMUSIAK, H.; GLISZCZYNSKA-SWIGLO, A.; TYRAKOWSKA, B. (2005). The effect of 3-O-beta-glycosylation on structural transformations of anthocyanins. **Food Research International**, v. 38, 1031-1037.

BOX, G.E.P.; WETZ, J. (1973). **Criteria for judging adequacy of estimation by an approximate response function**. University of Wisconsin Technical Report, n.9.

CAO, L.; LIU, W.; WANG, L. (2018). Developing a green and edible film from Cassia gum: The effects of glycerol and sorbitol. **Journal of Cleaner Production**, v. 175, 276–282.

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

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

DARNET, S.; SERRA, J. L.; DA CRUZ RODRIGUES, A. M.; MELLER DA SILVA, L. H. (2011). “A highperformance liquid chromatography method to measure tocopherols in assai pulp (Euterpe oleracea)” **Food Research International**, v. 44, 2107–2111.

DE MOURA, S. C. S. R.; BERLING, C. L.; GERMER, S. P. M.; ALVIM, I. D.; HUBINGER, M. D. (2018). Encapsulating anthocyanins from Hibiscus sabdariffa L. calyces by ionic gelation: Pigment stability during storage of microparticles. **Food Chemistry**, v. 241, 317–327.

FREILE-PELEGRÍN, Y.; ROBLEDO, D. (2014). Bioactive phenolic compounds from algae. In B. Hernandez-Ledesma, M. Herrero. **Bioactive compounds from marine foods: Plant and animal sources** (p. 131e152). Chichester: John Wiley & Sons.

GHAANI, M.; COZZOLINO, C. A.; CASTELLI, G.; FARRIS, S. (2016). An overview of the intelligent packaging technologies in the food sector. **Trends Food Science Technology**, v. 51, 1-11.

GÓMEZ-ESTACA, J.; MONTERO, P.; FERNÁNDEZ-MARTÍN, F.; ALEMÁN, A.; GÓMEZ-GUILLÉN, M. C. (2008a). Physical and chemical properties of tuna-skin and bovine-hide gelatin films with added aqueous oregano and rosemary extract. **Food Hydrocolloids**, v. 23, 1334–1341.

GÓMEZ-GUILLÉN, M. C.; IHL, M.; BIFANI, V.; SILVA, A.; MONTERO, P. (2007). Edible films made from tuna-fish gelatin with antioxidant extracts of two different murta ecotypes leaves (*Ugni molinae*). **Food Hydrocolloids**, v. 21, 1133–1143.

GOMEZ-GUILLEN, M. C.; PEREZ-MATEOS, M.; GOMEZ-ESTACA, J.; LOPEZ-CABALLERO, E.; GIMENEZ, B.; MONTERO, P. (2009). Fish gelatin: A renewable material for developing active biodegradable films. **Trends in Food Science & Tehcnology**, v. 20, 3-16.

GONTARD, N.; DUCHEZ, C.; CUQ, J.L.; GUILBERT, S. (1994). Edible composite film of wheat gluten and lipids-water vapor permeability and other physical properties. **International Journal of Food Science and Technology**, v.29, 39-50.

GUERRERO, P.; ARANA, P.; O'GRADY, M. N.; KERRY, J. P.; DE LA CABA, K. (2015). Valorization of industrial by-products: Development of active coatings to reduce food losses. **Journal of Cleaner Production**, v. 100, 179–184.

HE, X. L.; LI, X. L.; LV, Y. P.; HE, Q. (2015). Composition and color stability of anthocyanin-based extract from purple sweet potato. **Food Science and Technology**, v. 35, 468–473.

HENRIQUE, C. M.; CEREDA, M. P.; SARMENTO, S. B. S. (2008). Características físicas de films biodegradáveis produzidos a partir de amidos modificados de mandioca. **Ciencia e Tecnologia de alimentos**, v. 28, 231-240.

HOQUE, M.S.; BENJAKUL, S.; PRODPRAN, T. (2010). Effect of heat treatment of film-formingsolution on the properties of film from cuttlefish (*Sepia pharaonis*) skin gelatin. **Journal of Food Engineering**, v. 96, 66–73.

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

LIMPAN, N.; PRODPRAN, T.; BENJAKUL, S.; PRASARPRAN, S. (2010). Properties of biodegradable blend films based on fish myofibrillar protein and polyvinyl alcohol as influenced by blend composition and pH level. **Journal Food Engineering**, v. 100, 85-92.

LIU, Z.; GE, X.; LU, Y.; DONG, S.; ZHAO, Y.; ZENG, M. (2012). Effects of chitosan molecular weight and degree of deacetylation on the properties of gelatine-based films. **Food Hydrocolloid**, v. 26, 311–317.

MA, Q.; WANG, L. (2016). Preparation of a visual pH-sensing film based on Tara gum incorporating cellulose and extracts from grape skins. **Sensors and Actuators B: Chemical**. DOI: dx.doi.org/doi:10.1016/j.snb.2016.05.107.

MA, Q.; DU, L.; WANG, L. (2017). Tara gum/polyvinyl alcohol-based colorimetric NH<sub>3</sub> indicator films incorporating curcumin for intelligent packaging, **Sensors and Actuators B: Chemical**. DOI: dx.doi.org/10.1016/j.snb.2017.01.035.

MACIEL, R. A.; VIANA, C. M. C.; SIMÕES, M. G.; FONTELLAS, M. J. P. (2012). DESIDRATAÇÃO OSMÓTICA DE FILÉS DE PIRARUCU (*Arapaima gigas*). **Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial**, v. 6, 618-629.

MUSSO, Y. S.; SALGADO, P. R.; MAURI, A.N. (2016). Gelatin based films capable of modifying its color against environmental pH changes, **Food Hydrocolloids**. DOI: 10.1016/j.foodhyd.2016.06.013.

PEREIRA, V. A.; DE ARRUDA, I. N. Q.; STEFANI, R. (2015). Active chitosan/PVA films with anthocyanins from Brassica oleraceae (Red Cabbage) as time-temperature indicators for application in intelligent food packaging. **Food Hydrocolloids**, v. 43, 180–188.

PERIS, C. S.; CAIADO, R. R.; LIMA-FILHO, A. A. S.; RODRIGUES, E. B.; FARAH, M. E.; GONÇALVES, M. B.; ALVES, B. Q.; URUSHIMA, J. G. P.; RAGAZZI, R.; MAIA, M. (2018). Analysis of Anthocyanins Extracted from the Acai Fruit (*Euterpe oleracea*): A Potential Novel Vital Dye for Chromovitrectomy. **Journal of Ophthalmology**. DOI: doi.org/10.1155/2018/6830835.

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

REALINI, C. E.; MARCOS, B. (2014). Active and intelligent packaging systems for a modern society. **Meat Science**, v. 98, 404–419.

RESTUCCIA, D.; SPIZZIRRI, U. G.; PARISI, O. I.; CIRILLO, G.; CURCIO, M.; IEMMA, F.; PICCI, N. (2010). New EU regulation aspects and global market of active and intelligent packaging for food industry applications. **Food Control**, v. 21, 1425–1435.

SHAHID, M.; MOHAMMAD, F. (2013). Recent advancements in natural dye applications: a review. **Journal of Cleaner Production**, v. 53, 310-331.

SILVA, M.; LOPES, P. S.; DA SILVA, C. F.; YOSHIDA, C. M. P. (2016). Active packaging material based on buriti oil - *Mauritia flexuosa* L.f. (*Arecaceae*) incorporated into chitosan films. **Journal of Applied Polymer Science**, v.133,1-9.

SILVA, N. S.; HERNÁNDEZ, E. J. G. P.; ARAÚJO, C. S.; JOELE, M. R. S. P., LOURENÇO, L. F. H. (2018). Development and optimization of biodegradable fish gelatin composite film added with buriti oil, **CyTA - Journal of Food**, v. 16, 340-349.

SILVA-PEREIRA, M. C.; TEIXEIRA, J. A.; PEREIRA-JUNIOR, V. A.; STEFANI, R. (2015). Chitosan/corn starch blend films with extract from Brassica oleraceae (red cabbage) as a visual indicator of fish deterioration. **LWT-Food Science and Technology**, v. 61, 258–262.

SOBRAL, P. J. A. (2000). Influência da espessura de biofilmes feitos à base de proteínas miofibrilares sobre suas propriedades funcionais. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 35, 1251–1259.

TERCI D.; ROSSI A. (2002). Indicadores naturais de pH: Usar papel ou solução? **Química Nova**, v. 4, 684 – 688.

VEIGA-SANTOS P.; DITCHFIELD C.; TADINI C. (2010). Development and Evaluation of a Novel pH Indicator Biodegradable Film Based on Cassava Starch. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 120, 1069–1079.

WU, J.; GE, S.; LIU, H.; WANG, S.; CHEN, S.; WANG, J.; ZHANG, Q. (2014). Properties and antimicrobial activity of silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) skin gelatin-chitosan films incorporated with oregano essential oil for fish preservation. **Food Packaging and Shelf Life**, v. 2, 7–16.

ZHANG, X. H.; LU, S. S.; CHEN, X. (2014). A visual pH sensing film using natural dyes from *Bauhinia blakeana* Dunn. **Sensors and Actuators B-Chemical**, v. 198, 268–273.

### CAPITULO III

FILME DE GELATINA COM EXTRATO PURIFICADO DO AÇAÍ (*Euterpe Oleracea*) COMO INDICADOR DA DETERIORAÇÃO DE FILÉS DE PEIXE.

**RESUMO:** Os indicadores de pH são dispositivos que através de alterações colorimétricas visuais fornecem informações ao consumidor podendo ser incorporados em materiais de embalagem ou como etiquetas presas ao interior ou exterior da embalagem. Neste contexto, o objetivo deste trabalho é avaliar o desempenho de um filme de gelatina com extrato do açaí (*Euterpe oleracea*) e verificar sua ação como indicador de pH na deterioração de filés de peixe refrigerado. Deste modo, um filme de gelatina, glicerol e extrato do açaí foi elaborado segundo a técnica de *casting*. A gelatina utilizada foi caracterizada quanto ao ponto de fusão (PF) e força do gel (FG), e o extrato de açaí quanto ao teor total de antocianina. Foi avaliado a estabilidade do filme durante nove dias e sua ação como embalagem inteligente indicadora de pH, onde porções de filé de peixe foram colocadas em bandejas de poliestireno e cobertas com o filme e armazenadas a  $\pm 5$  °C. Durante seis dias, a cada 72 horas foram realizadas análises microbiológicas e o pH no filé. Paralelamente, os filmes foram submetidos à análise colorimétrica. A gelatina obteve valores satisfatórios de PF e FG, e o extrato apresentou alto teor de antocianinas. O filme indicador apresentou boa estabilidade nas diferentes condições em que foi armazenado, e durante sua aplicação como embalagem de filés de peixe, apresentou elevação do pH e mudanças na cor do filme, também foi observado um decréscimo na população microbiana ao longo dos dias. No entanto, o filme não apresentou boa aparência no fim da aplicação, sendo mais indicado seu uso como etiqueta indicadora de pH.

**Palavras-chaves:** extrato de açaí; gelatina de peixe; filme inteligente; indicador; pH.

## 1 INTRODUÇÃO

A tecnologia de embalagem de alimentos tem evoluído, isso ocorre como reflexo de uma sociedade mais moderna que está em busca de mais conveniência, alimentos mais seguros e saudáveis, além da preocupação com o meio ambiente e o desperdício de alimentos (KERRY, 2014). Assim, novos conceitos para embalagens foram desenvolvidos, como as inteligentes, sendo uma resposta às preocupações dos consumidores em relação a segurança e qualidade dos alimentos (PEREIRA; DE ARRUDA; STEFANI, 2015).

A embalagem inteligente é um sistema capaz de monitorar as condições dos alimentos em tempo real, aumentando as possibilidades de monitorar a qualidade do produto, rastrear pontos críticos e fornecer informações mais detalhadas ao longo da cadeia de suprimentos (KUSWANDI et al., 2012). Geralmente, três tipos de tecnologias são as mais utilizadas em sistemas inteligentes de embalagem de alimentos, sendo elas, os sensores, indicadores e portadores de dados (GHAANI et al. 2016). Os indicadores através de alterações colorimétricas visuais fornecem informações qualitativas e têm sido amplamente estudados, devido sua facilidade na fabricação e o fato de poderem ser lidas a olho nu. Esses dispositivos inteligentes podem ser incorporados em materiais de embalagem ou presos ao interior ou ao exterior de um pacote, como etiquetas (BRODY et al. 2008; ZHAI et al. 2018). Existem na literatura indicadores colorimétricos de pH utilizados para avaliar o frescor do peixe (PACQUIT et al. 2007; KUSWANDI et al. 2012; ZHAI et al. 2017). No entanto, alguns corantes sensíveis ao pH podem ser utilizados como indicadores de pH, como por exemplo, o azul de bromofenol, o vermelho de clorofenol e o verde de bromocresol (PACQUIT et al. 2006; DONG et al. 2008), porém o uso desses compostos em alimentos pode ser nocivo para a saúde humana (ZHANG et al., 2014).

Fontes renováveis, biopolímero e pigmentos naturais, por exemplo, podem ser usados como alternativa para embalagens inteligentes. O emprego de materiais de base biológica para o desenvolvimento de filmes biodegradáveis tem gerado grande interesse na indústria por ser sustentável, renovável, fontes abundantes, afinidade ao meio ambiente e potencial para substituir os petroquímicos (LECETA et al. 2015).

As antocianinas representam um grande grupo de pigmentos naturais de origem vegetal e têm grande potencial como indicador de deterioração de alimentos em sistemas de embalagem inteligentes, pois a instabilidade de cor das antocianinas é

influenciada por sua estrutura, pH, temperatura, co-pigmentação, radiação UV e presença de oxigênio resultando em coloração diferente. Esta instabilidade de cor das antocianinas torna estes pigmentos especialmente úteis para monitorar a qualidade dos alimentos e, portanto, pode ser usado como um indicador de deterioração de alimentos em sistemas de embalagem inteligentes (GOLASZ et al. 2013).

Açaí (*Euterpe oleracea*) é uma palmeira comumente encontrada no norte da América do Sul, principalmente na Amazônia brasileira (OLIVEIRA; SANTOS, 2011). A polpa do açaí possui alto teor de compostos fenólicos, como antocianinas, proantocianidinas, outros flavonóides e lignanas (SCHAUSS et al., 2006a). Duas antocianinas predominantes, cianidina-3-rutinosídeo e cianidina-3-glicosídeo, são responsáveis pela maior parte de sua característica cor púrpura escura (PACHECO-PALENCIA et al., 2007a). Existem muitos estudos sobre os benefícios do açaí, com relação às suas propriedades antioxidantes, seu potencial como corante e sua estabilidade química (PACHECO-PALENCIA; TALCOTT, 2010; CEDRIM et al. 2018; PERIS et al. 2018), no entanto, quanto ao seu uso potencial para o desenvolvimento de indicadores colorimétricos ainda não foi explorado.

Sendo assim, o objetivo deste estudo foi avaliar o desempenho de um filme à base de gelatina de peixe, glicerol e extrato seco purificado de açaí e verificar sua ação como um indicador de pH na deterioração de filés de peixe refrigerado.

## 2 MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1 MATERIAL

Foi utilizada pele de peixe da espécie pescada amarela (*Cynoscion acoupa*), obtida do processo de filetagem da indústria de pesca Ecomar (Vigia-PA, Brasil), para a produção da gelatina. O extrato seco purificado do açáí (*Euterpe oleracea*) (Amazon Dreams, Brasil) foi utilizado como indicador de pH.

### 2.2 MÉTODOS

#### 2.2.1 Determinação do teor total de antocianinas

O conteúdo de antocianinas totais do extrato purificado do açáí foi determinado pelo método da diferença de pH (GIUSTI; WROLSTAD, 2001) onde se dissolve em dois sistemas tampão: cloreto de potássio – ácido clorídrico pH 1,0 (0,025M) e acetato de sódio pH 4,5 (0,4M). As medidas de absorvância espectral da amostra foram lidas em 514 e 700 nm, respectivamente. A absorvância foi calculada a partir da equação 2.1:

$$A = (A_{514nm} - A_{700nm})_{pH1,0} - (A_{514nm} - A_{700nm})_{pH4} \quad (2.1)$$

A concentração de pigmentos monoméricos no extrato foi calculada e representada em cianidina-3-glicosídeo. Em seguida, foi calculada a concentração de antocianinas monoméricas utilizando a equação 2.2. A análise foi realizada em triplicata.

$$AM \text{ (mg/L)} = \frac{A \times PM \times FD \times 10^3}{\epsilon \times \lambda} \quad (2.2)$$

Onde: AM – antocianinas monoméricas (mg.100 g<sup>-1</sup>); A – diferença de absorvância calculada pela eq. (2.1); PM – peso molecular da cianidina-3-glicosídeo = 449,2; FD – fator de diluição;  $\epsilon$  – absorvância molar = 26900;  $\lambda$  – caminho óptico = 1,0 cm; 10<sup>3</sup> = fator de conversão para mg.

#### 2.2.2 Extração da gelatina de pele de pescada amarela (*Cynoscion acoupa*)

A extração da gelatina foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Silva et al. (2018) com adaptações do tempo e da temperatura de imersão, obtidas em ensaios preliminares. As peles foram cortadas 4cm x 4cm, lavadas em água corrente e

imersas em solução de cloreto de sódio 0,6 M 1:5 (peso/volume) por 15 minutos, sob agitação de 85 rpm a 25°C em incubadora Shaker (Luca-223, Brasil). Em seguida o material foi submerso em solução de hidróxido de sódio a 0,3M, 1:5 (peso/volume) por 15 minutos, sob agitação constante e lavada em água corrente. Posteriormente foi imerso em solução de ácido acético 0,02 M, 1:5 (peso/volume) por uma hora sob agitação e lavado em água corrente. A fase seguinte de extração foi realizada com água destilada em banho maria (Tecnal, Te-057, Brasil) por 6 h a 60 °C, mantendo 1:5 (peso/volume). Após a extração, o filtrado obtido foi colocado em bandejas de inox, congelado em freezer a -23°C e liofilizado a -50°C/36 horas (Liotop- L101, Brasil). Finalmente a gelatina obtida foi embalada a vácuo (Embaladora Fastvac, F200, Brasil) e armazenada a -23°C até a realização dos filmes.

### **2.2.3 Caracterização da Gelatina Liofilizada**

O ponto de fusão foi determinado em soluções de gelatina a 6,7%. A força do gel (Bloom) foi determinada em analisador de textura (Reo Tex, SD-700, Sunscientific) usando sonda de teflon cilíndrica, com 12,5 mm de diâmetro, pressionando 4 mm no gel de gelatina com velocidade de 1 mm/s (CHOI; REGENSTEIN, 2000). As análises foram realizadas em triplicata.

### **2.2.4 Elaboração do filme indicador de pH**

Os biofilmes foram obtidos de acordo com Silva et al. (2018) com modificação do material adicionado. A concentração de extrato seco do açaí utilizada foi definida a partir de ensaios preliminares, onde as mesmas não produzissem filmes muito claros ou muito escuros, como observado por Veiga-Santos; Datchfield; Tadini (2010).

A solução filmogênica contendo 1,79% de gelatina (p/v), 15% de plastificante (p/p) e 140mL de água destilada foram colocadas em banho-maria por 20 minutos a 60°C para solubilização da gelatina, em seguida foram retiradas do banho maria e reservadas até temperatura ambiente ( $\pm 25^\circ$ ). Após atingir a temperatura ambiente, o pH da solução foi ajustado para 4,5 com ácido cítrico 2M. Em seguida, 0,097% de extrato seco do açaí (p/v) foi misturado à solução e homogeneizado (Turratec/Tecnal, TE-102) a 10.000 rpm durante 5 minutos. De acordo com o método *casting*, 130mL da solução filmogênica obtida foi adicionada em suporte de silicone (22cm de diâmetro x 3cm de altura), e submetida à secagem a 35°C por 16hs em estufa com circulação e renovação

de ar (Tecnal, TE 394/7). Após a secagem, o filme foi acondicionado em saco de polietileno, selado (Embaladora Fastvac, F200, Brasil) e armazenado a temperatura ambiente até as análises.

### 2.2.5 Estabilidade da cor do filme em função do tempo, temperatura e luz

Os filmes biodegradáveis inteligentes foram avaliados quanto à sua estabilidade de cor em função do tempo, temperatura e iluminação de acordo com a metodologia descrita por Prietto et al. (2017) com modificações. Os filmes preparados em pH 4,5 com ácido cítrico, foram armazenados durante nove dias. Um dos filmes foi mantido a temperatura de  $\pm 25^{\circ}\text{C}$  com incidência de luz, e o outro sob refrigeração ( $\pm 5^{\circ}\text{C}$ ) sem a incidência de luz para avaliar sua estabilidade. Os parâmetros de cor ( $L^*$ ;  $a^*$ ;  $b^*$  e  $\Delta E$ ) foram monitorados a cada 72 horas utilizando um colorímetro portátil (Minolta, CR-410), onde foram realizadas 5 medidas de cada filme. A mudança de cor do filme durante o armazenamento foi calculada de acordo com a Equação 2.3 abaixo e comparada com a cor do filme no primeiro dia de armazenamento.

$$\Delta E = \sqrt{(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2} \quad (2.3)$$

### 2.2.6 Teste de aplicação do filme em filés de pescada amarela (*Cynoscion acoupa*)

Foram colocados em bandejas de poliestireno (isopor) 200g de filé de pescada amarela e fechadas com o filme indicador de pH, em seguida colocados sob refrigeração ( $\pm 5^{\circ}\text{C}$ ) durante todo o período do teste onde o final da análise foi definido pela mudança da cor do filme. Durante o teste de aplicação, a cada 72 horas foram realizadas análises microbiológicas do filé (*Salmonella spp*, contagem de bactérias aeróbias mesófilas, bactérias psicotróficas, estafilococos coagulase positiva e coliformes a  $45^{\circ}\text{C}$ ) de acordo com a metodologia descrita pelo Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods (DOWNES; ITO, 2001).

Também foi realizado o monitoramento do pH do filé de peixe de acordo com o método 981.12 da AOAC (1997) utilizando-se um pHmetro digital (LineLab, pH pro), em triplicata. Os parâmetros de cor ( $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$ ,  $C^*$  e  $h$ ) dos filmes foram monitorados em colorímetro portátil (Minolta, CR 410) onde foram feitas 5 medidas. Os valores de  $\Delta E$  (variação de cor) foram calculados de acordo com a Equação 2.3 usando o filme do

tempo zero como referência. Como controle foi utilizado um filme indicador de pH nas mesmas condições do anterior, porém sem a presença do filé de peixe.

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 DETERMINAÇÃO DO TEOR TOTAL DE ANTOCIANINAS

O teor total de antocianina do extrato bruto de açaí determinado pelo método do pH diferencial, foi de  $29,17 \pm 1,09$  mg / g de pó de extrato do açaí. Esta concentração de antocianina é superior à de outros frutos com pigmento antocianina, como por exemplo, Rui et al. (2011) que encontrou o valor de 9,01 mg/g/pó liofilizado de antocianinas em *Vaccinium uliginosum*. Teixeira et al. (2015) determinou antocianinas totais no fruto do açaí e encontrou valores médio de 10,4 e 12,04 g/mg nos frutos coletados na safra de 2010 e 2011, respectivamente. O valor encontrado nesse trabalho foi superior, mas foi utilizado um extrato purificado, livre de carboidratos, lipídeos e proteínas, tendo em maior quantidade as antocianinas, além de polifenóis, taninos, entre outros.

#### 3.2 CARACTERIZAÇÃO DA GELATINA DE PEIXE

O ponto de fusão da gelatina de pescada amarela estudada foi de 27,5°C, valor próximo ao encontrado por Silva et al. (2014) para a gelatina de pele de cobia (*Rachycentron canadum*) de 26,8°C. Bueno et al. (2011) encontrou também ponto de fusão entre 24 e 26 ° C para a gelatina da tilápia do Nilo. De acordo com Boran et al (2010) dependendo da aplicabilidade, pode ser desejável fornecer gelatinas com baixas temperaturas de fusão. Quando comparado com a gelatina comercial estudada por Silva et al. (2017) que encontrou 28,16°C, o valor do presente trabalho se mostrou próximo, porém menor. De acordo com Grossman; Bergman (1992) ponto de fusão mais baixo pode ser devido aos menores teores dos aminoácidos prolina e hidroxiprolina na gelatina de peixe quando comparada com a de mamíferos. Diversos fatores podem variar o ponto de fusão da gelatina, entre eles temos a fonte do colágeno, condições de extração, composição em aminoácidos, entre outros (Gilsenan; Ross-Murphy, 2000).

A força do gel é a propriedade funcional mais importante da gelatina e é afetada pela concentração, condições de preparação e presença de outros hidrocolóides, e determina o seu valor comercial (Silva et al. 2014). O valor de força do gel da gelatina estudada neste trabalho foi de 234,6g estando dentro da faixa desejada para

alimentos que é de 50 à 300g. Os resultados obtidos por Yang et al. (2007) e Silva et al. (2011) foram de 225g e 182,8 a 298,7g para gelatina de pele de bagre e da pele da cabeça de carpa, respectivamente. De acordo com Gomez-Guillen et al. (2002) a estabilidade da força do gel é diretamente proporcional ao conteúdo de histidina e prolina, e inversamente proporcional a quantidade de componente de baixo peso molecular. Em relação às gelatinas bovinas e suínas, a de peixe possui menor peso molecular, sendo que a distribuição desse peso molecular é função da fonte do qual ela é extraída (CHIOU et al. 2006).

### 3.3 ESTABILIDADE DA COR DO FILME EM FUNÇÃO DO TEMPO, TEMPERATURA E LUZ

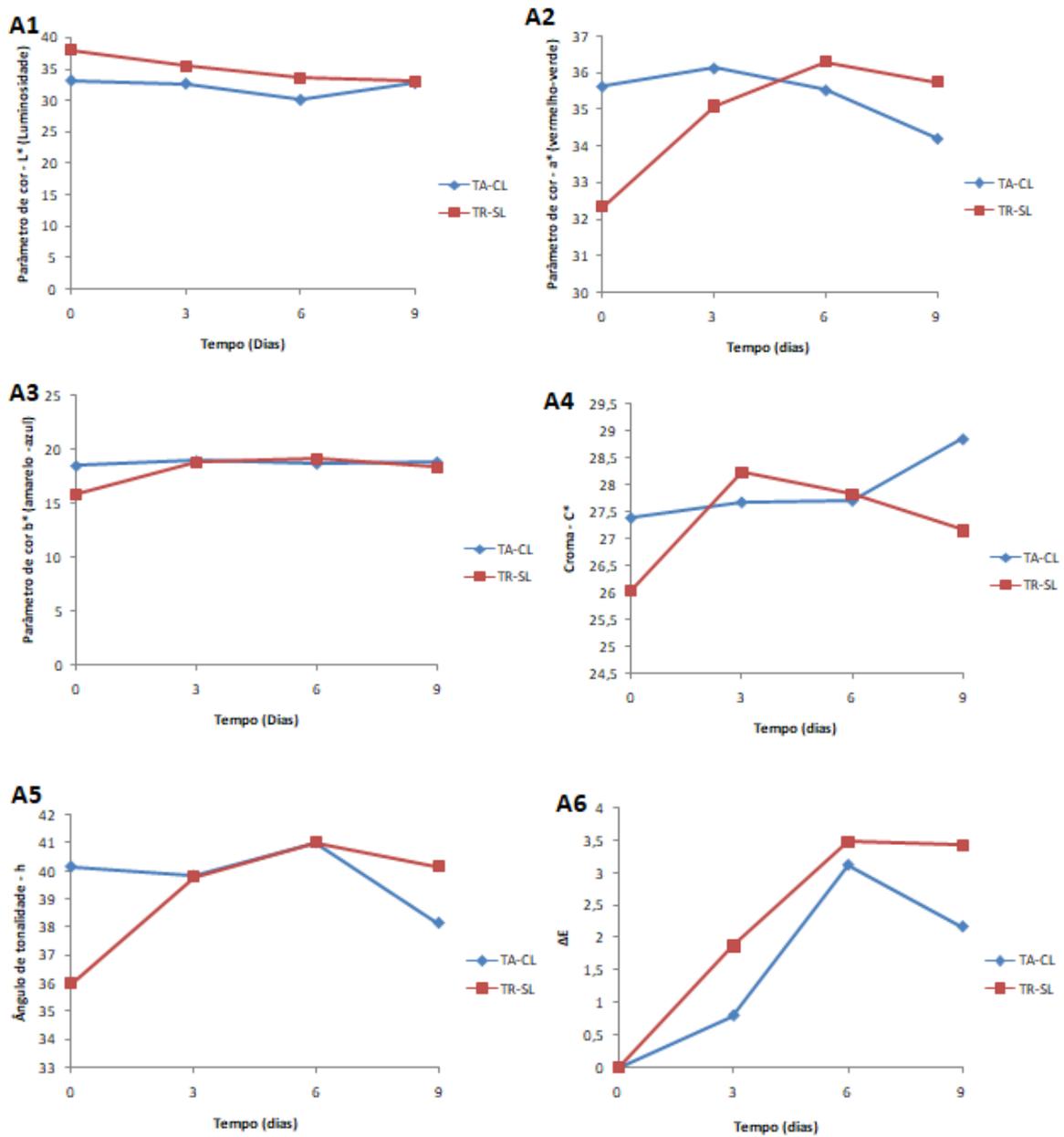
As respostas dos parâmetros de cor com relação a estabilidade dos filmes armazenados sob temperatura ambiente com incidência de luz e sob temperatura de refrigeração sem incidência de luz são mostradas na Figura 1.

O filme indicador apresentou um decaimento constante do parâmetro  $L^*$  no filme sob refrigeração sem incidência de luz. No filme que se mantinha em temperatura ambiente com incidência de luz, foi observada queda da luminosidade seguida de leve aumento entre o sexto e o nono dia. No entanto, os filmes nos dois ambientes apresentaram valores próximos no final do experimento, indicando que diferenças de temperatura e a presença ou ausência de luz não interferiram diretamente na luminosidade do filme.

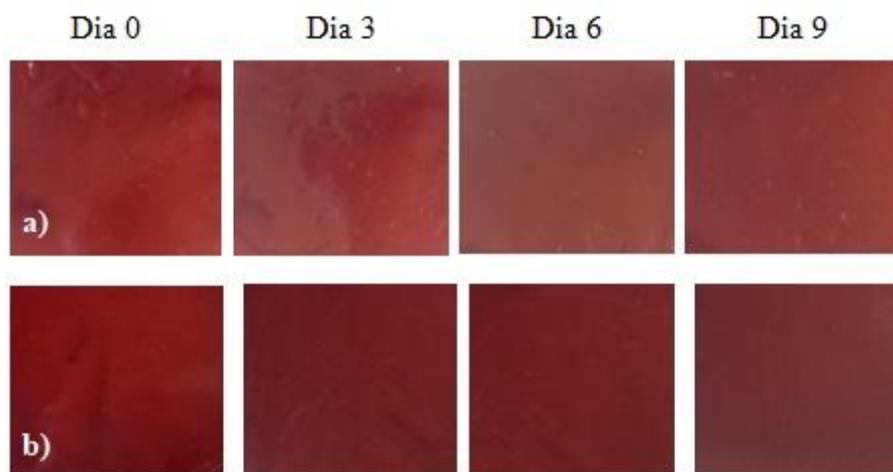
Em relação ao parâmetro  $a^*$  que varia do (vermelho (+) ao verde (-) os filmes apresentaram tendência a cor vermelha, apresentando-se visualmente similares. O parâmetro  $b^*$  indica tendência a cor amarela (+) e azul (-) tendo obtido valores positivos e constantes para os dois filmes, ao longo dos nove dias. O croma, ou valor de saturação  $C^*$ , representa a distância do eixo de luminosidade ( $L^*$ ), já o ângulo de tonalidade ( $h$ ) começa no eixo  $+a^*$  (vermelho), e se movimenta em sentido anti-horário, sendo expressos em graus (Figura 1). Os valores de  $C^*$  e ângulo ( $h$ ) não sofreram grandes alterações durante o armazenamento nos filmes que influenciasse visivelmente na mudança de cor. Os filmes apresentaram cor intensa tanto no início quanto ao final dos nove dias de armazenamento e mostrou valores que confirmam a tendência de cor dos filmes ao vermelho.

Em relação à diferença total de cor ( $\Delta E$ ) o filme que apresentou o maior  $\Delta E$  foi o filme armazenado sob refrigeração sem a incidência de luz. No entanto, os filmes armazenados nas duas condições mantiveram a cor ao longo do armazenamento, sem mudanças de cor visível a olho nu. A determinação deste parâmetro é importante para embalagens inteligentes, demonstrando que fatores externos como luz e temperatura não afetam diretamente a estabilidade da antocianina do extrato do açaí dos filmes. De acordo com Tassanawat et al. (2007) a mudança da cor é perceptível ao olho humano quando apresentar valor  $\Delta E$  maior que 5, o que não foi obtido em nenhum dos filmes. As imagens obtidas dos filmes ao longo do armazenamento são mostradas na Figura 2.

Prietto et al. (2017) verificou a estabilidade de filmes com antocianinas extraídas do repolho vermelho e feijão preto, e observou maior estabilidade na cor do filme com extrato do repolho vermelho em temperatura ambiente, e isso pode ser devido a antocianina acilada conferir maior estabilidade à molécula. Diversos estudos afirmam que a acilação de antocianinas afeta sua estabilidade, em relação a uma variedade de fatores, tais como: temperatura, luz, mudanças de pH, peróxido de hidrogênio, entre outros. A acilação confere impedimento estérico às antocianinas e, portanto, contribui para a alta estabilidade das mesmas (ZHAO et al. 2016).



**Figura 1.** Alteração dos parâmetros de cor ( $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$ ,  $C^*$ ,  $h$ ,  $\Delta E$ ) dos filmes indicadores de pH durante o armazenamento à temperatura ambiente com incidência de luz (TA-CL) e à temperatura de refrigeração sem incidência de luz (TR-SL). (A1) Parâmetro  $L^*$  - luminosidade; (A2) Parâmetro  $a^*$  (vermelho-verde); (A3) Parâmetro  $b^*$  (amarelo-azul); (A4) valor de saturação  $C^*$  (croma); (A5) ângulo de tonalidade ( $h$ ); (A6) Diferença total de cor ( $\Delta E$ ).



**Figura 2.** Filme indicador de pH incorporado com extrato do açáí ao longo dos nove dias de armazenamento. a) Temperatura ambiente com incidência de luz; b) Temperatura de refrigeração sem incidência de luz.

### 3.4 APLICAÇÃO DO FILME INTELIGENTE EM FILÉS DE PESCADA AMARELA (*Cynoscion acoupa*)

Na Tabela 1 e 2 abaixo encontram-se os resultados das análises realizadas no filé de pescada amarela (*Cynoscion acoupa*) e os parâmetros de cor do filme, durante o armazenamento.

**Tabela 1.** Análise físico-química e microbiológica realizada no filé de pescada amarela (*Cynoscion acoupa*) armazenado sob temperatura de refrigeração ( $\pm 5^{\circ}\text{C}$ ).

Tempo (dias)	pH	Coliformes a 45°C (NMP/g)	Mesófilos (logUFC/g)	Psicotróficos (logUFC/g)	Estafilococos coagulase positiva (UFC/g)	<i>Salmonella spp.</i>
0	5,9	150	4,2	5,1	$<1 \times 10^2$	Ausência
3	6,9	20	4,1	4,9	$<1 \times 10^2$	-
6	7,6	15	3,2	4,5	$<1 \times 10^2$	-

Os resultados mostrados na Tabela 1 com relação ao pH do filé de pescada amarela, observa-se que obteve aumento gradativo durante o armazenamento, conforme foi ocorrendo a deterioração do filé de peixe. Durante o armazenamento, enzimas e micro-organismos degradam suas proteínas produzindo amônia e aminas, que acarretam no aumento do pH, formando um ambiente propício para que as bactérias causem alterações no peixe (GARCÍA-BARRIENTOS et al., 2006; JACOBSEN et al., 2010). Segundo a legislação brasileira, os valores de pH estabelecidos para musculatura interna

e externa dos peixes são de 6,5 e 6,8 (BRASIL, 1952; BRASIL, 1997), respectivamente. Os resultados da Tabela 1 mostram que o pH do filé de pescada amarela estava impróprio para consumo já na segunda coleta da amostra, apresentando odor desagradável. No entanto, com relação a sua aparência se mostrava um pouco ressecado, o que pode ser justificado devido ao armazenamento sob refrigeração ( $\pm 5^{\circ}\text{C}$ ). Estes resultados indicam que o filme inteligente não possui permeabilidade a vapor de água e solubilidade adequadas para esse tipo de aplicação, em contato com alimentos com umidade elevada, como o filé de peixe. Segundo Ogawa e Maia (1999), o pH não é um índice seguro para avaliar o frescor do peixe, sendo seu uso geralmente restrito devido variações de amostra para amostra. Sendo o pH não conclusivo como único parâmetro para se avaliar o grau de frescor do peixe, também foi realizada a análise microbiológica do filé de peixe a cada 72 horas.

Coliformes totais e termotolerantes são usados como indicadores de qualidade, pois os peixes geralmente não carregam esses micro-organismos, em especial *E. coli* e coliformes fecais, onde sua presença reflete ao grau de contaminação ao qual o alimento foi exposto (ICMSF, 1986). Os resultados obtidos nas três coletas da análise de coliformes a  $45^{\circ}\text{C}$  indicaram baixos níveis de contaminação das amostras, e reforçam a importância de boas práticas de higiene no manuseio e a cobertura de gelo no peixe exposto. A RDC nº 12, de janeiro de 2001 não indica padrões para coliformes em peixes frescos, no entanto, a recomendação da Comissão Internacional de Especificações Microbiológicas para Alimentos (ICMSF) é um limite mínimo  $1,1 \times 10^1$  e máximo de  $5 \times 10^2$  MPN / g (ICMSF, 1986). Os resultados dessas análises são mostrados na Tabela 1. Alves et al. (2016) obteve valores de coliformes a  $45^{\circ}\text{C}$  variando de 3,6 a 150 NMP/g para as amostras de peixes-rei durante os períodos de coleta indicando baixos níveis de contaminação.

A análise padrão de contagem de placas para mesófilos aeróbicos e psicotróficos, é utilizada como um indicador de população bacteriana. Em todas as coletas, as amostras estavam abaixo do total de contagens estabelecido pela Comissão Internacional sobre Especificações Microbiológicas para Alimentos (ICMSF, 2005), que recomenda um máximo de 7 log UFC/g de peixe refrigerado. Contagens elevadas destas análises são indicativas de contaminação durante o manuseio, que podem ocasionar alterações relacionadas com o frescor do alimento (SHIKONGO-NAMBABI et al. 2010). As análises de coliformes, mesófilos e psicotróficos diminuíram ao longo do armazenamento. Apesar de apresentarem valores dentro dos padrões microbiológicos

na última coleta, a análise foi descontinuada devido o pH da amostra estar fora do padrão e ter ocorrido mudança de cor do filme. Além disto, os filés de pescada amarelada durante o armazenamento apresentaram alteração de suas características sensoriais, tais como odor desagradável e aspecto ressecado. O peixe pode ter liberado líquidos durante o armazenamento, com a consequente diminuição da atividade de água ( $a_w$ ) inibindo o crescimento dos micro-organismos. Esse comportamento indica que o filme permitiu que houvesse contato do filé de peixe com o oxigênio, acarretando assim no ressecamento do mesmo, o que não é um resultado esperado.

As amostras coletadas estavam dentro dos padrões microbiológicos estabelecidos pela legislação brasileira para peixes frescos quanto a presença de *Salmonella* e Estafilococos. Este padrão está baseado na ausência de *Salmonella spp.* e em menos de  $10^3$  Estafilococos coagulase positiva em amostras de 25 gramas de pescada amarela (Brasil, 2001). De acordo com Mello et al. (2010) a *Salmonella* não faz parte da microbiota normal do peixe, e quando presente, geralmente está associada à uma manipulação inadequada. Já estafilococos coagulase positiva quando apresenta valores acima do permitido pela legislação, pode ser um indicativo de *Staphylococcus aureus*.

**Tabela 2.** Parâmetros de cor dos filmes durante o monitoramento da deterioração dos filés de pescada amarela (*Cynoscion acoupa*).

Parâmetros de Cor	FI			FC		
	Tempo (dias)					
	0	3	6	0	3	6
<b>L*</b>	50,40	39,49	24,73	44,42	42,91	38,76
<b>a*</b>	27,88	17,03	1,39	32,36	33,19	32,48
<b>b*</b>	17,13	10,58	1,20	18,76	19,24	19,31
<b>C*</b>	32,75	20,05	1,84	37,41	38,37	37,79
<b>H</b>	31,56	31,85	40,8	30,10	30,10	30,74
<b><math>\Delta E</math></b>	0	15,17	40,18	0	1,45	5,68

FI: Filme indicador armazenado com filé de peixe; FC: Filme controle, sem filé de peixe. L (claridade), a (vermelhidão (+) e verde (-)), b (amarelo (+) - azul (-)), C\* (saturação/croma), h (ângulo de tonalidade) e  $\Delta E$  (variação de cor).

O valor de L\* da amostra FI diminuiu, indicando um escurecimento do filme ao longo do tempo de armazenamento (Tabela 2), sendo atribuído ao aumento do pH do peixe. A amostra FC, no entanto, apresentou um decréscimo maior de L\* no 6º dia com relação ao valor inicial coletado no tempo zero.

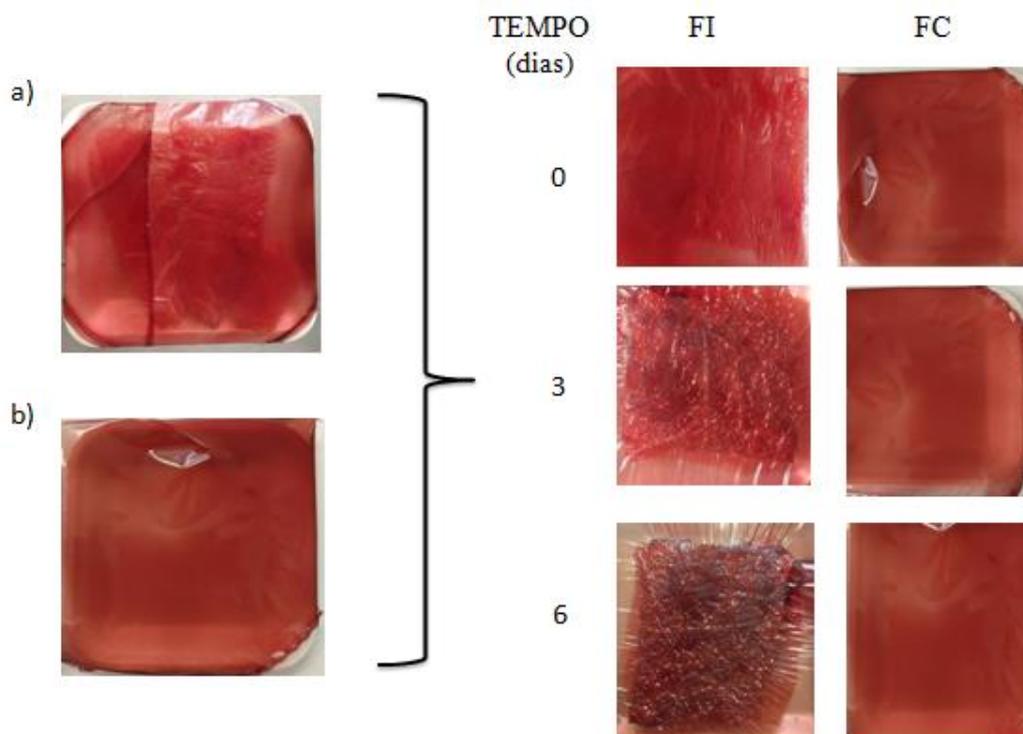
O parâmetro  $a^*$  do filme mostrou que a amostra FI diminuiu ao longo do tempo de armazenamento, diminuindo sua cor vermelha, mas FC manteve seu valor praticamente constante. O mesmo comportamento aconteceu para FI e FC no parâmetro  $b^*$ . Ma et al. (2017) incorporou extrato de uva (*Vitis amurensis*) em filme biodegradável de tara gum e aplicou em filé de peixe, em temperatura ambiente, avaliou os parâmetros de cor ( $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$  e  $\Delta E$ ) e observou mudança de cor de rosa para verde com a deterioração do peixe, além da produção de amins voláteis e consequentemente aumento do pH.

O croma ( $C^*$ ) e o ângulo de tonalidade (h) do FI sofreram alterações durante o armazenamento (Tabela 2). O FI apresentava cor mais intensa no início do armazenamento, mas perdeu a intensidade progressivamente, tornando-se levemente acromático (diminuição de  $C^*$ ), com cor levemente acinzentada (Figura 3). O valor de h comprovou a tendência a cor vermelha, mantendo-se na região do vermelho durante a estocagem. O FC manteve seus valores constantes para  $C^*$  e h, mantendo a sua intensidade cor e seu ângulo de tonalidade no tom avermelhado. De acordo com Golasz et al. (2013) mudanças no parâmetro de croma e ângulo de tonalidade podem estar relacionadas a mudanças na estrutura das antocianinas.

Com relação à diferença de cor ( $\Delta E$ ), a mesma é considerada um atributo útil para se poder avaliar a habilidade do olho humano em distinguir as diferenças de cor (SILVA; PETTER; SCHNEIDER, 2007). O FI apresentou uma alta variação de cor já no terceiro dia de armazenamento, confirmando as mudanças de cor observadas nos outros parâmetros. A mudança de cor de FI pode ser facilmente notada na Figura 3, devido sua alta variação de cor ao longo do armazenamento. O FC apresentou baixos valores de  $\Delta E$ , o qual já era esperado, visto que o filme não tinha contato direto com o filé de peixe e estava nas mesmas condições que um dos filmes da análise de estabilidade, no entanto, este parâmetro apresentou valores maiores no sexto dia de armazenamento, o que pode ser justificado devido o fato do FC ter sido armazenado no mesmo ambiente que o FI, de forma que as amins voláteis do filé de peixe tiveram certa influencia em sua variação de cor, porém não perceptíveis a olho nu. Silva; Petter; Schneider (2007) utilizaram o  $\Delta E$  como parâmetro de qualidade para avaliar o impacto dos processos na cor do produto, correlacionando  $\Delta E$  com a habilidade do olho humano em distinguir a diferença de cor, dessa forma eles definiram que a diferença de cor entre duas amostras justapostas quando apresentam valores acima de 6.0 representam uma alta diferença entre elas. De acordo com isso, os valores de variação de cor encontrados

neste trabalho indicaram que provavelmente os consumidores conseguiriam facilmente distinguir as mudanças na cor do filme durante o armazenamento.

Sabe-se que vários fatores podem influenciar na cor das antocianinas (luz, temperatura, presença de oxigênio, entre outros), no entanto neste trabalho, a alteração do pH promovida pela deterioração do filé de peixe, foi o principal fator da mudança de cor do filme inteligente adicionado de extrato do açaí rico em antocianinas.



**Figura 3.** Imagens dos filmes durante a monitorização da deterioração do filé de peixe armazenado à temperatura de refrigeração. FI: filme indicador de pH FC: filme controle.

#### **4. CONCLUSÃO**

O filme apresentou boa estabilidade nas diferentes condições de temperatura e luz, e mostrou que é capaz de detectar alterações de pH nos filés de peixe através de alterações na cor, alcançando seu objetivo. No entanto, devido ao final da aplicação o filme não apresentar boas condições de aparência e maleabilidade, o seu uso como etiqueta indicadora de pH seria mais viável.

## REFERENCIAS

- ALVES, R. C. B.; FIGUEREDO, H. M.; SILVA, R. S. O.; LOURENÇO, L. F. H. (2017). Identification of intestinal microbiota and microbiological quality of the king weakfish (*Macrodon ancylodon*). **African Journal of Microbiology Research**, v. 11, 1184-1190.
- BORAN, G.; MULVANEY, S. J.; REGENSTEIN, J. M. (2010). Rheological properties of gelatin from silver carp skin compared to commercially available gelatins from different sources. **Journal of Food Science**, v. 75, 565–571.
- BRASIL (1952). Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Decreto-Lei n. 30.691, de 29 de março de 1952. Regulamento da inspeção industrial e sanitária de produtos de origem animal. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil. Brasília, DF.
- BRASIL (1997). Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria n. 185, de 13 de maio de 1997: Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Peixe Fresco (Inteiro e Eviscerado). Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil. Brasília, DF.
- BRASIL (2001). Ministério da Saúde. Resolução RDC nº12, de 2 de janeiro de 2001. Aprovado o Regulamento Técnico sobre Normas Microbiológicas para Alimentos. Diário Oficial da República Federativa do Brasil. Brasília - DF.
- BRODY, A. L.; BUGUSU, B.; HAN, J. H.; SAND, C. K.; MCHUGH, T. H. (2008). Innovative food packaging solutions. **Journal of Food Science**, v. 73, R107-R116.
- BUENO, M. C.; ALVIM, D. I.; KOBERSTEIN, R. D. C.; PORTELLA, M. C.; GROSSO, C. (2011). Produção de gelatina de pele de tilápia e sua utilização para obtenção de micropartículas contendo óleo de Salmão. **Brazilian Journal of Food Technology**, v.14, 65-74.
- CEDRIM, P. C. A. S.; BARROS, E. M. A.; DO NASCIMENTO, T. G. (2018). Antioxidant properties of acai (*Euterpe oleracea*) in the metabolic syndrome. **Brazilian Journal Food Technology**, v. 21. DOI: [dx.doi.org/10.1590/1981-6723.09217](https://doi.org/10.1590/1981-6723.09217).
- CHIOU, B.; AVENA-BUSTILLOS, R. J.; SHEY, J.; YEE, E.; BECHTEL, P. J.; IMAM, S. H.; GLENN, G. M.; ORTS, W. J. (2006). Rheological and mechanical properties of cross linked fish gelatins. **Polymer**, v.47, 6379–6386.
- CHOI, S. S.; REGENSTEIN, J. M. (2000). Physicochemical and sensory characteristics of fish gelatin. **Journal of Food Science**, v.65, 194-199.
- DONG, S.; LUO, M.; PENG, G.; CHENG, W. (2008). Broad range pH sensor based on sol– gel entrapped indicators on fibre optic. **Sensors and Actuators B-Chemical**, v. 129, 94–98.
- DOWNES, F.P; ITO, K. (2001). Compendium of methods for the microbiological. Examinations of Foods. 4th. ed. Washington (DC): APHA.

GARCÍA-BARRIENTOS, R.; PÉREZ-CHABELA, M. L.; MONTEJANO, J. G.; GERRERO LEGARRETA, I. (2006). Changes in pork and shark (*Rhizopriondon terraenovae*) protein emulsions due to exogenous and endogenous proteolytic activity. **Food Research International**, v. 39, 1012-1022. DOI:dx.doi.org/10.1016/j.foodresb.2006.07.004.

GHAANI, M.; COZZOLINO, C. A.; CASTELLI, G.; FARRIS, S. N. (2016). A overview of the intelligent packaging technologies in the food sector. **Trends Food Science and Technology**, v. 51, 1–11.

GILSENAN, P. M.; ROSS-MURPHY, S. B. (2000). Rheological characterization of gelatins form mammalian and marine sources. **Food Hydrocolloids**, v.14, 191-195.

GIUSTI, M. M.; WROLSTAD, R. E. (2001). Anthocyanins: characterization and measurement with uv-visible spectroscopy. In: WROLSTAD, R.E. **Current protocols in food analytical chemistry**. New York: John Wiley & Sons. Unit. F1.2.113.

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

GÓMEZ-GUILLÉN, M. C.; FERNANDÉZ-DIAZ, M. D.; ULMO, N.; LIZARBE, M. A.; MONTERO, P. (2002). Structural and physical properties of gelatin extracted from different marine species: a comparative study. **Food Hydrocolloids**, v. 16, 25-34.

GROSSMAN, S.; BERGMAN, M. (1992). Process for the production of gelatin from fish skin. **United States Patent**. No 5,093, 474.

ICMSF (International Commission on Microbiological Specifications for Foods) (1986). **Microorganisms in Food. Sampling for microbiological analysis: Principles and specific applications**. 2 ed. Londres: Blackwell Scientific Publications.

ICMSF (International Commission on Microbiological Specifications for Foods) (2005). **Microorganisms in Foods 6: Microbial Ecology of Food Commodities**. 2nd edition. Chapter 3. New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers.

JACOBSEN, H.H.; NIELSEN, B.; JORGENSEN, J.N. (2010). Chemical process responsible for quality deterioration in fish. In: Chemical deterioration and physical Instability of food and Beverages. **Food Science, Technology and Nutrition**. Ed. Woodhead Publishing Series, nº 15, 439-465.

KERRY, J. P. (2014). New packaging technologies, materials and formats for fast-moving consumer products. In J. H. Han (2nd Eds.). **Innovations in foodpackaging** (549-584) USA: Academic Press.

KUSWANDI, B.; JAYUS, R. A.; ABDULLAH, A.; HENG, L. Y.; AHMAD, M. (2012). A novel colorimetric food package label for fish spoilage based on polyaniline film. **Food Control**, v. 25, 184 e 189.

LECETA, I.; PEÑALBA, M.; ARANA, P.; et al. Ageing of chitosan films: Effect of storage time on structure and optical, barrier and mechanical properties (2015). **European Polymer Journal**, v. 66, 170–179.

MA, Q.; DU, L.; WANG, L. (2017). Tara gum/polyvinyl alcohol-based colorimetric NH<sub>3</sub> indicator films incorporating curcumin for intelligent packaging, **Sensors and Actuators B: Chemical**. DOI: dx.doi.org/10.1016/j.snb.2017.01.035.

MELLO, C. A.; MENDES, E. S.; DE ALMEIDA FILHO, E. S.; LANZARIN, M.; DE LIRA, S. F.; AMERICANO, M. M. S. (2010). Qualidade microbiológica do *Brycon microlepis* (piraputanga) de cativeiro e capturado no rio Cuiabá-MT. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v 17, 46-51.

OGAWA M.; MAIA E. L. (1999). Manual da pesca: ciência e tecnologia do pescado, v. 1. São Paulo: Varela.

OLIVEIRA, E.N.A. D.; SANTOS, D.C. (2011). Processamento e avaliação da qualidade de licor de açaí (*Euterpe oleracea* Mart.). **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 70, 534-541.

PACHECO-PALENCIA, L.; HAWKEN, P.; TALCOTT, S. (2007a). Juice matrix composition and ascorbic acid fortification effects on the phytochemical, antioxidant, and pigment stability of açaí (*Euterpe oleracea* Mart.). **Food Chemistry**, v. 105, 28–35.

PACHECO-PALENCIA, L. A.; TALCOTT, S. T. (2010). Chemical stability of açaí fruit (*Euterpe oleracea* Mart.) anthocyanins as influenced by naturally occurring and externally added polyphenolic cofactors in model systems. **Food Chemistry**, v. 118, 17–25.

PACQUIT, A.; LAU, K. T.; MCLAUGHLIN, H.; FRISBY, J.; QUILTY, B.; DIAMOND, D. (2006). Development of a volatile amine sensor for the monitoring of fish spoilage. **Talanta**, v. 69, 515–520.

PACQUIT, A.; FRISBY, J.; DIAMOND, D.; LAU, K.; FARRELL, A.; QUILTY, B.; DIAMOND, DERMOT. (2007). Development of a smart packaging for the monitoring of fish spoilage. **Food Chemistry**, v. 102, 466-470.

PEREIRA, V. A.; DE ARRUDA, I. N. Q.; STEFANI, R. (2015). Active chitosan/PVA films with anthocyanins from *Brassica oleracea* (Red Cabbage) as time-temperature indicators for application in intelligent food packaging. **Food Hydrocolloids**, v. 43, 180–188.

PERIS, C. S.; CAIADO, R. R.; LIMA-FILHO, A. A. S.; RODRIGUES, E. B.; FARAH, M. E.; GONÇALVES, M. B.; ALVES, B. Q.; URUSHIMA, J. G. P.; RAGAZZI, R.; MAIA, M. (2018). Analysis of Anthocyanins Extracted from the Acai Fruit (*Euterpe oleracea*): A Potential Novel Vital Dye for Chromovitrectomy. **Journal of Ophthalmology**, v. 2018. DOI: doi.org/10.1155/2018/6830835.

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

RUI, L.; PING, W.; QING-QI, G.; ZHEN-YU, W. (2011). Anthocyanin composition and content of the *Vaccinium uliginosum* Berry. **Food Chemistry**, v. 125, 116–120.

- SILVA, R. A.; PETTER, C. O.; SCHNEIDER, I. A. H. (2007). Avaliação da perda da coloração artificial de agatas. **Revista Escola de Minas**, v. 60, 477-482.
- SILVA, R.; BANDEIRA, S.F.; PETRY, F.C.; PINTO, L.A.A. (2011). Gelatin extraction from skins of common carp heads. **Ciência Rural**, v.41, 904–909.
- SILVA, R. S. G.; BANDEIRA, S. F.; PINTO, L. A. A. (2014). Characteristics and chemical composition of skins gelatin from cobia (*Rachycentron canadum*). **LWT - Food Science and Technology**, v. 57, 580-585.
- SILVA, E.V.; LOURENÇO, L.F.H.; PENA, R.S. (2017). Optimization and characterization of gelatin from kumakuma (*Brachyplatystoma filamentosum*) skin. **CyTA-Journal of Food**, v. 15, 1947-6337.
- SILVA, N. S.; HERNÁNDEZ, E. J. G. P.; ARAÚJO, C. S.; JOELE, M. R. S. P.; LOURENÇO, L. F. H. (2018). Development and optimization of biodegradable fish gelatin composite film added with buriti oil. **CyTA - Journal of Food**, v. 16, 340-349.
- SCHAUSS, A. G.; WU, X.; PRIOR, R. L.; OU, B.; HUANG, D.; OWENS, J.; AGARWAL, A.; JENSEN, G. S.; HART, A. N.; SHANBROM, E. (2006a). Antioxidant capacity and other bioactivities of the freeze-dried Amazonian palm berry, *Euterpe oleraceae* Mart. (Acai). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, 8604-8610.
- SHIKONGO-NAMBABI, M. N. N. N.; CHIMWAMUROMBE, P. M.; VENTER, S. N. (2010). Factors impacting on the microbiological quality and safety of processed hake. **African journal of biotechnology**, v. 9, 8405-8411.
- TASSANAWAT, S.; PHANDEE, A.; MAGARAPHAN, R.; NITHITANAKUL, M.; MANUSPIYA, H. (2007). pH-sensitive PP/clay nanocomposites for beverage smart packaging. In Proceedings of the 2nd. **International Conference on Nano/Micro Engineered and Molecular Systems**.
- TEIXEIRA, G. H. A.; LOPES, V. G.; PESSOA, J. D. C. (2015). Total Anthocyanin Content in Intact Açaí (*Euterpe oleracea* Mart.) and Juçara (*Euterpe edulis* Mart.) fruit Predicted by Near Infrared Spectroscopy. **Hort Science**, v. 50, 1218–1223.
- VEIGA-SANTOS, P.; DITCHFIELD, C.; TADINI, C. (2010). Development and Evaluation of a Novel pH Indicator Biodegradable Film Based on Cassava Starch. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 120, 1069–1079.
- YANG, H.; WANG, Y.; JIANG, M.; OH, J. H.; HERRING, J.; ZHOU, P. (2007). 2-Step optimization of the extraction and subsequent physical properties of channel catfish (*Ictalurus punctatus*) skin gelatin. **Food Chemistry and Toxicology**, v.72, 188-195.
- ZHAI, X.; SHI, J.; ZOU, X.; WANG, S.; JIANG, C.; ZHANG, J.; HUANG, X.; ZHANG, W.; HOLMES, M. (2017). Novel colorimetric films based on starch/polyvinyl alcohol incorporated with roselle anthocyanins for fish freshness monitoring. **Food Hydrocolloids**, v. 69, 308–317.
- ZHAI, X.; LI, Z.; ZHANG, J.; SHI, J.; ZOU, X.; HUANG, X.; ZHANG, D.; SUN, Y.; YANG, Z.; HOLMES, M.; GONG, Y.; POVEY, M. (2018). Natural Biomaterial Based Edible and pH-Sensitive Films Combined with Electrochemical Writing for Intelligent

Food Packaging. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. DOI: 10.1021/acs.jafc.8b04932.

ZHANG, X. H.; LU, S. S.; CHEN, X. (2014). A visual pH sensing film using natural dyes from *Bauhinia blakeana* Dunn. **Sensors and Actuators B-Chemical**, v. 198, 268–273.

ZHAO, C. L.; YU, Y. Q.; CHEN, Z. J.; WEN, G. S; WEI, F. G. ZHENG Q. (2016). Stability-increasing effects of anthocyanin glycosyl acylation. **Food Chemistry**, v. 214, 119-128.